

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella fijiensis* MORELET.

Evaluation of the antifungic activity of plant extracts on the fungus *Mycosphaerella fijiensis* MORELET

RESUMEN

Los cultivos de plátano y banano son afectados por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de una de las enfermedades más destructivas, conocida como Sigatoka Negra (SN), la cual genera cuantiosas pérdidas económicas para los cultivadores. Para el control de esta enfermedad se emplean diversos tipos de fungicidas de síntesis que aumentan los costos de producción y causan deterioro significativo al medio ambiente así como a la salud de los trabajadores.

En este trabajo se evaluaron 84 extractos vegetales (1000 mg/L) obtenidos de 42 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumari (Risaralda, Colombia), para determinar su actividad fungicida a través de los métodos de elongación del tubo germinativo de las ascosporas y de la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

El extracto metanólico de la especie *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) presentó la mayor actividad antifúngica, al reducir en 100% el crecimiento de *M. fijiensis* en sus dos ciclos reproductivos, lo cual hace a este extracto una fuente potencial para el control de la Sigatoka Negra.

PALABRAS CLAVES: *Bioprospección, Control Sigatoka negra, Annonaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Clusiaceae, Costaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Urticaceae*

ABSTRACT

Plantain and banana crops are affected by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet which caused one of the most destructive diseases known as Black Sigatoka, producing great economic losses to growers. To control this disease it has been employed several types of synthetic fungicides that increase production costs, and cause significant damages to the environment and plantation's workers.

In these study 84 plant extracts (1000 mg/L) from 42 plant species collected in the Natural Reserve Ucumari (Risaralda, Colombia) were evaluated to determine its fungicide potency through the methods of measuring the length of the germinative tube of ascospore and the measurement of radial growth of the *M. fijiensis* mycelium.

The methanolic extract from *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) showed the strongest inhibitory effects, since it reduced *M. fijiensis* growth in 100%, in both phases of its reproductive cycle; then this extract has a great potential for Black Sigatoka control.

KEYWORDS: *Bioprospection, Black Sigatoka control, Annonaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Clusiaceae, Costaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Urticaceae*

OSCAR M. MOSQUERA M.

Químico, M.Sc.
Profesor Titular
Grupo de Biotecnología-Productos Naturales
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

LINA MARCELA ECHEVERRY

Estudiante Escuela de Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira.
linismec@hotmail.com

JAIME NIÑO OSORIO

Lic. Bgía-Qca., M. Sc., Ph.D.
Profesor Titular
Grupo de Biotecnología-Productos Naturales
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra (SN) causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es una de las enfermedades más destructivas que afectan los cultivos de plátano y banano a escala mundial [1-3].

En Colombia los costos del control químico de la enfermedad oscilan entre US\$700 y 900/hectárea al año; cifra que representa el 46% del valor global de los agroquímicos y cerca del 14% de los costos totales de producción del cultivo [4]. La enfermedad produce destrucción rápida del área foliar, reduce la capacidad fotosintética de la planta, estimula la maduración precoz de los racimos y daña por consiguiente la calidad de la fruta, al reducir hasta en un 60% el peso de los racimos, cuando no se implementan medidas de control efectivas [4].

El agente causal de la SN es el hongo Ascomyceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, el cual se reproduce de forma asexual y sexual durante su ciclo de vida. La fase asexual (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet), se presenta en las primeras lesiones de la enfermedad, donde se observa la aparición de un número relativamente bajo de conidióforos, que salen de los estomas del envés de las hojas, dando origen a los conidios. La fase sexual (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), es la más importante en la expansión de la enfermedad, al producir un gran número de ascosporas a partir de estructuras llamadas pseudotecios. Las ascosporas son septadas hialinas con 14-20 µm de longitud y de 4-6 µm de ancho [5].

Con relación a la búsqueda de extractos vegetales con acción sobre la SN se tienen los trabajos desarrollados por Osorio-Salamanca [6], quién encontró que el extracto alcohólico de *Senna reticula* (Fabaceae) presentó la mayor actividad protectora *in vitro* contra la Sigatoka negra y los posibles metabolitos secundarios responsables de esta actividad están relacionados con polifenoles, coumarinas, quinonas, saponinas, triterpenos y/o flavonoides. Así mismo, los extractos de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) mostraron actividad *in vitro* contra *M. fijiensis* [6, 7].

Más aún, Riveros y Arciniegas [8] analizaron el efecto de 20 extractos etanólicos sobre el crecimiento y desarrollo de las ascosporas y colonias de *M. fijiensis* y encontraron que los más potentes fueron los de *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia* sp., *Plenax* sp., *Piper hispidum*, *Piper peltatum*, *Sida rhombifolia* y *Syzygium aromaticum*. De estos, el extracto que mostró la máxima actividad fue el de *S. aromaticum*.

Por ello, el GBPN continuando con la bioprospección de plantas con actividad fungicida potencial, evaluó la actividad de 42 extractos metanólicos y 42 de diclorometano pertenecientes a las familias Annonaceae,

Apiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Clusiaceae, Costaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae y Urticaceae, recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) (Risaralda, Colombia) sobre la elongación del tubo germinativo y crecimiento radial de *M. fijiensis*. Se pretende desarrollar una metodología segura y eficiente para el control efectivo de este hongo, que permita la protección de los cultivos de plátano y banano, contribuyendo a un mejor bienestar de los cultivadores y propendiendo por una agricultura orgánica sostenible.

2. SECCION EXPERIMENTAL

2.1. Extracción del material vegetal

De cada una de las 42 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) se tomaron 300 g de material vegetal seco y molido, los cuales fueron sometidos a extracción por maceración por 48 horas y por triplicado sucesivamente con *n*-hexano, diclorometano y metanol; los extractos correspondientes se concentraron a 45°C y se almacenaron a -10°C hasta su utilización en la marcha fitoquímica [9] y en los bioensayos con el hongo *M. fijiensis*.

2.2. Marcha fitoquímica realizada a los extractos crudos de diclorometano y metanol

Los diferentes extractos crudos fueron caracterizados a través de una marcha fitoquímica realizada por cromatografía de placa delgada (CCD), para detectar los diferentes núcleos fitoquímicos [10].

2.3. Determinación de la actividad fungicida *in vitro* de extractos vegetales contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

2.3.1. Medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas

Para evaluar la acción antifúngica de los extractos de diclorometano y metanol por medio de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas, se recolectó material vegetal infectado con SN, en los estadios 5 a 6 de la enfermedad [11]. La recolección del material afectado, se realizó después de 2-3 días sin llover para asegurar la presencia de inóculo en el tejido. Dicho material fue grapado a discos de papel Kraft y envuelto en toallas húmedas para realizar una cámara húmeda. Este material se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente.

Después del periodo de incubación, los discos se sacaron de la cámara húmeda y se sumergieron en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente, se realizó la descarga de las ascosporas en cajas de Petri con agar al 2%,

suplementado con el extracto a 1000 mg/L durante una hora. Finalizada la descarga, los discos fueron retirados y las cajas se incubaron a 26°C por 24 horas. Luego del periodo de incubación se revisaron las cajas con ayuda de un microscopio bajo aumento de 10x y se localizaron tres campos diferentes repartidos en dos cajas. Se realizó el recuento de 50 ascosporas por cada campo y se determinó el porcentaje de ascosporas como: Germinación normal (GN), Germinación corta (GC), Germinación deforme (GD) y No germinado (NG) [12].

2.3.2. Medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*

Para evaluar la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis* de los extractos de diclorometano y metanol, se obtuvo inicialmente un cultivo monospórico, de manera similar al ensayo anterior y partiendo de la captura de una sola espora que se sembró en agar PDA en cuña durante 14 días bajo luz continua. Finalizado este tiempo, se tomó el hongo resultante del cultivo monospórico, se preparó una solución de la cual 100µL fueron sembrados por superficie en agar PDA suplementado con el extracto a analizar y contenidos en cajas de Petri. Las cajas se incubaron a 26°C durante 20 días, y se realizaron lecturas del crecimiento radial de los hongos a los días 7, 9, 12, 15 y 20 del periodo de incubación [13].

En ambos ensayos el control positivo fue Benlate a 1 mg/L y el control negativo fue etanol al 1%. Todos los experimentos se repitieron dos veces.

2.3.3. Análisis de datos

Todos los ensayos se realizaron mediante un diseño aleatorio completamente independiente; los datos de los ensayos de elongación del tubo germinativo de las ascosporas (Fase sexual) fueron evaluados por el método estadístico de conglomerados; mientras que los datos del ensayo de medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis* (Fase asexual) fueron analizados a través de análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,5$). En ambos análisis se utilizó el software Infostat (2007d.3).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan las plantas recolectadas por GB-PN en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU, Pereira-Colombia).

En la figura 1 se presentan los extractos metanólicos que presentaron la mayor actividad en el ensayo de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas, y en la cual se observa que los pertenecientes a las familias Passifloraceae *Passiflora apoda* (UTP-141), *Passiflora antioquiensis* (UTP-152); *Arracacia elata* (UTP-153, Apiaceae); Clusiaceae *Clusia* sp (UTP-155), *Clusia multiflora* (UTP-157), *Tovomita guianensis*

(UTP-159), *Chrysoclamys floribunda* (UTP-180) y Melastomataceae *Topobea cf discolor* (UTP-160) presentaron germinación corta de los tubos de las ascosporas, con un porcentaje de inhibición entre el 89% y 96%. Mientras que los extractos de *Spium stylare* (UTP-7, Euphorbiaceae) y *Tibouchina lepidota* (UTP-185, Melastomataceae) presentaron un porcentaje de inhibición del 79% y 74%, respectivamente con germinación deforme sobre las ascosporas como se muestra en la figura 1.

Tabla 1 Plantas recolectadas en el PRNU

Familia	Nombre	Voucher	
		FJR	No UTP
Annonaceae	<i>Guatteria petiolata</i>	4052	198
Apiaceae	<i>Arracacia elata</i>	4001	153
Apocynaceae	<i>Mandevilla veraguensis</i>	4054	200
Asclepiadaceae	<i>Blepharodon grandifolium</i>	4055	201
	<i>Blepharodon bifidus</i>	3999	151
Asteraceae	<i>Mikania leiostachya</i>	3175	22
	<i>Mikania leiostachya</i>	3176	27
	<i>Jungia coarctata</i>	3195	41
	<i>Liabum asclepiadeum</i>	3720	57
	<i>Munozia senecionidis</i>	3721	58
	<i>Montanoa sp</i>	3749	80
	<i>Munozia hastifolia</i>	4044	190
	<i>Clibadium asperum</i>	4045	191
	<i>Calea angosturana</i>	4046	192
	<i>Lepidaploa lehmannii</i>	4047	193
	<i>Critoniella acuminata</i>	4049	195
Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp	4004	155
	<i>Clusia multiflora</i>	4006	157
	<i>Tovomita guianensis</i>	4008	159
	<i>Vismia laevis</i>	4039	184
	<i>Chrysoclamys floribunda</i>	4035	180
Costaceae	<i>Costus sp</i>	4029	187
Euphorbiaceae	<i>Sapium stylare</i>	3160	7
	<i>Phyllanthus sp</i>	3715	52
	<i>Tetrorchidium andinum</i>	3927	106
	<i>Acalypha macrostachya</i>	4050	196
	<i>Alchornea grandis</i>	4056	202
Lamiaceae	<i>Salvia scutellarioides</i>	4041	186
Malvaceae	<i>Pavonea sepioides</i>	4036	181
Melastomataceae	<i>Miconia lehmannii</i>	3172	19
	<i>Miconia</i> sp	3739	73
	<i>Miconia</i> sp	3741	74
	<i>Topobea cf discolor</i>	4009	160

	<i>Tibouchina lepidota</i>	4040	185
Moraceae	<i>Ficus andicola</i>	4020	166
Passifloraceae	<i>Passiflora apoda</i>	3988	141
	<i>Passiflora antioquiensis</i>	4000	152
	<i>Passiflora danielii</i>	4037	182
	<i>Passiflora rubra</i>	4038	183
Urticaceae	<i>Boehmeria bullata</i>	3989	142
	<i>Phenax uliginosus</i>	3990	143
	<i>Urera ballotaefolia</i>	3998	150

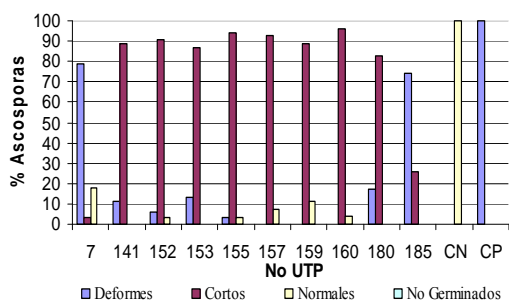


Figura 1 Extractos metanólicos con actividad antifúngica contra *M. fijiensis* (Fase sexual)

Los extractos de diclorometano que inhibieron la elongación del tubo germinativo de las ascosporas fueron las especies *Phenax rubra* (UTP-143, Urticaceae) y de la familia Passifloraceae *Passiflora antioquiensis* (UTP-152), *Passiflora danielii* (UTP-182) y *Passiflora rubra* (UTP-183) con deformes, como se presenta en la figura 2. Más aún, las especies *Ficus andicola* (UTP-166, Moraceae), *Vismia laevis* (UTP-184, Clusiaceae), *Lepidaploa lehmannii* (UTP-193, Asteraceae), *Acalypha macrostachya* (UTP-196, Euphorbiaceae), tuvieron un efecto superior al 60%.

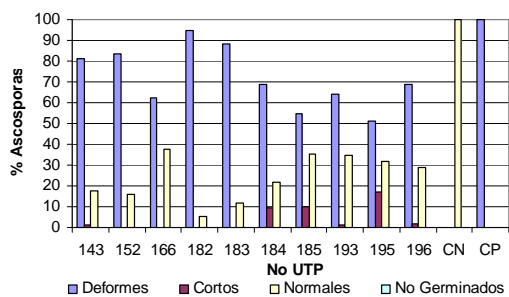


Figura 2 Extractos de diclorometano con actividad antifúngica contra *M. fijiensis*.

El efecto inhibitorio presentado por estas especies es similar al presentado por Benlate® (1%) utilizado como control positivo en estos experimentos. Por lo tanto, se

pueden considerar como agentes antifúngicos potenciales.

Según el cribado fitoquímico (Datos no mostrados) se determinó que en los extractos analizados hay presencia de alcaloides, esteroides y triterpenos, fenoles, flavonoides y taninos, a los cuales se les puede atribuir la acción antifúngica sobre *M. fijiensis*.

Con relación al ensayo de medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*, los resultados permitieron determinar que los extractos metanólicos más activos frente a la fase asexual del hongo fueron *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) y *Phyllanthus sp* (UTP-52, Euphorbiaceae), puesto que dichos extractos no permitieron el crecimiento del hongo y actuaron de forma similar al control positivo Benlate a 1mg/L (Ver figura 3).

Según la marcha fitoquímica, en estos extractos se detectó la presencia de alcaloides, esteroides y triterpenos, saponinas, flavonoides, fenoles y taninos, metabolitos secundarios a los cuales se les puede atribuir el comportamiento antifúngico de los extractos sobre el hongo fitopatígeno, en su fase de reproducción asexual.

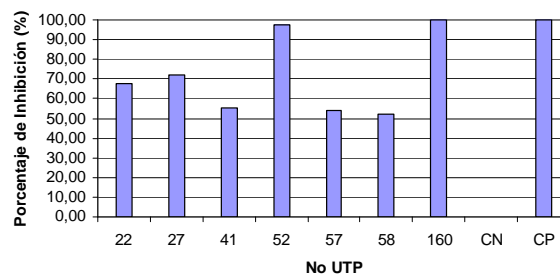


Figura 3 Efectos de los extractos metanólicos sobre el crecimiento radial del hongo *M. fijiensis*

En la figura 4 se muestran los extractos de diclorometano que presentaron un efecto inhibitorio superior al 50 % del crecimiento radial del hongo, como se puede observar no existen diferencias estadísticas entre ellos.

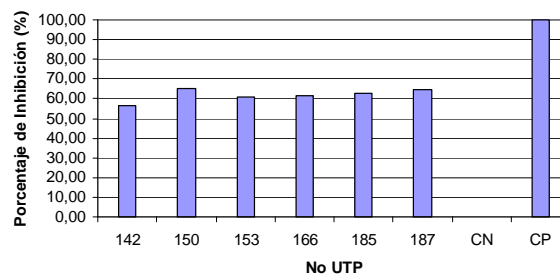


Figura 4 Extractos de diclorometano con actividad antifúngica contra *M. fijiensis* (Fase asexual)

Como se observa en la figura 4, los extractos de diclorometano más activos fueron los *Ureara ballotaefolia* (UTP-150, Urticaceae) y el de *Costus* sp (UTP-187, Costaceae).

Es de destacar que el extracto metanólico de *Topobea cf discolor* (UTP-160) fue la especie más potente al inhibir el crecimiento de *M. fijiensis* tanto en la fase sexual como en la asexual. En consecuencia, esta especie vegetal se podría considerar como un buen agente para el control de la Sigatoka negra. Este hallazgo, reafirma la riqueza en metabolitos secundarios de la familia Melastomataceae como agentes antifúngicos.

Basados en los resultados obtenidos para ambos ensayos, se puede concluir que estos extractos podrían implementarse como medidas de control de la Sigatoka negra a través de la obtención de un biopreparado o de los metabolitos secundarios aislados presentes en los mismos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) y al Centro de Investigaciones y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) por el apoyo financiero.

BILBIOGRAFIA

[1] R.A. Fullerton. "Sigatoka leaf disease. In compendium of tropical fruit disease". (Ploetz R. C et al., eds). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 12-14 p. (1994).

[2] R.A. Fullerton and R.H. Stover. "Sigatoka leaf spot diseases of bananas". Proceedings of an international workshop. INIBAP. San José, Costa Rica. 374 p. (1990).

[3] R.H. Stover. "Sigatoka leaf spot of bananas and plantains". Plant Disease 64:750-755. (1980).

[4] R. Chica, M. Herrera, I. Jiménez, S. Lizcano, J. A.. Montoya and L.F. Patiño. "Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia". p. 53-62. Memorias XVI Reunión Internacional Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Bananos en el Caribe y la América Latina (ACORBAT), Oaxaca, México. Sep 26-oct 01 de 2004.

[5] X. Mourichon, J. Carlier and E. Fouré "Sigatoka leaf spot diseases": In collaboration with the Promusa, Sigatoka working group I. Musa Disease Fact Sheet N° 8. (1997).

[6] G.P. Osorio-Salamanca. "Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano". Tesis. (2006). CATIE. Costa Rica. 72 p.

[7] D.N. Polanco, A.S. Riveros and M.Guzman. "Uso de productos botánicos para el control de la Sigatoka negra en banano: una tecnología limpia". En: Memorias (Eds. GTZ & CANIAN). Congreso Latinoamericano de Bioplaguicidas y Abonos Orgánicos. Impreso en medio magnético. San José de Costa Rica. 28-30 de octubre, 2004.

[8] A.S. Riveros and A.M. Arciniegas. "Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra" En: G. Rivas y F. Rosales, editores. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos *Actas del Taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas", celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11- 13 de agosto, 2003*. Inibap. 31-32.

[9] J. Niño, Y.M. Correa and O.M. Mosquera. "Antibacterial, antifungal, and cytotoxic Activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity". *Pharmaceutical Biology*. 44: 1-5. (2006).

[10] H. Wagner and S. Bladt. "Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas". 2^a Edition Springer-Verlag, Berlin, Germany. (1996).

[11] S. Belalcázar "El cultivo de plátano en el tropico". Manual de Asistencia Técnica No 50. ICA-CIID-Comité Departamental de Cafeteros del Quindío-INIBAP-LAC. 376 p. (1991).

[12] Du Pont. "Black and Yellow sigatokas: Improved identification and management techniques". Florida. U.S.: Du Pont Latin America, Coral Gables. 17 p. (1983).

[13] J.E. Peláez, L.E. Vásquez, T.J. Díaz, D.A. Castañeda, E. Rodríguez and R.E. Arango. "Use of microtitre plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet". *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 59: 3425-3433. (2006).