

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES
SOBRE EL HONGO *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**
Determination of the antifungal activity of extracts on the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

RESUMEN

Los cultivos de plátano, banano y heliconias (Musaceae) son afectados por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causante de la enfermedad más destructiva de estos cultivos conocida como Sigatoka negra, generando pérdidas económicas considerables tanto para los grandes como los pequeños cultivadores. En el control de esta enfermedad, se emplean diversos tipos de fungicidas de origen sintético que aumentan los costos de producción, además de causar deterioro significativo al medio ambiente.

En este trabajo se evaluaron 20 extractos metanólicos y 21 extractos de diclorometano de plantas pertenecientes a las familias Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae y Solanaceae, recolectadas en la zona de reserva Bremen-La Popa (Quindío, Colombia) a través del método de elongación del tubo germinativo de las ascoporas.

Se encontró que cinco extractos metanólicos (25%) y seis de diclorometano (28.6%) presentaron actividad *in vitro* contra *Mycosphaerella fijiensis*. De acuerdo al tamizaje fitoquímico los componentes responsables de esta actividad pueden ser: alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos, entre otros.

PALABRAS CLAVES: Asclepiadaceae, Asteraceae, Bioplaguicida, Euphorbiaceae, Plátano, Rubiaceae, Sigatoka negra, Solanaceae

ABSTRACT

The plantain, banana and heliconias crops (Musaceae) are affected by the ascomicete fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet the agent that cause one of the most destructive disease for these cultivations known like black Sigatoka, generating considerable economic lost for great and small farmers. In the control of this disease diverse types of synthetic fungicides are used, but this increases the production costs, besides to cause significant deterioration to the environment.

In this work 20 methanolics and 21 dichloromethane extracts from plants belonging to the Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae and Solanaceae families collected in the Natural Reserve Bremen-La Popa (Quindío, Colombia) were evaluated, through ascospore germinative tube growth tests.

It was found that five methanolics (25%) and six of dichloromethane extracts (28,6%) displayed *in-vitro* activity against *Mycosphaerella fijiensis*. The phytochemicals responsible for this activity can be: alkaloids, steroids, phenols, flavonoids, saponins, tannins and triterpenoids.

KEY WORDS: Asclepiadaceae, Asteraceae, Bioplaguicide, Euphorbiaceae, Plantain, Rubiaceae, Black Sigatoka, Solanaceae

JAIME NIÑO O.

Lic Bgía-Qca, Ph.D.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de
Pereira
janino@utp.edu.co

JOHANA OSPINA T.

Estudiante Escuela de
Tecnología Química
johao_02@utp.edu.co

YANED M. CORREA N.

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de
Pereira
yamico@utp.edu.co

OSCAR M. MOSQUERA M.

Químico, M.Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de
Pereira
omosquer@utp.edu.co

GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA-PRODUCTOS NATURALES (GBPN).

Escuela de Tecnología
Química, Universidad
Tecnológica de Pereira,
Centro de Investigación y
Estudios en Biodiversidad y
Recursos Genéticos
(CIEBREG). La Julita,
Pereira.

El cultivo de plátano en Colombia, ha sido un sector tradicional de la economía campesina y constituye una fuente valiosa de ingresos tanto en el comercio local como internacional. La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), es la enfermedad más difundida y destructiva para los cultivos de banano y otros cultivares de musaceae. La mayoría de los plátanos y bananos cultivados extensivamente y con fines comerciales son susceptibles a esta enfermedad que causa necrosis en las hojas y pérdidas entre el 33 y el 50% en las cosechas.

El desarrollo de estrategias innovadoras dirigidas a disminuir el uso de fungicidas sintéticos convencionales, es un desafío permanente, por lo cual se estudió el efecto inhibitorio de 20 extractos metanólicos crudos y 21 de diclorometano de plantas pertenecientes a las familias Solanaceae, Asteraceae, Rubiaceae y Euphorbiaceae, recolectadas en la zona de Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Circasia, Quindío, Colombia) durante el mes de agosto del 2005. De cada planta se tomaron 300 g del material seco y molido, se sometieron a extracción por maceración sucesivamente con *n*-hexano, diclorometano y metanol, cada uno tres veces. Los extractos, fueron concentrados a presión reducida y una vez obtenidos se almacenaron a -10 °C.

Para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizó tejido foliar de plátano infectado en los estadios 5 ó 6 de la enfermedad. El tejido se incubó por 48 horas a temperatura ambiente en bolsas plásticas con sello hermético, pegado a discos de papel kraf con grapas metálicas y envuelto en papel humedecido con agua destilada (cámara húmeda).

Después del período de incubación, las muestras se sacaron de la bolsa plástica y el material se sumergió durante cinco minutos en agua destilada. Pasado este tiempo se procedió a la descarga de ascosporas en las cajas de Petri que contenían agar al 2 % suplementado (envenenado) con muestras del extracto a 1000 mg/L durante una hora.

Como control negativo se utilizó etanol absoluto al 1 % y como control positivo se empleó el fungicida Benlate a 1 mg/L. Las cajas Petri con las ascosporas se incubaron a 27 °C por 24 horas para los extractos de metanol y por 48 horas para los de diclorometano. Luego, se realizó la lectura de 150 ascosporas en tres campos de 50 ascosporas cada uno, a través de un microscopio de luz bajo un aumento de 10X.

Se determinó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos mediante la medición del tubo germinativo, determinando el porcentaje de ascosporas con germinación normal (CN), corta (GC), deforme (GD) y no geminadas, (NG). En general, un alto porcentaje de las ascosporas con GC, GD o NG, implica que el extracto tiene actividad antifúngica sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Mf).

De los extractos evaluados cinco de metanol y seis de de diclorometano tuvieron actividad sobre el hongo Mf, siendo la deformación (GD) del tubo germinativo el mayor efecto evaluado causado por estos extractos sobre las ascosporas.

Los extractos metanólicos y de diclorometano de las especies de las familias Solanaceae y Asteraceae fueron los que presentaron el mayor porcentaje (60-90%) de ascosporas con germinación deforme.

Las plantas superiores, ante el estrés externo inducen la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, los cuales les confieren resistencia para el control de hongos, bacterias y virus.

Estudios empleando extractos vegetales de 20 plantas seleccionadas mostraron que un porcentaje superior al 30% de actividad inhibitoria contra *M. fijiensis*, entre las cuales sobresalieron *Syzygium aromaticum* con mayor poder antifúngico, seguido por *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia sp.*, *Plenax sp.*, *Piper hispidum*, *Piper peltatum* y *Sida rhombifolia* and *Syzygium aromaticum*. Estos estudios han mostrado que algunos agentes protectores o inductores de resistencia por su actividad como antifúngicos, son: cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas. También, se ha determinado que algunos de estos metabolitos secundarios hacen parte del repertorio de las sustancias que sirven de defensa en las plantas, entre estos se encuentran los alcaloides, terpenoides, y fenilpropanoides. Igualmente, se conoce que algunas fitoalexinas tipo flavonoides, terpénicas y sesquiterpénicas intervienen en la protección de las plantas contra los microorganismos.

Con lo anterior y de acuerdo al tamizaje fitoquímico, los extractos de las familias Solanaceae y Asteraceae mostraron como constituyentes principales, alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos, entre otros (datos no mostrados). Posiblemente, estos compuestos pueden ser la causa de la deformación

observada en las ascosporas de *M. fijiensis*. Por lo tanto, de las 11 especies que tuvieron actividad antifúngica, las que pertenecen a estas familias, son promisorias para el posible control de la enfermedad y se debe aislar y caracterizar el o los compuestos bioactivos en dichos extractos y someterlos a ensayos *in vitro* e *in vivo*, para valorar su efectividad.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) y a la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) por la financiación del proyecto.

EVALUACION DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*, FERRARI)

Evaluation of vegetable extracts for the control of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Ferrari)

RESUMEN

Este trabajo describe la evaluación por antibiosis de la actividad antibroca de 21 extractos metanólicos de las plantas recolectadas en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Quindío). Los bioensayos se realizaron bajo condiciones controladas (23 ± 3 °C; 75 ± 5 % H.R.), utilizando como unidad experimental (UE) un tubo eppendorf al interior del cual se transfirió un grano de café pergamino impregnado del respectivo extracto a 1000 mg/L y una hembra adulta de broca. Se hicieron 90 UE por cada extracto. Cada cuatro días, por 40 días, se evaluaron dos UE de cada extracto para determinar los estados biológicos de la broca. Se encontró que algunos extractos metanólicos mostraron actividad contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari).

PALABRAS CLAVES: Bioprospección, antibiosis, bioinsecticidas.

ABSTRACT

This work describes the evaluation of the activity against the coffee berry borer of 21 methanolic extracts of plants collected in the Natural Reserve Bremen-La Popa (Quindío). The bioassays were made under controlled conditions (23 ± 3 °C; 75 ± 5 % H.R.), using like experimental unit an eppendorf with a parchment coffee impregnated with extract at 1000 mg/L and a mature female coffee berry borer inside, 90 repetitions for each extract were done. Every four days, for 40 days, to recount of the biological states of two experimental units of each extract was made, it was found that some methanolic extracts showed activity against the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Ferrari).

PASSWORDS: Bioprospecting, antibiosis, bioinsecticides

Jaime Niño O.

Lic Bgía-Qca, Ph.D
Profesor Titular Universidad
Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

Angélica M. Bustamante

Estudiante Escuela de
Tecnología Química
chemistry@utp.edu.co

Yaned M. Correa N.

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de
Pereira
yamico@utp.edu.co

Oscar M. Mosquera M.

Químico, M.Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de
Pereira
omosquer@utp.edu.co

Grupo de Biotecnología- Productos Naturales

(GBPN). Escuela de
Tecnología Química,
Universidad Tecnológica de
Pereira, Centro de
Investigación y Estudios en
Biodiversidad y Recursos
Genéticos (CIEBREG). La
Julita, Pereira.

1. INTRODUCCION

El cultivo del café (*Coffea arabica*) constituye uno de los principales rubros generadores de divisas en América Latina y particularmente en Colombia; sin embargo, diversos factores bióticos y abióticos, influyen en la producción de este cultivo. Entre los factores bióticos que han tenido gran importancia por sus implicaciones económicas y sociales se encuentran los insectos como agentes responsables de los daños causados en las plantaciones de café [1].

Se estima que la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), origina daños del orden de 500 millones de dólares en todo el mundo [2], siendo el insecto plaga de mayor importancia en las plantaciones de café. El 90%

de los frutos pueden ser atacados y esto influye en el rendimiento del cultivo y en la calidad del producto.

Para controlar la broca del café se utilizan técnicas biológicas en reemplazo de los insecticidas sintéticos, puesto que estos son costosos, altamente tóxicos y causan serios problemas a la salud de los habitantes de las zonas cafeteras, contaminación de las aguas, mortalidad en fauna y residuales en el producto final, lo cual llevaría a un problema de mercadeo del café en el ámbito internacional [3].

Para contribuir a la búsqueda de agentes biológicos en contra de la broca, se recurre a los mecanismos de resistencia que son aquellas características de la planta que hacen que el insecto le cause menores daños [4], estos mecanismos de resistencia son una herramienta

importante con lo cual se dispone para encontrar compuestos bioactivos que ayuden a reducir el daño que los insectos puedan causar en los cafetales. Se han identificado tres tipos de mecanismos, mediante los cuales las plantas se defienden del ataque de los depredadores: Antibiosis, preferencia o no preferencia (Antixenosis) y Tolerancia. La antibiosis, genera daño al insecto; por ejemplo, en un bioensayo de antibiosis la broca se alimenta del grano de café impregnado del extracto y los metabolitos secundarios contenidos en él, afectan el desarrollo y/o su ciclo reproductivo. La Antixenosis se presenta cuando las características físicas o químicas de la planta evitan que esta sea preferida por el insecto para oviposición, refugio o alimento. La Tolerancia ocurre cuando la planta mantiene elevadas poblaciones de plaga o esta afecta algunos órganos sin que se disminuya la producción [4].

2. METODOLOGIA

El material vegetal pertenece a las familias botánicas Asclepiadaceae, Asteraceae Euphorbiaceae, Rubiaceae y Solanaceae, fueron recolectadas en agosto del 2005 en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Quindío) y clasificadas por el taxónomo F. J. Roldán, un voucher de cada especie fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA, Medellín, Colombia).

El bioensayo de antibiosis se realizó en el laboratorio del Grupo Biotecnología-Productos Naturales de la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira, en un área oscura a 23 ± 3 °C, con una humedad relativa de 75 ± 5 %.

En la figura 1 se describe el proceso seguido para el tratamiento de los diferentes materiales vegetales y las etapas para obtención de los respectivos extractos utilizados en el ensayo de antibiosis.

Los ensayos se realizaron en cabina de flujo laminar siguiendo las etapas descritas en la figura 2. Se depositó en la unidad experimental (UE), un eppendorf de 2 mL un grano de café pergamino impregnado del extracto y una hembra adulta de broca del café. Los eppendorf se llevaron a un sitio oscuro, donde se controló la humedad relativa y cada 4 días se revisaron los estados biológicos de la broca, durante 40 días. Se realizó el análisis de varianza para los estados biológicos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1, se presentan las 21 plantas recolectadas en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Quindío) con la cantidad de cada uno de los extractos crudos obtenidos.

Con base en los resultados obtenidos, el 52.4% de los extractos metanólicos evaluados a través del ensayo de

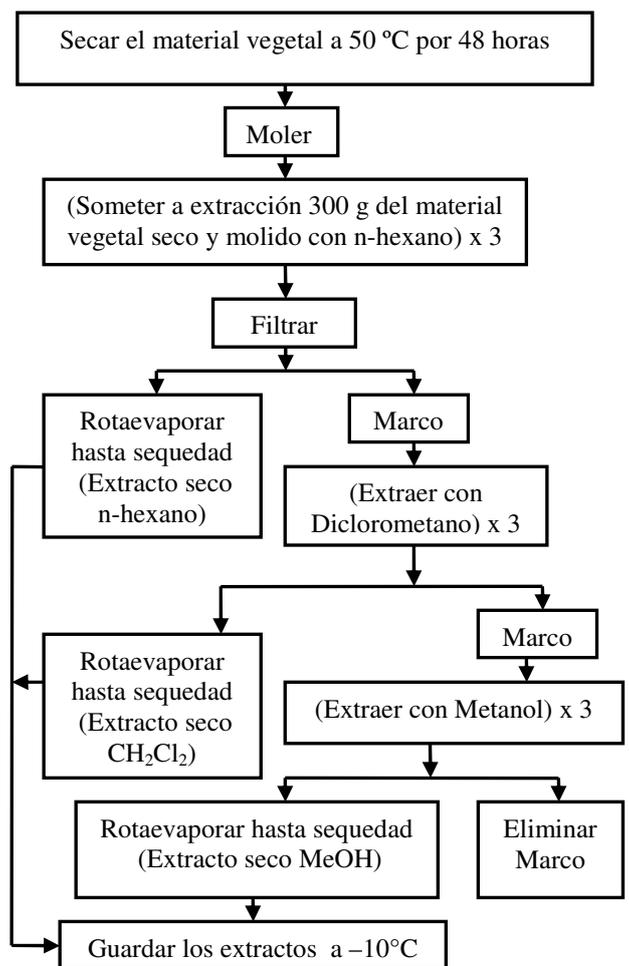


Figura 1. Proceso de extracción del material vegetal y obtención de los extractos

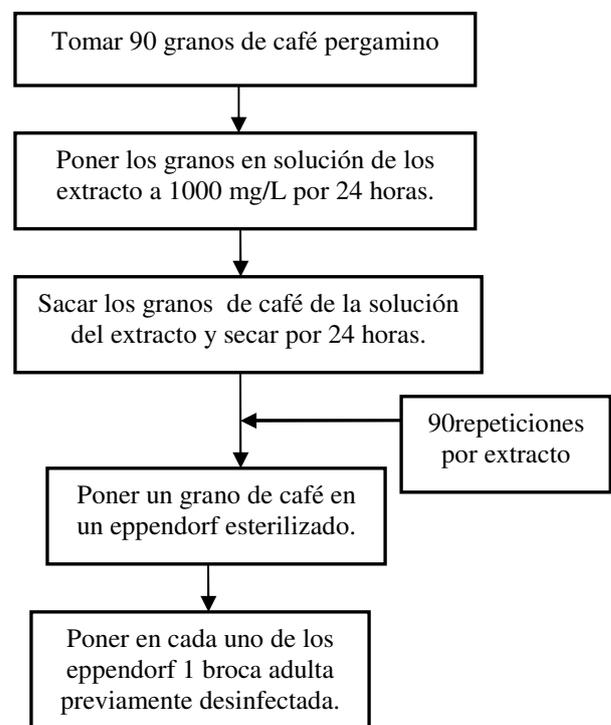


Figura 2. Proceso para evaluar por antibiosis a *Hypothenemus hampei* en café pergamino

antibiosis presentaron actividad contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), de estos el 28.6% pertenecieron a la familia Asteraceae, seguidos por los extractos de las Solanaceae y Euphorbiaceae ambos con el 9.5% y la familia Rubiaceae con el 4.8%.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los estados biológicos evaluados (huevos, larvas, adultos) y el estadio de huevos fue donde mejor se observaron las diferencias (coeficientes de correlación y variación) debidas a la acción de los extractos, lo cual permitió inferir la capacidad inhibitoria de estos sobre el desarrollo de la broca del café.

Los metabolitos secundarios detectados a través de la marcha fitoquímica (Datos no mostrados) de los extractos metanólicos fueron esteroides, triterpenos, saponinas, flavonoides, fenoles y taninos; ellos podrían ser los responsables de las actividades que estos presentaron.

4. CONCLUSION

Se encontraron once (11) extractos metanólicos con actividad inhibitoria contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), por lo tanto, se deben aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de tales actividades.

Familia	Nombre Científico	Voucher FJR	Peso Extracto (g)		
			Hexano	Diclorometano	Metanol
Apocynaceae	<i>Cynanchum sp</i>	3964	16,282	6,362	32,286
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	3981	10,064	12,797	16,331
Asteraceae	<i>Pentacalia urbanii</i>	3963	7,326	4,276	9,282
	<i>Mikania banisteriae</i>	3965	7,091	7,107	9,282
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	3966	2,984	4,972	8,270
	<i>Critoniella acuminata</i>	3968	6,463	5,757	22,907
	<i>Baccharis sp</i>	3972	7,097	7,587	10,901
	<i>Tilesia baccata</i>	3974	3,510	7,600	10,328
	<i>Mikania lloensis</i>	3977	2,720	5,973	14,375
	<i>Lepidaploa lehmannii</i>	3976	1,337	1,058	12,617
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i>	3967	4,279	5,469	22,178
	<i>Alchornea calophylla</i>	3969	6,188	3,756	24,975
	<i>Hyeronima sp</i>	3971	7,947	4,912	40,649
	<i>Alchornea grandis</i>	3982	2,227	3,159	14,058
Rubiaceae	<i>Guettarda crispiflora</i>	3973	0,900	4,823	25,891
	<i>Faramea sp</i>	3979	3,408	4,818	9,601
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	3961	11,804	9,720	11,695
	<i>Solanum trachycyphum</i>	3962	12,987	6,359	36,344
	Sin Identificar	3970	4,909	3,626	13,043
	<i>Solanum lepidotum</i>	3975	1,410	5,180	19,210
	<i>Cestrum sp</i>	3978	8,117	5,657	7,389

Tabla

1.

Extractos obtenidos de las plantas recolectadas en la Reserva Natural Bremen-La Popa

5. AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) y a la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) por la financiación al proyecto.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] ROSALES, Martín; SILVA, Ramón; RODRIGUEZ, Gladys. 1998. Estrategias para el manejo integrado del minador de la hoja y la broca del fruto del cafeto. FONAIAP N° 60.

[2] NEVES, Pedro; HIROSE, Edson. 2005. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da Broca-do-Café,

Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Neotropical Entomology 34: 77 –82.

[4] ALVAREZ, Jesús H.; CORTINA, Hernando A.; VILLEGAS, Juan F. 2001. Métodos para evaluar Antibiosis a *Hypothenemus hampei* en café bajo condiciones controladas. Cenicafé 52: 205 - 214.

[3] BUSTILLO, Alex E; CARDENAS, Reinaldo; VILLALBA, Diógenes A.; BENAVIDES, Pablo; OROZCO, Jaime; POSADA, Francisco J. 1998. Manejo Integrado de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Chinchiná, Colombia. 134 p.

