



COMUNICACIÓN BREVE

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de plantas frente a hongos fitopatógenos de tomate y frijol común

In vitro antifungal activity of plant extracts against tomato and common bean phytopathogenic fungi

Katia Ojito-Ramos¹ , Rut Castañeda Bauta¹ , Orelvis Portal^{1,2} , Ray Espinosa Ruiz^{3*} 

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830

² Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830

³ Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54 830

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 22/10/2020
Aceptado: 17/12/2020

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no existir conflictos de intereses.

CORRESPONDENCIA

Ray Espinosa Ruiz
raye@uclv.edu.cu



Resumen

Las plantas son consideradas una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de las familias Rutacea y Phytolacaceae. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos y aceites esenciales, se caracterizaron fitoquímicamente y se determinó la concentración de fenoles totales. Se determinó la concentración inhibitoria mínima, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de conidios de *Passalora fulva*, *Alternaria solani*, *Stemphyllium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. En todos los extractos se identificaron aminas, aminoácidos, fenoles y taninos, y flavonoides y en el aceite esencial sesquiterpenos. Todos los extractos mostraron concentraciones inhibitorias mínimas, capacidad de inhibir el crecimiento micelial y la germinación de los conidios, con especificidad frente a cada hongo. El presente estudio demostró la potencialidad del uso de los extractos como antifúngicos para el manejo agroecológico de estos patógenos.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, Phytolacaceae, Rutacea, *Solanum lycopersicum*

Abstract

Plants are considered an important source of secondary metabolites with antifungal activity. The objective of this

research was to determine the *in vitro* antifungal activity of extracts of leaves of the Rutacea and Phytolacaceae family. Hydroalcoholic extracts and essential oils were obtained, they were characterized phytochemically and the concentration of total phenols was determined. The minimum inhibitory concentration, the percentage of inhibition of mycelial growth and of the germination of conidia was determined to *Passalora fulva*, *Alternaria solani*, *Stemphyllium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Amines, amino acids, phenols and tannins, and flavonoids were identified in all the extracts, and sesquiterpenes in the essential oil. All the extracts showed minimal inhibitory concentrations, ability to inhibit mycelial growth and germination of conidia, with specificity against each fungus. The present study demonstrated the potential of using the extracts as antifungals for the agroecological management of these pathogens.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Phytolacaceae, Rutacea, *Solanum lycopersicum*

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas y difundidas en el mundo, debido a sus cualidades gustativas y su aporte nutricional basado en un alto contenido de minerales y vitaminas (Chohan *et al.*, 2019). Por su lado, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se considera un componente indispensable de la dieta en Centroamérica y Suramérica (Ulloa *et al.*, 2011). Además, aporta gran cantidad de minerales como hierro, proteínas, almidón y vitaminas (Vaca-Rivera, 2019).

Sin embargo, los hongos *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous, *Stemphyllium solani* Weber, *Alternaria solani* Sor., *Rhizoctonia solani* Kühny y *Sclerotium rolfsii* Sacc., son agentes causales de enfermedades de importancia económica para estos cultivos. El principal método de control de estos es el empleo de fungicidas (Kristl *et al.*, 2019). El incremento de la resistencia a estos fungicidas, la contaminación ambiental y la toxicidad provocada por el abuso de los mismos ha aumentado la demanda de antifúngicos de origen natural (El-Nagar *et al.*, 2020).

Los extractos de plantas constituyen una fuente de productos naturales con actividad antifúngica demostrada. Los géneros *Citrus* L. y *Zanthoxylum* L., pertenecientes a la familia Rutaceae, son una fuente importante de compuestos bioactivos con actividad antifúngica (Ramírez-Pelayo *et al.*, 2019). De igual forma, en el principal exponente de la familia Phytolacaceae, el anamú (*Petiveria alliacea* L.), se han identificado numerosos compuestos

sulfurados (Sariego *et al.*, 2015) con actividad fungicida. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de especies de las familias Rutacea y Phytolacaceae frente a hongos fitopatógenos de tomate y frijol común.

Las hojas de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka, *Citrus aurantium* L. y *Citrus aurantium* var. *sinensis* L. se recolectaron en el área de colecciones vivas de plantas del Jardín Botánico de Villa Clara, perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Las hojas de *Zanthoxylum pseudodumosum* Beurton y *P. alliacea* se recolectaron en su hábitat natural. La primera de estas en el poblado “El Hormiguero”, carretera a Camajuaní, Santa Clara, Cuba y la segunda en el propio municipio de Santa Clara. La obtención de los extractos se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido y maceración. El aceite esencial se extrajo de las hojas mediante el método de hidrodestilación empleando una trampa tipo Clevenger. La identificación de metabolitos en los extractos se realizó por el método de tamizaje fitoquímico (Schabra *et al.*, 1984) y los fenoles totales se cuantificaron según Elkhatim *et al.* (2018).

Los aislados de los hongos utilizados en el trabajo fueron suministrados por el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. Para la determinación de la actividad

antifúngica *in vitro* de los extractos y aceite esencial discos de 0,6 cm de diámetro de micelio de cada uno de los hongos crecido en medio de cultivo Agar Papa Detroxa (PDA; Difco, Alemania) durante siete días se transfirieron, de forma individual, a medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB; Difco, Alemania) y se dejaron crecer en constante movimiento en una zaranda (Gerhardt, Alemania) durante 72 h, a 120 rpm y 27 ± 1 °C. Posteriormente, 1 g de micelio de cada hongo se trituró en un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Rose Scientific Ltd., Canadá) y se ajustó la concentración a 5×10^5 fragmentos de micelios mL^{-1} en una cámara de Neubauer (Brand, Alemania).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó en función de la concentración de fenoles totales del extracto por el método de microdilución (Eloff, 1998). El crecimiento micelial se observó en un estereoscopio (Novel, China) a partir de 72 h de incubación, cada 24 h por siete días. La CIM se definió como la menor concentración del extracto a la cual no se observó crecimiento micelial. El efecto de los extractos en el crecimiento radial de *P. fulva*, *S. solani*, *A. solani*, *R. solani* y *S. rolfsii* se determinó por el método de dilución en agar (Yanar *et al.*, 2011). Se evaluaron los extractos que se consideraron promisorios según la CIM. El diámetro de cada una de las colonias se midió, a partir de 72 h de incubación, cada 24 h por siete días. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó mediante la fórmula $(C-T)/C * 100$, donde C corresponde al diámetro de la colonia (cm) de *P. fulva*, *S. solani*, *A. solani*, *R. solani* y *S. rolfsii* crecido en medio de cultivo PDA con el disolvente diluido a la misma proporción en que se preparó el extracto y T corresponde al diámetro de la colonia (cm) crecido en medio de cultivo PDA con los extractos o el fungicida. El efecto de los extractos en la germinación de los conidios se realizó, solamente, sobre las estructuras reproductivas de *P. fulva*, *S. solani* y *A. solani* y se determinó por el método de gota colgante (Kavitha *et al.*, 2005). Se evaluaron los extractos que se consideraron promisorios según el porcentaje de inhibición del crecimiento

micelial. El número de conidios germinados (cuando el tubo germinativo fue igual o superior en longitud al conidio) se determinó, después de las 24 h, mediante la evaluación al microscopio óptico (Leitz Wetzlar, Alemania). El porcentaje de inhibición de la germinación de conidios se calculó mediante la fórmula $(C-T)/C * 100$, donde C corresponde al número de conidios de *P. fulva*, *S. solani* y *A. solani* germinados en agua destilada estéril con el disolvente diluido a la misma proporción en que se preparó el extracto y T corresponde al número de conidios de *P. fulva*, *S. solani* y *A. solani* germinados en los extractos o el fungicida. Se consideraron promisorios los extractos que mostraron inhibición de la germinación de los conidios superior al 50 % (Mishra *et al.*, 2009; Pupo, 2010).

En todos los extractos se identificaron aminos, aminoácidos, fenoles y taninos, flavonoides y alcaloides. En el aceite esencial los sesquiterpenos, fueron los compuestos mayoritarios. Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados mostraron CIM inferiores a los 40 mg EAG mL^{-1} de fenoles totales frente al menos uno de los hongos empleados. El extracto de *C. aurantiifolia* -met mostró menor CIM frente a *P. fulva* (5 mg EAG mL^{-1}), los extractos de *C. aurantiifolia* -et y *C. reticulata* -et mostraron menor CIM frente a *A. solani* (5 mg EAG mL^{-1}) y el extracto de *C. aurantium* var. *sinensis* -met frente a *S. solani* (0,04 mg EAG mL^{-1}). De los extractos evaluados de hojas de *Z. pseudodumosum* el extracto hexánico fue el que presentó mayor actividad antifúngica ya que inhibió el crecimiento de *A. solani* a una concentración de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Del mismo modo, todos los extractos y el aceite esencial evaluados mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 50 % frente a alguno de los hongos empleados. Los extractos más efectivos fueron: los extractos de *C. aurantiifolia* -et frente a *P. fulva* (70 %), *C. xlatifolia* -et frente a *A. solani* (100 %) (Figura 1), *C. aurantium* var. *sinensis* -et, *C. reticulata* -et, *C. aurantiifolia* -met, *C. reticulata* -met frente a *S. solani* (100 %), siendo este último el hongo más sensible a la actividad antifúngica de estos extractos. Todos los extractos de *P. alliaceae*

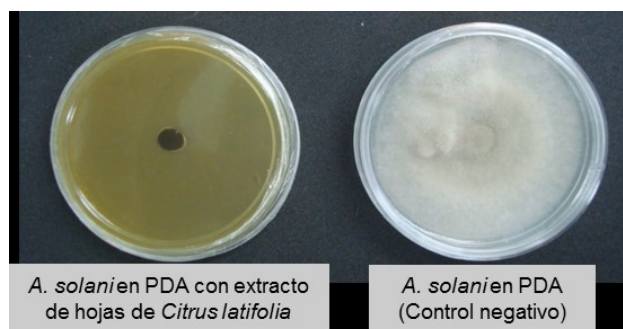


Figura. Inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria solani* por extractos de hojas de *Citrus latifolia* en etanol 70 % (-et) y el solvente como control negativo

(acuoso, hidroalcohólico y N-hexánico) evidenciaron CIM por debajo de 50 mg EAG mL⁻¹ de fenoles totales. Se destaca el extracto hidroalcohólico con 20 mg EAG mL⁻¹ de fenoles totales como el mínimo valor de la CIM para *R. solani* y *S. rolfsii*.

Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados mostraron porcentajes de inhibición de la germinación de conidios de al menos uno de los hongos empleados superiores al 50 %. En este sentido, los extractos más efectivos fueron: *C. aurantiifolia* -et, *C. aurantium* var. *sinensis* -met y *C. latifolia* -met frente a *P. fulva* (mayor 80 %), *C. aurantiifolia* -et, *C. aurantium* -et, *C. latifolia* -et, *C. aurantiifolia* -met, *C. reticulata* -met, *C. ×latifolia* -met frente a *A. solani* (mayores del 70 %), *C. reticulata* -met y *C. ×aurantium* -met frente a *S. solani* (100 %).

Estos resultados demuestran el potencial de los extractos de hojas de la familia Rutacea y Phytolacaceae para su empleo como antifúngicos en el manejo agroecológico de patógenos de tomate. No obstante, sería necesario realizar otros estudios de estabilidad y formulación química.

CONTRIBUCIÓN DE CADA AUTOR

Katia Ojito-Ramos: Conceptualizó y formuló los objetivos generales de la investigación, diseñó la investigación, analizó estadísticamente los datos, coordinó, planificó y ejecutó las actividades de investigación, fue el responsable de escribir el manuscrito publicado, específicamente, la redacción del borrador (incluida la rectificación de los señalamientos realizados al mismo por los árbitros y Consejo

Editorial).

Rut Castañeda Bauta: Contribuyó al diseño de la investigación, evaluó y recopiló los datos obtenidos en las pruebas de los experimentos.

Orelvis Portal: Conceptualizó y formuló los objetivos generales de la investigación, diseñó la investigación, fue el responsable de la gestión, coordinación, planificación y ejecución de las actividades de investigación.

Ray Espinosa Ruiz: Conceptualizó y formuló los objetivos generales de la investigación, contribuyó en la preparación, creación y presentación del trabajo publicado, fue el responsable de la gestión, coordinación, planificación y ejecución de las actividades de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- CHOHAN, S., PERVEEN, R., ANEES, M., *et al.* 2019. Estimation of secondary metabolites of indigenous medicinal plant extracts and their *in vitro* and *in vivo* efficacy against tomato early blight disease in Pakistan. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126: 553-563.
- EL-NAGAR, A., ELZAAWELY, A.A., TAHA, N.A., *et al.* 2020. The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy*, 10: 1402.
- ELKHATIM, K.A.S., ELAGIB, R.A.A. and HASSAN, A.B. 2018. Content of phenolic

- compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food Science & Nutrition*, 6: 1214-1219.
- ELOFF, J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711-713.
- KAVITHA, K., MATHIYAZHAGAN, S., SENDHILVEL, V., *et al.* 2005. Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38: 69-76.
- KRISTL, J., SEM, V., KRISTL, M., *et al.* 2019. Effects of integrated and organic pest management with copper and copper-free preparations on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit yield, disease incidence and quality. *Food Chemistry*, 278: 342-349.
- MISHRA, A.K., MISHRA, A., H.K., K., *et al.* 2009. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8: 1-7.
- PUPO, Y. 2010. Selección de extractos vegetales para el control de la alternariosis en *Solanum lycopersicum* L. y *Allium cepa* L. en sistemas agrarios urbanos. Bayamo, Cuba, Universidad de Granma.
- RAMÍREZ-PELAYO, C., MARTÍNEZ-QUÍÑONES, J., GIL, J., *et al.* 2019. Coumarins from the peel of citrus grown in Colombia: composition, elicitation and antifungal activity. *Heliyon*, 5: e01937.
- SARIEGO, S., MARIN, J.E., OCHOA, A., *et al.* 2015. Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46: 155-163.
- SCHABRA, S., ULISO, F. and MSHIU, E. 1984. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. I. *Journal of Ethnopharmacology*, 11: 157-179.
- ULLOA, J.A., P., R.-U., C., R.J., *et al.* 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3: 5-9.
- VACA-RIVERA, N.L.E.S.W. 2019. Implementación de 5000 m³ de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a ciclo de producción con fines comerciales en el municipio de Cunday-Tolima. Retrieved 07 de febrero, 2019, from http://ciencia.lasalle.edu.co/ingeniería_agronomica/154.
- YANAR, Y., GÖKÇE, A., KADIOGLU, I., *et al.* 2011. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology*, 10: 8291-8295.



Artículo de libre acceso bajo los términos de una *Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional*. Se permite, sin restricciones, el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.