

Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados

Evaluation of vegetable extracts for control of the pathogenic fungi in banana and strawberry in post harvest storage

Angélica López, Mónica Vélez,¹ Manuel S. Sánchez O., Carmen R. Bonilla C.,² Pablo I. Gallo³

RECIBIDO: NOVIEMBRE 16/06. ACEPTADO: OCTUBRE 17/06

⁴ Ing. Agroind. Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

² Profesores Asociados Universidad Nacional de Colombia Sede-Palmira. crbonillac@palmira.unal.edu.co y mssanchezo@unal.palmira.edu.co

³ Ing. Agr. Laboratorio de Microbiología Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

RESUMEN

En la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, se obtuvieron extractos etanólicos (1.000 ml), macerados (100 g) de llantén (*Plantago major* L), ruda (*Ruta graveolens* L), pronto alivio [*Lippia alba* (Mill) NE BROS] y helecho marranero [*Pteridium aquilinum* (Kaulf) Maxon]. Para la evaluación del control de *C. musae* y *B. cinerea* se utilizaron dieciséis tratamientos (cuatro extractos de plantas, dos medios de extracción, dos diluciones y tres repeticiones). Se adicionaron tres testigos: absoluto (PDA); solvente (PDA + etanol o agua); y químico (PDA + fungicida químico). Las diluciones se realizaron con el solvente de obtención del extracto. La evaluación *in vivo* se realizó con extractos etanólicos diluidos al 25%. El solvente etanólico disminuyó el desarrollo de los hongos en 68%. Los frutos donde se aplicó el extracto de ruda y pronto alivio presentaron mayor incidencia y grado de severidad.

Palabras claves: *Plantago major*; *Ruta graveolens*; *Lippia alba*; *Pteridium aquilinum*; *Colletotrichum musae*; *Botrytis cinerea*; Manejo poscosecha.

SUMMARY

This study was carried out get knowledge about fungicidal properties of vegetable extracts to the control of the pathogenic fungi (*Colletotrichum musae* and *Botrytis cinerea*) in banana (*Musa sapientum*) and strawberry (*Fragaria sp*) during the pos harvest storage, at the National University of Colombia headquarters in Palmira. Ethanolic extracts of the following vegetable species were evaluated: *Plantago major* L, *Ruta graveolens* L, *Lippia alba* (Mill) NE BROS, *Pteridium aquilinum* (Kaulf) Maxon. The extracts were obtained by the percolation method starting from the macerated material (100 g) and 1000 ml of solvent. The fungi was isolated from the strawberry (*Fragaria sp*) affected by *B. cinerea* and banana *Gross müchel* affected by *C. musae*. To evaluate the control of the fungi *C. musae* and *B. cinerea* sixteen treatments were used (four extracts of plants, two extraction media, two dilutions and three repetitions). Three control treatments were added: absolute (PDA); solvent (PDA + ethanol or water); and chemical (PDA + chemical fungicide). The dilutions were prepared with the solvent used to obtain the extract. The evaluation *in vitro* was made with ethanolic extracts diluted at 25%, because these presented the best results in the previous tests. The results indicate that the ethanolic solvent decreased the development of the fungi in 68%. The fruits in which the ethanolic extract of ruda and pronto alivio was applied presented bigger incidence and grade of severity.

Keys words: Vegetable extract; pathogenic fungi; *Colletotrichum musae*; *Botrytis cinerea*; post harvest

INTRODUCCIÓN

En Colombia se producen 124.887 toneladas de banano (*Musa sapientum*) en 12.026 hectáreas (Belalcazar, 1991) de los departamentos de Antioquía, Santander, Boyacá, Cundinamarca, Caldas, Quindío, Risaralda, Valle, Tolima, Meta, Huila y Cauca (Ovalle, 1998). La fresa se cultiva ampliamente en el país y se

considera la Sierra Nevada como zona potencial, por la cercanía a puertos para su exportación (Jaramillo y Lobo, 1989). La antracnosis del banano (*Colletotrichum musae*) y la cenicilla de la fresa (*Botrytis cinerea*) constituyen dos enfermedades poscosecha muy importantes. En el caso de la fresa las pérdidas alcanzan 20%, mientras que en banano llegan

al 15% (Carulla, 1990). El manejo inadecuado en poscosecha afecta la economía de los productores, comercializadores y consumidores. Asimismo, la presión social ha incentivado el uso de sustancias naturales para el control de plagas y enfermedades en vegetales, a tal punto que muchos productos de exportación deben adecuarse a las condiciones de cultivo orgánico (Aquino y Stauffer, 2000). Por tanto, es necesario avanzar en la investigación del potencial de nuestra flora para el desarrollo de nuevos subproductos con poder fungicida en poscosecha de frutas y hortalizas.

La investigación tuvo como objetivo general contribuir al conocimiento de las propiedades fungicidas de extractos vegetales para el control de *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea* en banano (*Musa sapientum*) y fresa (*Fragaria sp*) durante el almacenamiento poscosecha. Los objetivos específicos fueron:

- Determinar *in vitro* la efectividad de extractos acuoso y etanólico de cuatro especies vegetales en diferentes dosis sobre el desarrollo de *C. musae* y *B. cinerea*.
- Valorar *in vivo* el efecto de los extractos más eficaces en frutos de banano y fresa en su almacenamiento poscosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo, que se realizó en la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira se emplearon cuatro especies: llantén (*Plantago major L*), ruda (*Ruta graveolens L*), pronto alivio [*Lippia alba (Mill) NE BROS*], helecho marranero [*Pteridium aquilinum (Kaulf) Maxon*]. Tres especies se sembraron en el Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira (CEUNP), y el helecho marranero se recolectó en el municipio de Yumbo (Valle del Cauca).

El follaje se secó a la sombra y se expuso durante cinco días en condiciones ambientales y a temperatura que no excediera los 40°C para no alterar el contenido químico de la planta. El follaje seco se molió en un molino de cuchillas. Se maceró durante dos horas; humedeciendo 100g de la muestra con 300 ml de solvente (etanol o agua). Los extractos se obtuvieron mediante el método de percolación a partir del material macerado y 1.000 ml del solvente. Para obtener mayor cantidad de principios activos se recirculó el extracto. Posteriormente se sometió al rotoevaporador con el objetivo de disminuir el exceso de solvente y obtener un extracto más puro. A los extractos obtenidos se les realizaron pruebas fitoquímicas para determinar metabolitos secundarios.

Los hongos se aislaron de fresa (*Fragaria sp*) afectada por *Botrytis cinerea* y banano *Gross mitchel* afectados por *Colletotrichum musae*, las muestras se recolectaron de cultivos establecidos en el corregimiento de Tenerife, municipio de El Cerrito, y en el corregimiento Rozo, municipio de Palmira, respectivamente. La siembra del material se realizó en PDA con ácido láctico al 25% y se incubó a una temperatura de 25°C (*C. musae*) o 15°C. *B. cinerea*.

Para el reconocimiento de las colonias fungosas se montaron placas con azul de algodón, por el método de impronta, a partir del crecimiento micelial y se observaron al microscopio en 40x teniendo como apoyo las claves de Barnett (1972) y Pardo (1995). Una muestra de los cultivos puros se sembró en PDA inclinado y se refrigeró a 8 a 10 °C.

Evaluación *in vitro* de los extractos vegetales para el control de los hongos aislados

Para la evaluación del control se utilizaron dieciséis tratamientos (cuatro extractos de plantas, dos medios de extracción, dos diluciones, tres testigos y tres repeticiones). Los testigos fueron: absoluto (PDA); solvente (PDA + etanol o agua); y químico (PDA + fungicida químico). Las diluciones se realizaron con el solvente de obtención del extracto.

La efectividad en el control se evaluó mediante la medición diaria del crecimiento circular del hongo, hasta que el testigo absoluto cubrió totalmente la superficie del medio. Se comparó cada tratamiento con el testigo absoluto, y a los diez días, cuando el hongo logró su esporulación total, se determinó la concentración de conidias por cm³, mediante recuento en la cámara de Neuwaver.

Análisis de la información

Evaluación *in vivo* de la capacidad de control de los extractos vegetales en frutas almacenadas poscosecha

La evaluación *in vivo* se realizó con extractos etanólicos al 25%. La unidad experimental fue de seis frutos (banano y fresa) por tratamiento. Se tuvieron en cuenta tres testigos: absoluto (fruto), solvente (fruto + etanol) y químico (fruto + hongo + fungicida químico); el fungicida químico fue benomil para el banano y dichlofluanid para la fresa, con tres repeticiones cada tratamiento.

Previa a la inoculación se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, más un lavado con agua destilada estéril. El inóculo se aplicó por el método de aspersión de manera uniforme. A cada fruto

se le aplicaron 5 ml del extracto. Los frutos tratados se almacenaron en cámaras húmedas. El procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar. El seguimiento se realizó cada 24 horas, para registrar la presencia del hongo, síntomas de la enfermedad y otros cambios en los frutos.

Las variables medidas fueron:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de frutos afectados}}{\text{Número de frutos totales}} * 100$$

Severidad: mediante una escala de uno (fruto sano) a cinco ($\geq 10\%$ del fruto afectado):

Se empleó un diseño completamente al azar y la información obtenida en las fases *in vitro* e *in vivo* se

sometieron a análisis estadístico mediante el programa S.A.S. (Statistical Analysis System). Dentro de este se realizaron pruebas de Duncan y Anova.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los extractos en el crecimiento radial y desarrollo de conidias de los hongos *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea*

El crecimiento de los hongos presentó diferencias significativas respecto al tipo de solvente utilizado en los extractos. El etanol disminuyó en 68% el desarrollo de los hongos. El testigo químico controló el crecimiento de *C. musae* y *B. cinerea* 63% y 67% respectivamente. El extracto acuoso de llantén inhibió más el crecimiento radial de *C. musae* y *B. cinerea*, pero favoreció la esporulación (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento radial y desarrollo de conidias de los hongos *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea* a diferentes diluciones del extracto de llantén (*Plantago major*).

Tratamiento	Extracto acuoso				Extracto etanólico			
	Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)		Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)	
	<i>Collet</i>	<i>Botry</i>	<i>Collet</i>	<i>Botry</i>	<i>Collet</i>	<i>Botry</i>	<i>Collet</i>	<i>Botry</i>
Dilución al 50%	78 b	89 b	102 a	100 a	32 b	32 a	0 b	0 b
Dilución al 25%	77 b	85 b	103 a	101 a	32 b	32 a	0 b	0 b
Testigo absoluto	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 b	100 a	100 a
Testigo solvente	99 a	96 a	106 a	100 a	32 a	32 a	0 b	0 b
Testigo químico	32 c	92 a	0 b	0 b	32 a	32 a	0 b	0 b

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan.

El extracto acuoso de pronto alivio al 25% redujo en 15% el crecimiento de *C. musae*, mientras que la dilución al 50% no presentó diferencia alguna frente a este testigo. Las diluciones del 25% y 50% inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* en 2% y 4% respectivamente; inclusive se observó aumento de conidias (Tabla 2).

El extracto acuoso de helecho marranero no mostró cambios en *B. cinerea*, pero estimuló el crecimiento micelial de *C. musae*; el desarrollo de conidias se incrementó en *C. musae* (Tabla 3).

El extracto acuoso de ruda no presentó diferencia significativa en el crecimiento radial. El número de conidias en dilución del 50% aumentó en *C. musae*; en *B. cinerea* las diluciones del 25% y 50% disminuyeron el desarrollo de conidias en 4% y 5% respectivamente (Tabla 4).

Los extractos etanólicos inhibieron más el crecimiento de *C. musae* y *B. cinerea* que los extractos acu-

osos, fungicidas químicos y testigos absolutos; sin embargo, presentaron resultados similares a los obtenidos con el etanol, solvente que interfiere en la función de la membrana celular, en los procesos de transporte y metabolismo energético (Iañez, 1998).

Incidencia y severidad de patógenos en los extractos etanólicos aplicados al banano (*Musa sapientum*)

Con extracto etanólico de llantén, en cámara húmeda se presentó mayor incidencia y severidad en el fruto en relación con el testigo absoluto. La contradicción aparente entre las pruebas (*in vivo* e *in vitro*) puede atribuirse a los medios y condiciones donde se usó el extracto etanólico. En la prueba *in vitro* el etanol está en contacto con una solución acuosa, PDA; mientras que en la prueba *in vivo* el etanol se aplicó sobre el fruto y se colocó en la cámara húmeda; es probable

Tabla 2. Crecimiento radial y desarrollo de conidias de los hongos *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea* sometidos a diferentes diluciones del extracto de Pronto alivio (*Lippia alba*).

Tratamiento	Extracto acuoso				Extracto etanólico			
	Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)		Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)	
	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry
Dilución al 50%	95 a	96 b	106 a	99 a	33 d	32 d	0 c	0 b
Dilución al 25%	85 a	96 b	104 a	99 a	33 d	32 d	0 c	0 b
Testigo absoluto	100 a	100 a	100 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Testigo solvente	97 a	96 c	100 b	100 a	33 d	32 d	0 c	0 b
Testigo químico	47 c	33 d	113 c	0 c	33 d	32 d	95 b	0 b

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan.

Tabla 3. Crecimiento radial y desarrollo de conidias de los hongos *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea* sometidos a diferentes diluciones del extracto de helecho marranero (*Pteridium aquilinum*).

Tratamiento	Extracto acuoso				Extracto etanólico			
	Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)		Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)	
	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry
Dilución al 50%	100 a	99 b	112 a	99 a	36 b	32 b	47 a	0 b
Dilución al 25%	100 a	96 b	110 a	100 a	33 c	32 b	63 b	0 b
Testigo absoluto	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Testigo solvente	94 b	97 c	96 b	97 a	35 c	32 b	83 b	0 b
Testigo químico	31 c	32 c	0 c	0 b	32 b	32 b	0 c	0 b

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan.

Tabla 4. Crecimiento radial y desarrollo de conidias de los hongos *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea* sometidos a diferentes diluciones de extracto de ruda (*Ruta graveolens*).

Tratamiento	Extracto acuoso				Extracto etanólico			
	Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)		Crecimiento radial (cm)		Conteo de conidias (%)	
	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry	Collet	Botry
Dilución al 50%	100 a	99 b	112 a	99 a	36 b	32 b	47 a	0 b
Dilución al 50%	99 a	96 a	104 a	96 b	31 c	32 b	0 a	0 b
Dilución al 25%	99 a	96 a	100 b	96 b	37 b	32 b	0 b	0 b
Testigo absoluto	100 a	100 a	100 b	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Testigo solvente	96 a	97 a	93 c	95 a	31 c	32 b	0 b	0 b
Testigo químico	31 b	32 b	0 d	0 c	31 c	32 b	0 b	0 b

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan.

que las reacciones entre el etanol y los metabolitos secundarios de la planta originen compuestos químicos que, además de la acumulación de CO₂, tengan la capacidad de actuar como madurantes en banano; esto explica la rápida “maduración” (ablandamiento) y el acelerado desarrollo de la enfermedad en los frutos.

Los frutos donde se aplicó el extracto etanólico de ruda y pronto alivio presentaron mayor incidencia y grado de severidad en relación con el testigo absoluto, aunque al tercer día no presentaron síntomas de la enfermedad igualmente estos tratamientos generaron consistencia blanda en el fruto.

El extracto de helecho marranero presentó la menor incidencia y severidad comparada con el testigo absoluto. Este tratamiento conservó el fruto en nivel aceptable durante más tiempo, ya que la enfermedad se manifestó al quinto día, dos días después que en el testigo absoluto. La maduración del fruto fue normal, lo que indica que el tratamiento no interfirió en la maduración y presentó ventajas frente a los otros extractos evaluados.

En el tratamiento químico (Benomyl) los primeros síntomas de la enfermedad se manifestaron al sexto día, cuando los frutos del testigo absoluto se encontraban en la fase de senescencia (degradación del fruto).

En cámara húmeda el testigo etanólico no presentó capacidad fúngica, ya que el etanol actuaba individualmente y le permitía volatilizarse fácilmente.

Tabla 5. Incidencia y severidad de los extractos etanólicos de varias plantas en frutos de banano (*Musa sapientum*).

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)
Llantén	99.0 a	4.55 a
Ruda	72.2 b	3.33 b
Pronto alivio	83.3 a	4.05 a
Helecho marranero	27.7 d	1.94 d
Testigo absoluto	52.7 c	2.55 c
Testigo químico	24.0 d	1.77 d
Testigo etanol	47.2 c	2.66 c

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales.

Incidencia y severidad de patógenos en los extractos etanólicos aplicados a fresa

Aunque el extracto etanólico de llantén presentó el mejor resultado comparado con el testigo absoluto, el control no fue satisfactorio (Tabla 6). La incidencia y la severidad en frutos tratados con el extracto etanólico de ruda fueron altas y los síntomas se presentaron al tercer día de haber inoculado el hongo; la enfermedad

se desarrolló rápidamente y la calidad del fruto decayó notablemente.

El tratamiento con pronto alivio no controló la enfermedad. En los frutos donde se aplicó el extracto etanólico de helecho marranero disminuyó la incidencia y severidad de la cenicilla, y aunque no la combate totalmente ayuda a que el fruto no se deteriore tan rápidamente.

El tratamiento con el etanol no presentó diferencias significativas al compararlo con el testigo absoluto. Dichlofluanid no controló la enfermedad, aunque la incidencia y la severidad fueron menores que la del testigo absoluto.

Tabla 6. Incidencia y severidad de patógenos en los extractos etanólicos aplicados a frutos de fresa (*Fragaria sp.*).

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)
Llantén	80.0 b	4.06 c
Ruda	98.8 a	4.73 a
Pronto alivio	86.6 a	4.93 a
Helecho marranero	84.4 a	4.20 c
Testigo absoluto	90.0 a	4.26 c
Testigo químico	81.1 b	3.86 c
Testigo etanol	85.5 a	3.86 c

• Promedios con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales.

Detección de metabolitos secundarios

Las pruebas fitoquímicas cualitativas de los extractos etanólicos (Tabla 7) y acuosos (Tabla 8) comprobaron la presencia de taninos que protegen la planta contra el ataque de hongos y bacterias (Trease y Evans, 1986). Los flavonoides, que se presentaron en los extractos etanólicos y acuosos de ruda, pronto alivio y llantén, presentan actividad fungicida (Gross, 1985), propiedad que no se manifestó en las diluciones y hongos evaluados. Igualmente se determinó la presencia de saponinas en los extractos acuosos y etanólicos de helecho marranero y pronto alivio.

Tabla 7. Metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de ruda, helecho marranero, pronto alivio y llantén.

Metabolitos secundarios	Extracto etanólico			
	Ruda	Helecho marranero	Pronto alivio	Llantén
Alcaloides				
• Berchardat	-	-	-	-
• Dragendorff	-	-	-	-
• Wagner	-	-	-	-
Derivados de coumarinas	-	-	-	-
Esteroides y triterpenoides	+	+	+	+
Flavonoides	+	-	+	+
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-
Saponina espumídica	-	+	+	+
Taninos	-	+	+	+

• Presencia (+), Ausencia (-).

Tabla 8. Metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos de ruda, helecho marranero, pronto alivio y llantén.

Metabolitos secundarios	Extracto etanólico			
	Ruda	Helecho marranero	Pronto alivio	Llantén
Alcaloides				
• Bercharadat	-	-	-	-
• Dragendorff	-	-	-	-
• Wagner	-	-	-	-
Derivados de coumarinas	-	-	-	-
Esteroides y triterpenoides	+	-	-	-
Flavonoides	+	-	++	
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-
Saponina espumídica	-	+	+	+
Taninos	-	+	+	+

• Presencia (+), Ausencia (-).

AGRADECIMIENTOS

Se contó con el apoyo académico y financiero del proyecto en plantas medicinales de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

BIBLIOGRAFÍA

- Aquino, A.; y Stauffer, A. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y bactericida. *Rev Ciencia Tecnol.* (Py) vol. 1 N° 2. pp 29-30. (Disponible en: www.newton.cnc.una.py/resource-1006/2000v1n2-04pdf).
- Barnett, H. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi.* USA. p 70.
- Belalcázar, S. 1991. El cultivo del plátano en el trópico. Armenia. pp 21, 22, 47, 78, 290, 324, 347 y 348.
- Carulla, J. 1990. Federación Nacional de Productores de frutas y hortalizas. Comité del Valle *En:* Congreso Nacional de la industria hortifrutícola, 6. p 77.
- Díaz, V. 1998. Evaluación de pérdida de manejo poscosecha de banano (*Musa sapentum*) en Bugalagrande, Valle del Cauca. Trabajo de grado (Tecnología de Alimentos). Universidad del Valle. pp 16.
- Gross, E. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Washington, D.C: OEA. 134p. (Monografía No. 30. Serie de Química).
- Iañez, E. 1998. Tipos de desinfectantes. (Disponible en: www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/19_Micro.htm.)
- Jaramillo, J. y Lobo, M. 1989. Hortalizas. Bogotá: ICA. 529, 530, 534 y 535.
- López, A. 1996. Calidad en frutas y hortalizas. Armenia, Quindío: Fudesco, pp 7-8-27y28 (Manual de Asistencia Técnica No. 18).
- Ovalle, J. 1998. Paquete de capacitación en manejo poscosecha del banano criollo. Bogotá. pp 23-25-29.
- Pardo, V. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. pp. 51-54.
- Trease, G.; Evans, W. 1986. Tratado de farmacognosia. 12 ed. Madrid: Interamericana. p 846.