



Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum sp* agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol

Laboratory evaluation of the effect of seven plant extracts for the control of Colletotrichum sp, causal agent of anthracnose on tomato growing tree.

Christian Andrei Chacin Zambrano¹, Mary Lady Blanco Medina², Sonia Cecilia Sanchez Gonzolez³, Carlos Acevedo Isidro⁴

RESUMEN

Se evaluó a nivel de laboratorio el efecto de 7 extractos vegetales de hojas y frutos de Neem (*Azadirachta indica*), hojas de limoncillo (*Swinglea glutinosa*), hojas de papaya (*Carica papaya*), hojas de pringamosa (*Urtica dioica*), hojas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis Dehn*), frutos de ajo (*Allium sativum L.*) y frutos de ají (*Capsicum annum*), en el control del hongo *Colletotrichum sp* agente causal de la antracnosis en el cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). El patógeno fue aislado en medio PDA a partir de frutos de tomate de árbol, los extractos se obtuvieron mediante el picado y el licuado del material vegetal, se depositaron en baldes plásticos, se les agregó agua en proporción 2.5:1 (agua: muestra procesada, vol.: peso), se sometieron a fermentación por 24 horas. El producto se filtró utilizando gasa esterilizada y se envasaron para su posterior evaluación. Las concentraciones de los tratamientos que se trabajaron fueron de 25, 50, 75 y 100% sobre el agente infeccioso, determinando el grado de inhibición del patógeno en las cajas de Petri. Los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de las hojas de eucalipto, ya que su efecto fue del 100% en todas las concentraciones, sin dejar de lado los frutos del Neem y del ajo con porcentajes de inhibición del 75 y 60% respectivamente, presentaron un comportamiento directamente proporcional a las concentraciones utilizadas, ya que a mayor cantidad de extracto el efecto inhibitorio fue mejor en este caso a 75% y 100%.

Palabras clave: Extractos vegetales, patógeno, antracnosis, inhibición.

ABSTRACT

Was evaluated in the laboratory the effect of seven plant extracts of Neem leaves and fruit (*Azadirachta indica*) leaves of lemon grass (*Swinglea glutinosa*), leaves of papaya (*Carica papaya*), Pringamosa leaves (*Urtica dioica*), eucalyptus leaves (*Eucalyptus camaldulensis Dehn*) fruits of garlic (*Allium sativum L.*) and fruits of pepper (*Capsicum annum*) in the control of the fungus *Colletotrichum sp* causal agent of anthracnose in tomato crop tree (*Cyphomandra betacea*). The pathogen was isolated on PDA medium from tomato fruit tree, the extracts were obtained taking into account the process by (Marin, et. Al 2007), which consists of chopping and blending plant material deposited in plastic bucket, add water ratio 2.5:1 (water: sample processed, vol.: w), subjecting to fermentation for 24 hours. The product was filtered using sterile gauze and package them for further evaluation. The concentrations of the treatments that worked were 25, 50, 75 and 100% of the infectious agent, determining the degree of inhibition of the pathogen in Petri dishes. The best results were obtained with the application of eucalyptus leaves, since its effect was 100% at all concentrations, without neglecting the fruits of the Neem and garlic with inhibition percentages of 75 and 60% respectively, had a behavior directly proportional to the concentrations used, since the greater the amount of extract the inhibitory effect was better in this case 75% and 100%.

Key words: Plant extracts, pathogen, anthracnose, inhibition.

INTRODUCCION

La antracnosis es una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum sp.* Se encuentra afectando frutales de gran importancia económica en el país entre ellos el tomate de árbol que ha tenido gran acogida y aceptación en el consumo nacional, considerándose con un gran potencial para la exportación¹. La Antracnosis ha limitado la producción de la fruta por el incremento en los costos de producción y las pérdidas presentadas en postcosecha por el daño en la calidad de la fruta. Dicha enfermedad afecta tanto en precosecha como en postcosecha, y puede llegar a ocasionar pérdidas superiores al 90% en este cultivo sin que se cuente con un método adecuado para su manejo, pues se ha fundamentado en aplicaciones frecuentes de fungicidas, especialmente en las etapas de floración y fructificación¹.

La utilización masiva de insecticidas convencionales, y especialmente plaguicidas de amplio espectro, es costosa y trae consecuencias colaterales secundarias, como desarrollo de la resistencia de las plagas, contaminación ambiental, residuos tóxicos en el producto cosechado, aparición de nuevas plagas, eliminación de la entomofauna benéfica e intoxicación del operador². Todos estos problemas plantean el reto de desarrollar como principal objetivo del proyecto nuevas alternativas viables y seguras, como la utilización de extractos vegetales, para evitar el empleo excesivo de los productos químicos sintéticos para el control de enfermedades del cultivo de tomate de árbol. La utilización de extractos vegetales tiene la ventaja de no provocar contaminación, debido a que estas sustancias son degradadas rápidamente en el medio². La presente investigación busco desarrollar un manejo adecuado de la antracnosis, con el fin de mejorar la productividad del cultivo, la condición social y económica de los productores y de proteger el medio ambiente de la contaminación y el deterioro continuado por el uso excesivo y exclusivo de fungicidas para su control.

Materiales y métodos

Aislamiento de *Colletotrichum sp* a partir de frutos de tomate de árbol con signos de la enfermedad. Los aislamientos se obtuvieron a partir de frutos infectados de tomate de árbol con síntomas característicos de la enfermedad de la antracnosis, en los cultivos de tomate de árbol ubicados en la vereda Chíchira del Municipio de Pamplona, departamento Norte de Santander. Los frutos se lavaron con agua y jabón y se secaron con una toalla de papel absorbente estéril, se sumergió durante 2 minutos en hipoclorito de sodio a una concentración de 3%. Transcurrido el periodo de desinfección, se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril por 3 minutos más. Luego se pasan por alcohol al 70% durante 2 minutos y se enjuagan con agua destilada estéril por 3 minutos, secándose con toallas de papel absorbentes estériles. Las muestras de algunos frutos de tomates de árbol previamente desinfectados fueron sembrados directamente en Papa Dextrosa Agar (PDA) otros se colocaron en cámara húmeda y se dejaron en incubación a temperatura ambiente por 4 días. El tejido de interés se obtuvo cortando fragmentos de tejido infectado y sano de aproximadamente 5x5 mm. Para luego ser sembraron en agar (PDA), a 25 ±2 °C durante 5 días hasta observar las colonias del hongo.

Caracterización morfológica del hongo mediante observación macroscópica y microscópica. La observación macroscópica se realizó mediante observación directa de la cepa sobre una superficie blanca y la observación microscópica utilizando la técnica de tinción simple con azul de lactofenol y con las ayuda de claves taxonómicas.

Prueba de patogenicidad. Se escogieron frutos de tomate de árbol sanos, maduros y de consistencia firme, después de desinfectados se realizaron 4 heridas en la cual se inocularon cuadrantes de agar de 5x5 con el crecimiento del patógeno extraído de colonia de 7 días de crecimiento

en agar PDA se inocularon a las heridas realizadas al fruto, y se colocaran en cámara húmeda a temperatura 25 ±2 °C durante 8 días.

Preparación de los extractos vegetales. Se realizó un proceso de desinfección a las hojas y frutos con hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto, luego se realizaron 3 enjuagues sucesivos con agua destilada, y se les aplico alcohol al 70% por 1 minuto y se les realizaron enjuagues sucesivos con agua destilada estéril, se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para la preparación de estos extractos se tiene en cuenta el proceso de elaboración realizado por Marín, 2007³, el cual consistió en picar y licuar durante 3 minutos el material vegetal, luego se deposito en baldes plásticos con tapa, a cada balde se le agrega agua en proporción 2.5:1 (agua: muestra procesada, vol.: peso), en este caso para hojas pesamos 500g y se utilizaron 2,5 litros de agua y en frutos la proporción fue de 400g en 1 litro de agua, luego se sometieron a fermentación por 24 horas, se procedió a filtrar utilizando 4 capaz de gasa esterilizada y se envasaron para su posterior evaluación en el laboratorio. Las concentraciones de los tratamientos a trabajar serán de 25, 50, 75 y 100%.

Evaluación de los siete extractos vegetales sobre la inhibición del patógeno. Se aplicaron las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, se determinó el grado de inhibición del patógeno en las cajas de petri y para lo cual se utilizó un modelo estadístico completamente al azar de 7 tratamientos con 6 repeticiones y 126 unidades experimentales. La cantidad preparada fue 120 ml utilizados para las 6 repeticiones de cada concentración además de un testigo por tratamiento utilizado.

Luego se procedió a realizar la siembra del hongo *Colletotrichum sp.*, el cual se realizó tomando un cuadrante del

hongo de aproximadamente 5 x 5 mm el cual se sembró en el centro de las cajas. Para evaluar el crecimiento del hongo se utilizó un pie de rey con el cual se tomaron medidas del radio de crecimiento del hongo, a partir de este resultado se obtuvo el porcentaje de inhibición teniendo en cuenta el crecimiento del testigo a partir de la siguiente fórmula utilizada por Rondón, 2006)⁴.

Resultados y Discusión

Aislamiento de *Colletotrichum sp* a partir de frutos de tomate de árbol con signos de la enfermedad. El crecimiento de los aislamientos en PDA se presentó en forma radial; con aspecto micelial algodonoso, el color predominante fue el gris, el micelio es raso blanco en sus bordes, que con el tiempo se torna grisáceo en algunas se presentó coloración salmón- naranja Su desarrollo completo se alcanza en 17 días a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Caracterización morfológica del hongo mediante observación macroscópica y microscópica. El análisis microscópico se observó, conidias largas, hialinas, cilíndricas con extremos puntiagudos, las mismas fueron identificadas utilizando la clave de Barnett y Hunter, 1986⁵. Figura 1.

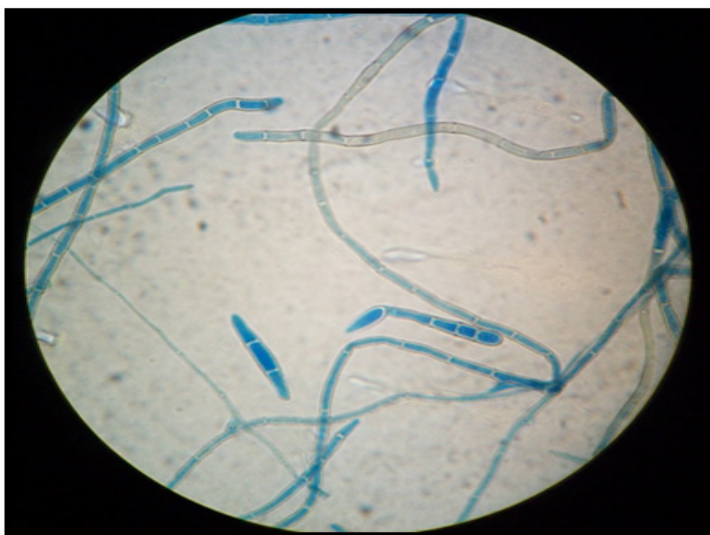


Figura 1. Estructuras microscópicas de *Colletotrichum sp*. Fuente de la imagen: Autores del texto.

Prueba de patogenicidad. Los frutos inoculados mostraron la sintomatología de la antracnosis en los lugares donde se les hicieron las heridas, los primeros síntomas se identificaron como puntos necróticos pequeños y superficiales de color café a negro, que posteriormente ocasiono un hundimiento suave demostrando la colonización del tejido por parte del patógeno tal como se puede apreciar en la figura. El posterior re-aislamiento del patógeno a partir de los frutos con los síntomas confirmó la presencia del mismo. Figura 2.



Figura 2. Fruto después de inoculado el micelio del patógeno con la sintomatología característica de la antracnosis. Fuente de la imagen: Autores del texto.

Preparación de los extractos vegetales. Se estableció las concentraciones de los extractos vegetales teniendo en cuenta la tabla 1:

Tabla 1. Concentración de los extractos. Fuente: Autores

Concentración (%)	Cantidad de extracto en mL	Cantidad de agua en mL	Cantidad de PDA en gramos
25%	30	90	4.68
50%	60	60	4.68
75%	90	30	4.68
100%	120	0	4.68

Evaluación de la inhibición de cada uno de los extractos:

En la figura 3 se observa que los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de las hojas de eucalipto, ya que su efecto fue del 100 %, sin dejar de lado los frutos del Neem y del ajo con porcentajes de inhibición del 75 y 60 % respectivamente, mientras que los demás extractos no presentan efectos positivos de inhibición en el crecimiento del hongo *Colletotrichum sp.*, especialmente en aquellos donde se utilizan hojas de papaya, hojas de Neem y hojas de pringamoza, por el contrario fueron los que estimularon el crecimiento micelial del hongo, esto puede deberse a que los hongos pueden liberar una gran cantidad de enzimas que les permitirían degradar los compuestos tóxicos, y usarlos en alguna parte de su metabolismo.

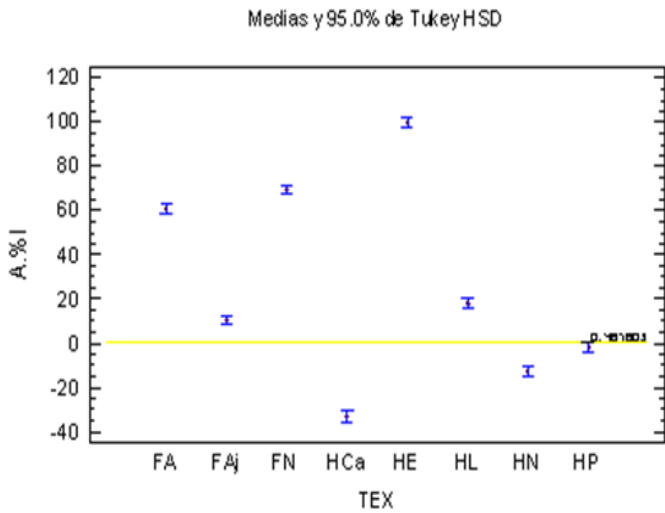


Figura 3. Análisis de medias tipo de extracto vs % inhibición según el test de medias de Tukey 95%.

FA: Frutos de Ajo, FAJ: Frutos de Ají, FN: Frutos de Neem, HCA: Hojas de Papaya, HE: Hojas de Eucalipto, HL: Hojas de Limoncillo, HN: Hojas de Neem, HP: Hojas de Pringamza. Fuente de la imagen: Autores del texto.

Según referentes teóricos se han descrito más de 30 taninos que son un grupo de sustancias fenólicas poliméricas, que pueden inhibir hongos y bacterias como el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*)⁶. En el caso de este proyecto pudimos comprobar la eficacia del eucalipto pues en todas las concentraciones inhibió el crecimiento de *Colletotrichum sp* formando halos de inhibición. El Neem está compuesto por una mezcla de principios activos entre los cuales se destacan por su gran concentración en las semillas las azadiractinas, meliantriol, salannim y nimbin con posibles actividades antimicóticas. En el fruto del Neem es donde se encuentran la mayor concentración los aceites esenciales de este árbol, esto lo pudimos comprobar pues actuaron las semillas en la inhibición del hongo y las hojas de este extracto no fueron efectivas.

El ajo (*Allium sativum L*) posee productos azufrados como alicina, alina, cicloide, de alicina y disulfuro de dialil con propiedades repelentes, esto le da características que hacen que se pueda utilizar como repelente de áfidos, también previene el ataque de hongos y actúa como bactericida y fungicida. La alicina (S-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1- sulfino) representa típicamente el 70% de los compuestos sulfurados presentes en ajo fresco, siendo así el tiosulfonato de mayor abundancia en la planta. Este es un compuesto que se forma a través de la interacción de su precursor (aliina) con la enzima aliinasa.

La aliinasa constituye el 0.24 % del peso global de la parte comestible del vegetal, se encuentra confinado en las vacuolas celulares y es el componente “madre” (farmacológicamente inactivo e inodoro) del cual se deriva la sustancia activa. La enzima aliinasa se encuentra en el citoplasma,

de manera que el sustrato sólo tiene acceso a los precursores cuando se rompe el tejido (al ser machacado o cortado) provocando la formación de alicina acompañada del olor característico el ajo. El ajo fresco tiene alrededor del 62 - 64 % de humedad; sus sólidos secos están formados principalmente por polisacáridos (80%) y proteínas azufradas (14-16%)⁷.

La figura 4 se observa una relación directamente proporcional entre la concentración aplicada y la inhibición presentada, ya que a lo largo del trabajo se utilizaron concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % para los diferentes extractos evaluados con resultados favorables para los de 75 y 100%, esto debido a que los extractos con mayor cantidad de tratamiento tuvieron efectos más significativos en la inhibición del hongo *Colletotrichum sp*.

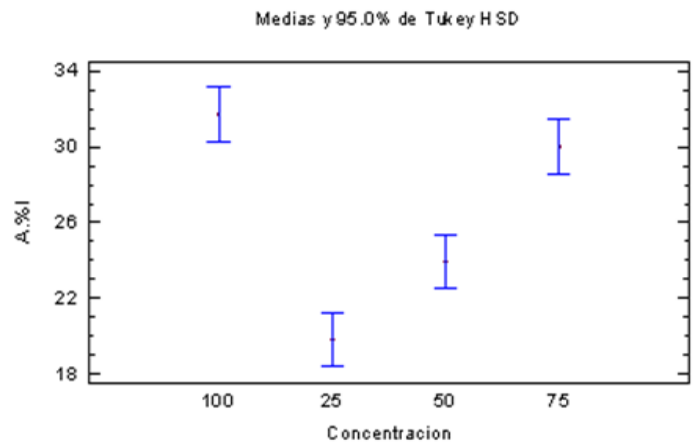


Figura 4. Análisis de medias concentración del extracto vs % inhibición según el test de medias de Tukey 95%. Fuente de la imagen: Autores del texto.

La grafica 5 muestra que los extractos fueron más efectivos con el paso del tiempo, ya que se apreciaron avances al día 17 y se logró identificar los extractos que alcanzaron a inhibir el crecimiento del hongo *colletotrichum sp*, con respecto al testigo.

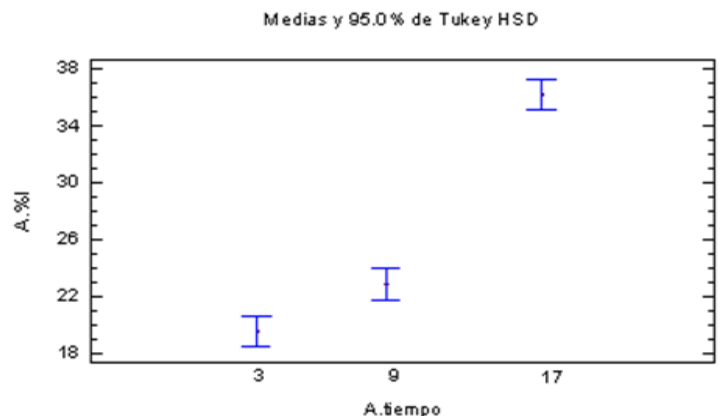


Figura 5. Análisis de medias tiempo vs % inhibición según el test de medias de Tukey 95%. Fuente de la imagen: Autores del texto.

Análisis de interacciones:

En esta etapa se analizó la interacción de las diferentes variables que intervienen en la escogencia de los mejores tratamientos en la inhibición del hongo *Colletotrichum sp.*, como son el tiempo, concentración y tipo de extracto.

Tiempo: se analizó cual extracto presenta mayor grado de inhibición del hongo *Colletotrichum sp.*, a través del tiempo.

El gráfico 6 se observa claramente que el mejor extracto fue el realizado con las hojas de eucalipto, ya que en el día 3, 9 y 17, el porcentaje de inhibición era del 100 %. Los extractos realizados con los frutos del Neem y del ajo, presentaron altos niveles de inhibición en los tres puntos de análisis llegando a sus niveles máximos a los 17 días con porcentajes de 75 y 60 % respectivamente.

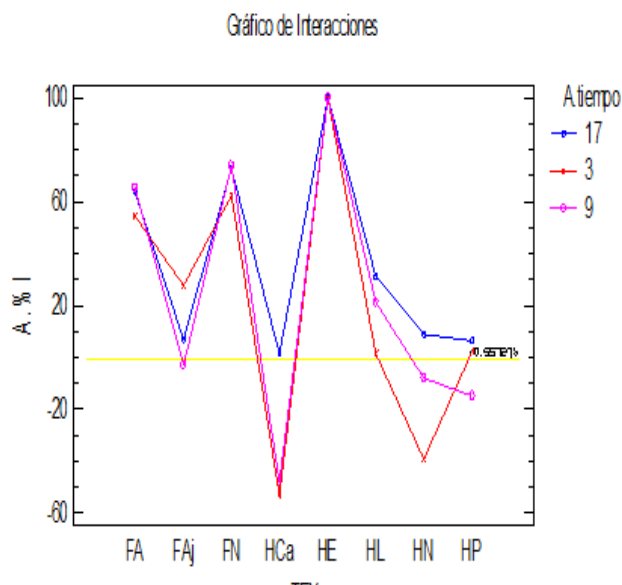


Figura 6. Interacción tiempo vs % Inhibición. Fuente de la imagen: Autores del texto.

También es claro identificar los extractos que a lo largo de los 17 días no representan ningún tipo de efecto en la inhibición de este hongo, como es el caso de las hojas de papaya, hojas de Neem, hojas de pringamoza, y hojas de limoncillo.

Concentración: se analizó el comportamiento de las concentraciones utilizadas en relación al grado de inhibición en el máximo tiempo de estudio permitido por el testigo.

El grafica 7 se observa que las concentraciones diluidas de 25 y 50%, no representan mayor aporte en la inhibición del hongo *Colletotrichum sp.*, contrastando con los efectos positivos que se aprecian en las conc9lentraciones de 75 y 100 %.

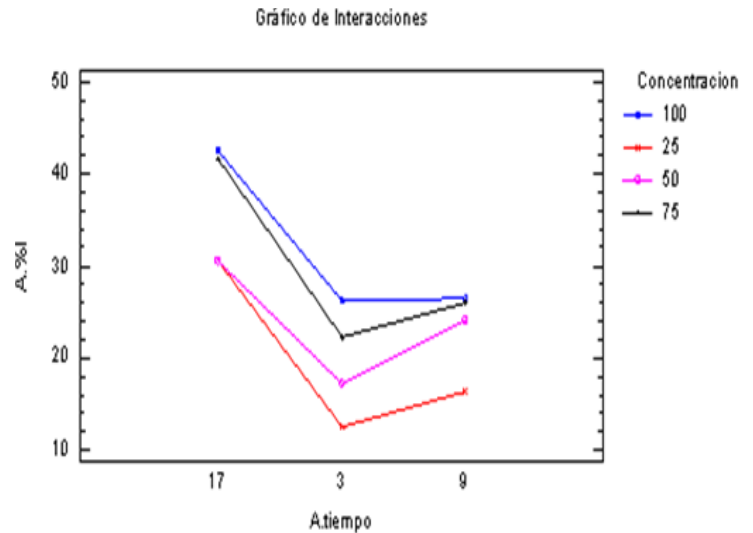


Figura 7. Interacción concentración vs tiempo. Fuente de la imagen: Autores del texto.

Extracto: Se analizó el comportamiento de los diferentes extractos en las concentraciones de 25, 50, 75, y 100 % y sus efectos en la inhibición del hongo. En la figura 8 se observa con claridad que el extracto de hojas de eucalipto inhibió completamente el crecimiento del hongo en todas las concentraciones utilizadas. El extracto a base de frutos del Neem y el realizado con frutos de ajo, presentaron un efecto bastante considerable llegando a restringir hasta el 80 % el crecimiento del hongo. De igual forma, como podemos observar que estos extractos presentaron unos comportamientos directamente proporcionales a las concentraciones utilizadas, ya que a mayor cantidad de extracto el efecto inhibitorio fue mejor.

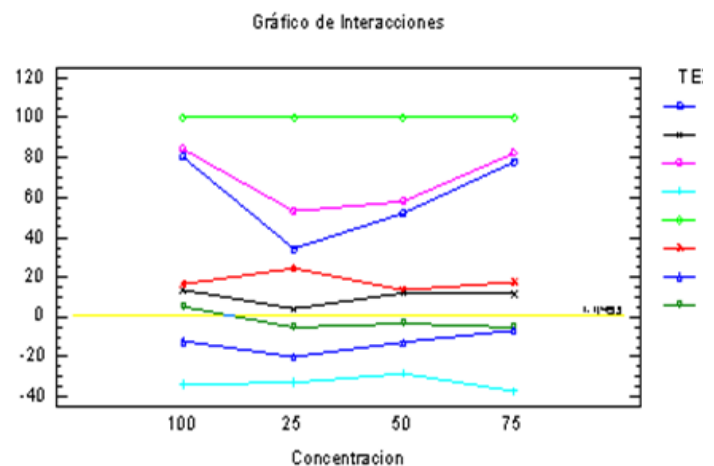


Figura 8. Interacción concentración vs % inhibición. Fuente de la imagen: Autores del texto.

AFILIACIONES

¹ Profesor Asociado Planta. Programa Microbiología Industrial. UDES. Bucaramanga. E-mail: cchacin@udes.edu.co

² Ingeniera Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta. E-mail: mary11087@hotmail.com

³ Ingeniera Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta. E-mail: soniasan87@hotmail.com

⁴ Profesor Asistente. Programa Microbiología Industrial. UDES. Bucaramanga. E-mail: timoncar@gmail.com

BIBLIOGRAFIA

1. Botero M. Estudios de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. sacc, agente causal de la antracnosis en tomate de árbol (*solanum betaceae* (cav.) sendt.). Manizales. 1999.

2. Pérez D., Iannacone J. Efectividad de Extractos Botánicos de Diez Plantas Sobre la Mortalidad y Repelencia de Larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., Insecto Plaga del

Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agricultura Técnica (Chile). 2006. 66(1):21-30.

3. Marín O. Evaluación de extractos vegetales para el control de *mycosphaerella fijiensis* en plátano en tierralta – Córdoba. Colombia. 2007.

4. Rondón O. Sanabria N. Rondón A. Respuesta in vitro a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides*, en frutos de mango. INIA, Venezuela. 2006.

5. Barnett H. and Hunter B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. MacMillan Publishing Company. USA. 1986. 218p.

6. Cruz J., Domínguez H., Parajo J. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. J Agric Food Chem. 2001. 49; 2459-2464.

7. Pezzuti A. Diseño y Simulación de la deshidratación de ajo y cebolla Tesis Doctoral en Ingeniería Química - UNS - Bahía Blanca. 1994.