

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides* CONTRA *Colletotrichum* *gloeosporioides* CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD ANTRACNOSIS DEL CULTIVO DE ÑAME EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF
Lippia origanoides's ESSENTIAL
OIL AGAINST *Colletotrichum*
gloeosporioides CAUSATIVE OF
THE DISEASE ANTRACNOSIS
OF YAM CULTURE IN THE
DEPARTMENT OF SUCRE.

Chamorro, A. Lina 1
Chamorro, A. Leonardo 2
Pérez, C. Alexander 3

1Facultad de Educación y Ciencias, Estudiante maestría en
Biología, Grupo Bioprospección Agropecuaria, Universidad de
Sucre. linachamorro15@gmail.com
2Facultad de Educación y Ciencias, Biólogo, Grupo
Bioprospección Agropecuaria, Universidad de Sucre.
lema1906@hotmail.com
3Facultad de Ciencias Agropecuarias, Director, Grupo de
investigación en Bioprospección Agropecuaria, Universidad de
Sucre. alexander.perez@unisucra.edu.co

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar in vitro la actividad anti fúngica de aceite esencial de *Lippia origanoides* colectado a las horas 6:00 am, 12:00 pm y 18:00 pm, en el municipio de Santa Marta, Taganga -Colombia. El material vegetal colectado fue utilizado para la obtención de aceite esencial por hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), a partir de hojas frescas. Se obtuvo 3 aceites puros y se prepararon 5 concentraciones (23000, 26000, 29000, 32000 y 35000 ppm) por cada uno. Cada concentración fue utilizada para evaluación in vitro contra cepa del hongo *C.gloeosporoides*. Los resultados obtenidos muestran que la cepa mostro mayor susceptibilidad al aceite puro, seguido de la concentración de 32000 a 35000 ppm se obtuvieron los mayores porcentaje de índice anti fúngico (%I.A), actividad similar mostrada por el control positivo con Benomil al 2%.

Palabras claves: anti fúngico, *colletotrichum gloeosporoides*, fito patógeno.

Abstract

The present study had the objective to evaluate in vitro the antifungal activity of *Lippia origanoides*'s essential oil collected at 6:00 a.m., 12:00 p.m. and 18:00 p.m., in the municipality of Santa Marta, Taganga -Colombia. The plant material collected was used to the obtaining of essential oil by microwave-assisted hydro distillation (MWHD),

from fresh leaves. 3 pure oils were obtained and 5 concentrations were prepared (23000, 26000, 29000, 32000 and 35000 ppm) for each one. Each concentration was used for the in vitro evaluation against strain of the fungus *C. gloeosporoides*. The obtained results show that the strain showed greater susceptibility to pure oil, followed by the concentration of 32000 to 35000 ppm, the highest percentages of anti-fungal index (% I.A) were obtained, similar activity shown by the positive control with 2% Benomil.

Keywords: anti-fungal, *colletotrichum gloeosporioides*, phytopatogenic.

Introducción

El ñame es un tubérculo de amplia distribución, presenta especies cultivables y silvestres originarias de África, Asia, Centro y Sur América, producido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, considerado principal fuente de alimentación [1], por ser rico en proteínas, fibras y carbohidratos [2-4].

Colombia es uno de los 12 países del mundo con mayor producción de ñame en América, responsable del 22,06% situándose como el tercer productor después de Haití (23,71%) y cuba (21,54 %) [5].

La producción nacional se centra principalmente en la Costa Caribe Colombiana, por los pequeños agricultores, en los departamentos de Córdoba (8.117 ton), Sucre (18.594 ton), Bolívar (113.620 ton) y Cesar (7.382 ton) [6], los cuales son los responsables del 90% de la producción de ñame, donde se sostienen al menos 20 mil familias. Entre los problemas fitosanitarios que disminuyen el rendimiento de los cultivos de ñame se destaca la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual ha ocasionado pérdidas de productividad hasta de un 80% [7].

El control biológico de enfermedades de los cultivos se utilizan los aceites esenciales ha sido una alternativa ecológica al uso de pesticidas químicos que se adquieren en el mercado. La presencia de estos AE en las plantas constituye una eficaz barrera de defensa contra herbívoros, insectos y hongos [8], siendo una opción para erradicar el agente causal de contaminación y disminuir las pérdidas del mismo en pre y post-cosecha.

2. Metodología

2.1 Muestreo:

Las muestras de *Lippia origanoides* fueron colectadas en Colombia, departamento de Magdalena, municipio de Santa Marta Taganga a 11°16'08.9"N y 74°11'47.3"O a 39 msnm. El muestreo se llevó a cabo durante las horas 6:00 am, 12:00 pm y 6:00 pm, además se tuvo en cuenta que las plantas estuvieran en buen estado (sin daño sistémico). Posteriormente el material se preservó a 25°C, en (icopor) contenedor de poliestireno expandido [9] y se llevó al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre donde se realizó su procesamiento y las pruebas de laboratorio.

La confirmación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad de Sucre (HEUS) y conservadas hasta su procesamiento en un sitio libre de humedad.

2.2 Obtención de los aceites esenciales:

Unavez se tuvo el material en fresco, se seleccionaron y se lavaron con agua de grifo las cuales se sometieron a la extracción de los aceites utilizando método de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) propuesto por Vitola y Hernández [10]. Para ello se pesaron 250 g de cada material vegetal, y se depositaron en un balón de extracción con 250 mL de agua destilada y se sometió al proceso de arrastre con vapor empleando calentamiento, el tiempo de extracción fue de 30 minutos divididos en 3 ciclos de 10 minutos cada uno. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional (SAMSUNG AME9114ST). En todos los casos, cada aceite esencial se colectó en un recipiente tipo Dean

Stark, se separó por decantación y se almacenó en un vial ámbar de 4 mL.

2.3 Hongo:

El hongo utilizado fue aislado a partir de hojas que presentaron síntomas característicos de la enfermedad en cultivo de ñame de la variedad espino (*D. rotundata*) de cultivos en la vereda Castañeda del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia en las coordenadas 9°14'54,39"N y 75°21'59,57"O a 172 msnm. Para su identificación a nivel molecular por secuenciamiento fue enviado a la Corporación CorpoGen, en la Ciudad de Bogotá Colombia.

2.4 Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial:

Para la prueba de actividad anti fúngica se utilizó el método de siembra directa con crecimiento puro de los aislados. Se realizó siembras de cada aislado de aproximadamente 3 mm de diámetro de área de crecimiento [11], los cuales fueron inoculados sobre la superficie del agar de papa y dextrosa (APD), enriquecido con cloranfenicol, ampicilina y rifampicina, para mantener un ambiente aséptico.

La prueba de inhibición se realizó de la siguiente manera: los aislados sembrados en PDA, se les adiciono 60 µL de cada aceite puro y disuelto en Tween 20 y dimetilsulfoxido a 23000, 26000, 29000, 32000 y 35000 ppm; se utilizó un control positivo Benomil 2% (antifúngico comercial), un testigo absoluto sin ningún tipo de tratamiento y el control negativo con Tween 20 y dimetilsulfoxido (DMSO) al 0,2%.

Los ensayos se incubaron a 30°C por 7 días, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La actividad anti fúngica se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada aislado con las diferentes concentraciones, usando un calibrador Vernier (± 0.05 mm). El resultado se interpretó como porcentaje de índice anti fúngico mediante la siguiente ecuación [12]:

$$(\%) = [1 - (Da/Db) \times 100] \text{ Eq. (1)}$$

Dónde:

Da corresponde al crecimiento de cada tratamiento
Db al crecimiento del testigo absoluto.

3. Resultados

3.1 Clasificación taxonómica

La especie vegetal identificada en este estudio se clasificó como *Lippia origanoides* identificada con el código de Vaucher 000025.

3.2 Identificación molecular del hongo

Los resultados del análisis molecular realizados por la Corporación CorpoGen de la ciudad de Bogotá, la cepa objeto de estudio, mostró un 100% de identidad de su longitud con secuencias de ITS, con las almacenadas en banco genómicos mundiales correspondiendo a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.3. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los aceites esenciales

Para evaluar in vitro la actividad antifúngica de los aceites esenciales y sus respectivas concentraciones, se utilizó un testigo absoluto (cepa sin ningún tipo de tratamiento), un control negativo con Tween 20+ Dimetilsulfoxido 0,2% y un control positivo con Benomil al 2% (Figura 1). En el crecimiento micelial, se encontró un valor de 8.2 y 8.1 cm promedio, para el testigo y para el control negativo respectivamente, lo cual muestra que no existen diferencias entre los controles, hubo

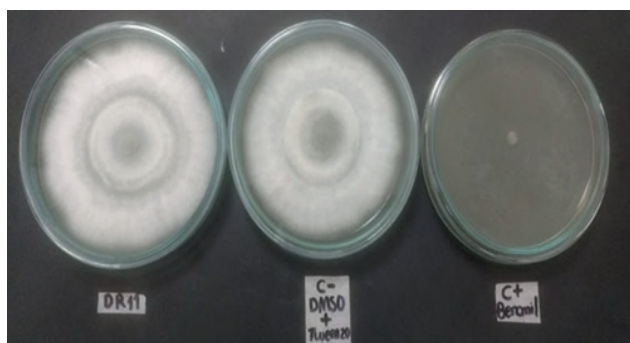


Figura 1. Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* por el aceite esencial de *Lippia origanoides*. A. Testigo absoluto. B. Control negativo (Tween 20 + Dimetilsulfoxido 0,2%). C. Control positivo (Benomil 2%). Fuente: Chamorro, 2017.

igual crecimiento con el testigo lo que indica que el DMSO (0,2%) no inhibe el crecimiento micelial del patógeno.

Para el caso del aceite esencial puro de *L. origanoides*, la cepa presentó sensibilidad al aceite, en la figura

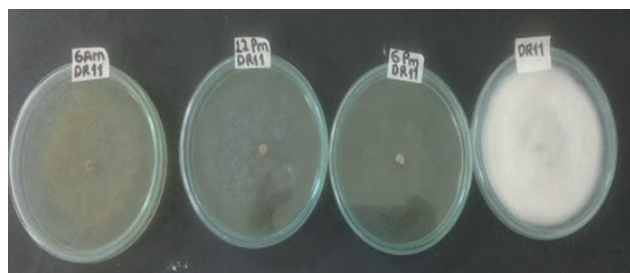


Figura 2. Inhibición de *C. gloeosporioides* por el aceite esencial de *L. origanoides*. A. AE 6:00 am B. AE 12:00 pm C. AE 6:00 pm D. Testigo absoluto. Fuente: Chamorro, 2017.

2 se puede observar que hubo inhibición de 100% del crecimiento micelial con respecto al testigo.

El análisis de varianza (Tabla 1), para la actividad anti fúngica (índice de inhibición en porcentaje) de *L. origanoides* en función a las variables horas de colecta y tratamientos. Indican que los factores analizados presentan diferencias estadísticas significativas dentro y entre ellos (p value=0.0000),

Fuentes	Suma De Cuadros	GL	Cuadro Medio	Razon-F	Valor-p
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Horas de colecta	1215.31	2	607.657	11.43	0.1002
B: Tratamiento	77250.5	5	15450.10	290.58	.0000
INTERACCIONES					
AB	2680.61	02	68.065	.04	0.0000
RESIDUOS	3828.29	72	53.1707		
TOTAL CORREGIDO	84974.7	89			

Tabla 1. Resultados de ANOVA del índice anti fúngico (%) de *L. origanoides* en función a hora de colecta, concentración en ppm.

además los factores identificados tienen influencia sobre la variable respuesta.

La prueba de Tukey demuestra que no existen diferencias estadísticas significativas con un nivel de confianza del 95% entre las 12:00 horas y las 06:00 horas, pero si existe diferencias con respecto a las 18:00 horas, mostrando esta última los mayores promedios de porcentaje de índice antifúngico con el patógeno evaluado.

Además, todos los tratamiento mostraron diferencia entre ellos, caso contrario ocurrió con el tratamiento de 35.000ppm de aceite esencial el cual no mostró diferencias significativas con el control positivo con Benomil 2.5g/L, lo cual evidencia que el aceite esencial es igualmente efectivo para el control in vitro de *C. gloeosporioides* y su posterior aplicación en condiciones de invernadero, y que luego puede ser propuesto como bioproducto comercial en el control fitosanitario de este patógeno en cultivo de ñame por ser de origen natural.

Las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades gracias a sus inmensas propiedades y su acción a organismos patógenos, gracias a la interacción entre los componentes minoritarios y mayoritarios presentes en ellas.

La mayoría de los aceites esenciales son químicamente complejos, lo que aumenta la eficacia debido a la sinergia de sus componentes, éstos generalmente están presentes como mezclas de compuestos, de tal modo que los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones. Diferentes investigaciones llevadas a cabo reportan que los aceites esenciales afectan diversas etapas del desarrollo de los hongos como la germinación de esporas, formación de estructuras de

penetración, desarrollo de micelio y esporulación [13], sin embargo su mecanismo de acción no está bien definido, aunque algunos autores mencionan que el posible mecanismo de acción de los aceites sobre el crecimiento de los hongos se debe a los constituyentes con alta hidrofobicidad presentes en la célula, lo cual ocasiona trastornos en la permeabilidad y en el transporte de iones y de otros compuestos, así como en la separación de componentes lipídicos de la membrana celular y la mitocondria [14]. Gracias a la actividad bactericida, fungicida y antioxidante de los aceites esenciales y extractos vegetales en los últimos años se han posicionado como una gran alternativa agronómica para sustituir los plaguicidas sintéticos del mercado actual, para sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos, favoreciendo la estabilidad de los mismos y protección contra las alteraciones lipídicas, lo que incentiva a seguir realizando estudios que permitan el descubrimiento de otras moléculas bioactivas novedosas, que tengan potencial biológico contra los microorganismos causantes de enfermedades en los cultivos de interés agrícola.

4. Conclusiones y recomendaciones

El uso del aceite esencial de *Lippia origanoides*, constituye como una alternativa potencial a futuro para el manejo y control en campo de la antracnosis, causada por especies de *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de ñame del departamento de Sucre.

5. Referencias

- [1]. Palaniyandi, S., Yang, S., Cheng, J., Meng, L., & Suh, J.W. (2011). Control biológico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en el ñame por *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 443-455.
- [2]. Blanco, A., Tovar, J., y Fernández, M. (2004). Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. *ALAN*, 54 (3):322-327.
- [3]. Alvis, A., Vélez, C., y Rada, M. (2008). Composición de ñames frescos cultivados en Colombia y sometidos a freído por inmersión. *Inf. Tecnol.* 19: 3-10.
- [4]. Rugchati, O. (2010). Comparasion in some characteristic of yam tubers starch (*Dioscoreaceae* spp.) from Thailand. *International Journal of environmental and Rural development*, 1(2):102-106.
- [5]. FAO. 2016. Yam production statistics 2013. Faostat, FAO, Roma.
- [6]. Pérez, M., y Clavijo, N. (2012). El caso de la cadena productiva del cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) en la región caribe colombiana. *Estudios Sobre Innovación En La Agricultura Familiar. Experiencias y Enfoques De Procesos Participativos De Innovación En Agricultura*, 24-39
- [7]. Green, K., Abang M., y Lloba C. (2000). A rapid Bioassay for Screening Yam Germplasm for Response to Anthracnose. *Tropical Science*. 40:132-8.
- [8]. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- a review. *Food and chemical toxicology*, 46:446-475
- [9]. Granados, C., Yáñez, X., y Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua*, 10(1): 12-23.
- [10]. Vitola, D., y Hernández, J. (2015). Evaluación in vitro de la eficiencia de aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Causante de la antracnosis en cultivos de ñame en el departamento de Sucre. (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre. Programa de Biología.
- [11]. Pérez, A., Rojas, J., y Chamorro, L., y Pérez, K. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica*, 60(2), 158-164
- [12]. Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., y Li, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 694-699.
- [13]. Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermudez, K., Flores, H.E., y Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas de plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de fitopatología*, 18:125-131.
- [14]. Quintana, E.A., Plascencia, M., González, G.A., y Cortez, M.O. (2010). Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Mexicana de Micología*, 32:59-62.