



Artículo Original

Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio

Antifungal activity of ethanol extract of *Schinus molle* leaves on growth of *Lasiodiplodia theobromae* under laboratory conditions

Silvia Segura-Contreras, Marlene Rodríguez-Espejo, y Julio Chico-Ruiz

Laboratorio de Fitopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú

RESUMEN

Se evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de molle, *Schinus molle*, sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Para ello, se preparó el medio de cultivo agar papa dextrosa y luego se procedió a obtener el extracto etanólico a concentraciones de 0, 25, 30, 35%. Los resultados se analizaron mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. El extracto de molle demostró tener actividad antifúngica sobre *L. theobromae* a la concentración de 30% ($p < 0,05$). Se concluye que el extracto de *S. molle* presenta actividad antifúngica sobre *L. theobromae*, en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: extracto etanólico, *L. theobromae*, *S. molle*, actividad antifúngica.

ABSTRACT

Antifungal activity of ethanol extract of the leaves of *Schinus molle* on *Lasiodiplodia theobromae* was evaluated. For this purpose, the culture medium potato dextrose agar was prepared and then proceeded to obtain the extract at concentrations of 0, 25, 30, and 35%. The results were analyzed by the percent inhibition of mycelial growth. The ethanol extract presented antifungal activity on *L. theobromae* at 30% of concentration ($p < 0,05$). It was concluded that the extract of *S. molle* has antifungal activity on *L. theobromae*, under laboratory conditions.

Keywords: ethanol extract, *L. theobromae*, *S. molle*, antifungal activity.

INTRODUCCION

El control biológico desarrolla alternativas naturales tales como el uso de extractos vegetales con los que se han obtenido resultados prometedores, ya que los extractos vegetales tienen las ventajas de poseer un origen biológico, ser biodegradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente^{1,2,3}. Las plantas producen diversos metabolitos secundarios, tales como, flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, entre otros, que presentan actividad antifúngica^{4,5,6,7}.

En el Perú, existe una gran diversidad de especies botánicas que son empleadas para tratar enfermedades que afectan a los seres humanos, animales y plantas; sin embargo, su uso en el control de fitopatógenos es escaso⁸. *Schinus molle*, comúnmente llamada "molle", a la cual se le atribuye propiedad analgésica, antibacteriana, antifúngica y diurética, se encuentra en este grupo^{7,8}.

S. molle contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos, gomas, resinas y aceites esenciales; los aceites esenciales están presentes en hojas, corteza y frutos, constituyendo una fuente de triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos; las hojas contienen hasta un 2% de aceites esenciales, el fruto puede contener hasta un 5% de aceites esenciales además de la presencia de: a-pineno, b-pineno, piperina, (+)-limoneno, piperitona, carvacrol, mircenol, b-espátuleno y b-felandreno, entre otros compuestos^{7,8,9,10}

El aceite esencial de *S. molle* posee actividad antibacterial contra: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*, así como, actividad antifúngica contra: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata*^{7,8,9} Sin embargo, otras especies fúngicas de importancia en la producción agrícola, entre ellas *L. theobromae*, no han sido sometidas a prueba.

L. theobromae es un hongo fitopatógeno cosmopolita, propio del suelo, responsable de causar un gran número de enfermedades tanto en campo como en almacenamiento en más de 280 especies de plantas, incluyendo cultivos, frutas y árboles en plantación^{10,11}. En efecto, los cultivos industriales y de exportación como el cacao, el palto el mango, han sido en algún momento atacados por *L. theobromae*, el efecto del hongo en algunos lugares ha sido contrarrestado tratándolo mediante el control químico y medidas culturales^{11,12,13}, sin embargo, el uso del extracto de *Sc. molle*, resulta novedoso para reemplazar a los químicos debido a que no inducen a resistencia, no contaminan el ambiente y resultan menos costosos. En consideración a esta inquietud, se evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *S. molle* sobre *L. theobromae*, determinando la velocidad de crecimiento y la concentración del extracto que produjo mayor inhibición sobre su crecimiento en condiciones de Laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Lasiodiplodia theobromae fue proporcionado por el área de control de calidad de la empresa SOLAGRO S.A.C. (Trujillo, Perú), el cual fue aislado de frutos post cosecha de palto, en agosto del 2014.

S. molle “molle” fue colectado en la Universidad Nacional de Trujillo. El material vegetal se llevó al Herbarium Truxillensis (HUT) de la UNT para su determinación. Del material recolectado se seleccionaron las hojas sanas (sin signos o síntomas de enfermedad o ataque de plagas).

Preparación de medio de cultivo

Se realizó la preparación del medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA), siguiendo la metodología propuesta por Echanti¹³ Al término del tiempo de esterilización se agregó el antibiótico (500 mg de doxiciclina) para evitar la contaminación del medio de cultivo PDA..

Reactivación del hongo^{14,15}

Se realizó a partir de la placa Petri que contenía el cultivo madre, realizando los repiques necesarios para la obtención y conservación del patógeno hasta su aplicación en la experimentación, el cultivo se dejó incubar por siete días.

Preparación del extracto¹⁶

Las hojas de *S. molle* “molle” fueron sometidas a un proceso de desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 3 minutos y agua destilada. El material limpio fue colocado sobre papel kraft en un lugar ventilado hasta quedar completamente seco. Posteriormente se colocaron las hojas en sobres de papel kraft y se almacenaron en un horno a 40°C por 2 días, luego se trituró las hojas secas en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo, se obtuvo 1kg., aproximadamente del polvo de hojas de “molle”. En frascos de vidrio estéril con tapa, se depositó el polvo de las hojas de “molle” y se le agregó 4 L., del disolvente etanol de 90° hasta cubrirlo por completo. Los frascos se cubrieron con bolsas oscuras y se dejó macerar por 14 días en un lugar limpio y seco, realizando agitación diaria.

Al término del tiempo de maceración, se colocó el extracto en un equipo de ultrasonido por 20 minutos a 40 °C, para lograr la extracción de los componentes de la planta. Seguido a esto se filtró para obtener sólo el líquido, el extracto obtenido se vertió en placas de 18 cm de diámetro con ventilación constante hasta evaporar completamente el etanol, así obtuvimos el extracto en forma de pasta (93 gr., aproximadamente), luego se colocó en un frasco estéril, cubierto con papel aluminio y puesto en refrigeración; esto para conservar la muestra hasta el momento de su utilización.

Diseño experimental

Se utilizó el diseño completamente al azar de estímulo creciente^{23,24}. El diseño experimental contó con tres grupos experimentales y un grupo testigo, cada grupo experimental y testigo contó con cuatro repeticiones, la evaluación de los resultados se terminó cuando el hongo, del grupo testigo, creció en toda la extensión (9cm) de la placa Petri.

GRUPOS EXPERIMENTALES		REPETICIONES			
		1	2	3	4
1	PDA + E.E. , <i>S. molle</i> 0 %				
2	PDA+E.E. , <i>S. molle</i> 25 %				
3	PDA+E.E. , <i>S. molle</i> 30 %				
4	PDA+E.E. , <i>S. molle</i> 35%				

Fuente: Autor, PDA= agar papa dextrosa, E.E.= extracto etanólico

Evaluación del extracto sobre el crecimiento del hongo^{14,15}

El extracto etanólico de hojas de “molle”, se mezcló con el medio agar papa dextrosa (PDA) estéril, en las concentraciones de 0, 25, 30 y 35 % (v/v) y se dispensó en placas Petri. Luego de la solidificación del medio, se colocó en el centro de cada placa un disco de micelio de 5 mm de diámetro, extraído del cultivo puro de *L. theobromae* incubado a temperatura ambiente $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ ²⁵. Se registraron y almacenaron las medidas del diámetro de la colonia de todos los tratamientos a partir del tercer día de experimentación, cada 24 horas, hasta que el crecimiento en el tratamiento testigo (0 % de inhibición) completó el diámetro de la placa (9 cm). Con los promedios de los datos obtenidos, se calculó los porcentajes de inhibición y velocidad del crecimiento micelial (ICM) mediante la siguiente fórmula:

$$ICM = \frac{(d_0 - d_c)}{d_0} \times 100$$

Donde:

% ICM = Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, d_0 = Diámetro de la colonia del testigo (0 %), d_c = Diámetro de la colonia con la concentración prueba.

Análisis estadístico

Se evaluó la presencia (y dimensión en mm) o ausencia del halo de inhibición del crecimiento del hongo²⁸. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), al haber obtenido una razón F significativa se utilizó el análisis de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$), para determinar entre qué tratamientos se encontraron las diferencias significativas²⁹. Utilizamos el paquete estadístico IBM SPSS Statistics vers. 20, para todos los tratamientos.

RESULTADOS

Los tratamientos de 25, 30 y 35 % del E.E. de las hojas de *S. molle* “molle”, causaron inhibición conforme aumenta las concentraciones del extracto, 76.77 %, 93.16% y 92.62% respectivamente. (Tabla 1, Figs. 2 y 3).

Tabla 1: Porcentaje de inhibición micelial (ICM) del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., en condiciones de laboratorio.

Nº	Tratamientos	Crecimiento (cm)	ICM %*
1	PDA + E.E. 0 %	7,32	00,0
2	PDA + E.E. 25 %	1,70	76,8
3	PDA + E.E. 30 %	0,50	93,2
4	PDA + E.E. 35%	0,54	92,6

Fuente:
Datos obtenidos en
trabajo de laboratorio

y en gabinete, % ICM= Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, PDA=agar papa dextrosa, E.E.= extracto etanólico, *p<0,05

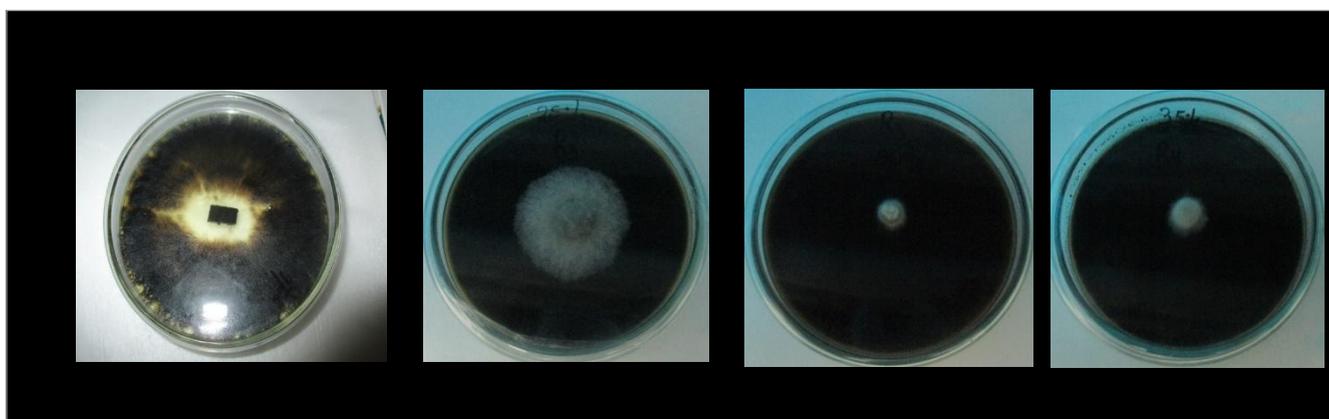


Fig. 2: Actividad antifúngica del extracto de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*, en medio de cultivo PDA; después de 5 días de evaluación, se muestra el halo de crecimiento del hongo en placa (de izquierda a derecha): testigo 0%, al 25%, 30% y 35% de concentración del extracto de “molle”.

DISCUSION

L. theobromae ha sido reportada como causante de “muerte regresiva” o “muerte apical descendente”, capaz de causar daños en campo, vivero y frutos almacenados, en cultivos de importancia tales como palto, mango, manzano, sapote y cacao^{10,11,12,13}; algunos autores también la responsabilizan de enfermedad en post cosecha o en almacenamiento como es la pudrición del pedúnculo de los frutos almacenados, junto con otros patógenos^{17,18,19}. Un apunte importante es que la actividad del hongo se ve favorecida por condiciones de alta humedad ambiental y temperatura (81-84 % y 24 ±26 °C)^{20,21,22}.

Los valores obtenidos en la Tabla 1, muestran la capacidad del extracto para inhibir o detener el crecimiento de *L. theobromae* (Fig. 2), comportándose como efectivo controlador biológico: el “molle” presenta propiedad antibacteriana y antifúngica y al menos en condiciones experimentales, logra la inhibición micelial^{10,11,23}. El porcentaje de inhibición mostrado en la Tabla 1, comparado con los resultados obtenidos previamente cuando hojas de *Aloe vera*, corteza de *Rhizophora racemosa* y *Jatropha curcas* fueron enfrentados con *L. theobromae* y se obtuvieron resultados de 100 y 80% de efecto inhibitorio sobre el hongo probado¹⁷.

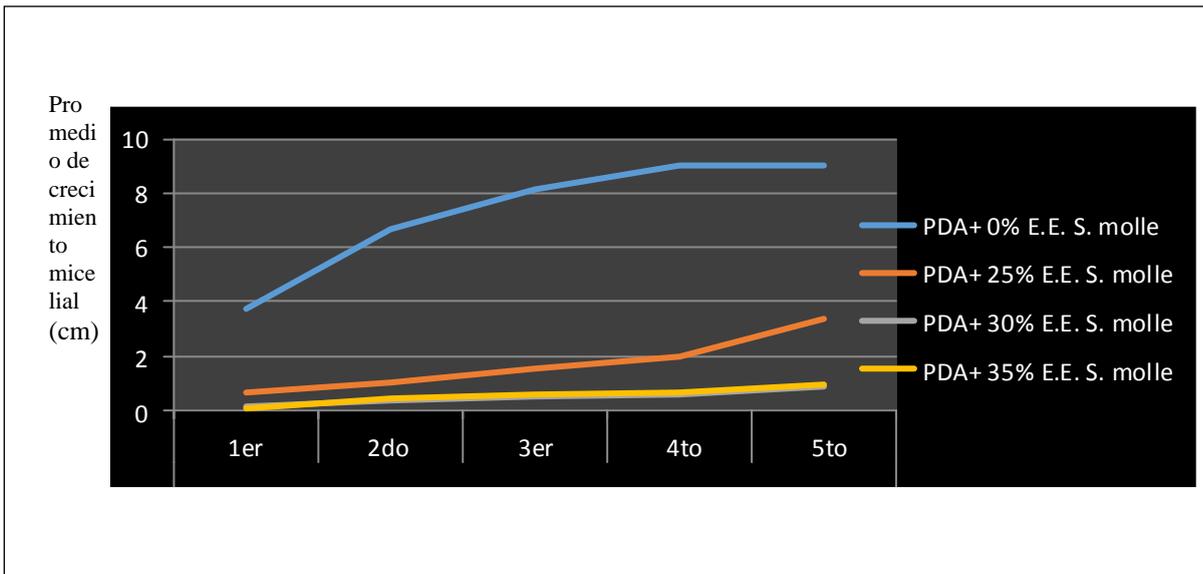


Fig. 3: Velocidad de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* sometido a 0, 25, 30 y 35 % del extracto etanólico de *Schinus molle*, durante los días de evaluación (1°....5°).

Aguilar et al.¹⁵ refieren que el extracto etanólico de “pirul o molle”, presentó la mayor inhibición sobre *C. gloeosporioides*, afectando significativamente ($P < 0.05$) las variables crecimiento máximo y velocidad de crecimiento radial (en un 60 % de reducción) del fitopatógeno, comparado con el resultado obtenido en nuestra investigación cuyos porcentajes fueron más elevados: 76, 93 y 92 % de reducción del patógeno. Esto es en función a los compuestos químicos antifúngicos presentes en la planta y debido a la susceptibilidad del hongo²⁰

El efecto inhibitorio del extracto de *S. molle* sobre el crecimiento puede deberse a la presencia de alguno de los diversos compuestos o principios activos que posee: el carvacrol; principio activo presente en el “molle”, posee actividad antifúngica y antibacteriana⁹ y los terpenoides y saponinas serían las sustancias que producen la inhibición²³. En específico, los estudios demuestran que carvacrol tiene varios sitios de acción dentro de las células y dependiendo de las concentraciones utilizadas pueden causar inhibición o inactivación de los microorganismos, afectando la pared celular y membrana celular^{23,24}. Cabe señalar, que las diferencias observadas en la curva de crecimiento (Fig. 3) y porcentaje de inhibición podría verse afectadas también por factores ambientales, cantidad de inóculo, y la susceptibilidad del hongo²⁴.

Es necesario mencionar que las concentraciones del extracto empleadas en la experimentación: 30 y 35% no presenta diferencias significativas (tabla 3), lo cual indica que al usar cualquiera de estas concentraciones se obtendría una inhibición alta de 92.62 y 93.16 % respectivamente. *S. molle*, tiene una alta capacidad de acción; al realizar las lecturas de las placas sometidas a las diferentes concentraciones de “molle” en nuestra experimentación, se observó: placa testigo y tratamiento 25 % ; formación de cuerpos de fructificación, como son los picnidios (estructuras que contiene conidios) tratamiento 30 y 35 % no se observan picnidios y la colonia se torna de color crema a levemente anaranjado, al observar al microscopio sólo se distingue la formación de hifas, asumiendo que el extracto detiene el proceso de maduración del cultivo, debido a que las hifas no tomaron el color marrón oscuro al madurar²¹. En conclusión, el extracto etanólico de las hojas *S. molle* presenta actividad antifúngica sobre *L. theobromae*, en condiciones de laboratorio, la velocidad de crecimiento de *L. theobromae* fue disminuyendo conforme aumento la concentración del extracto, y la concentración efectiva fue 30%, la misma que produjo mayor porcentaje de inhibición sobre el hongo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bravo L, Bermúdez T, Montes B. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas*, 2000; 57: 29-34
2. Montes B. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. *Rev Mexicana Fitopatol*, 1996; 14: 9-14
3. Barrera L, Bautista S. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L., sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Rev Mexicana Fitopatol*, 2008; 26: 1-8
4. Badii M, Flores A, Bravo H, Forughbakhch R, Quiróz H. Diversidad, estabilidad y desarrollo sostenible. *Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico*. UANL, Monterrey, 2000; pp.381-402.
5. Grayer R, Harborne J. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochem*, 1994; 37(1): 19-42
6. Osbourn A. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell*, 1996; 8: 1821-1831
7. Davicino R, Mattar M, Casali Y, Correa S, Pettenati E, Micalizzi B. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev Peru. Biol*, 2007; 14(2): 247-251
8. Llanos ASK. Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.). Tesis de Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. 2006
9. Chirino M, Cariac M, Ferrero A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas se *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bol San Veg Plagas*, 2001; 27: 305-314
10. Khanzada M, Lodhi M, Shahzad S. Chemical control of *Lasiodyplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pak J Bot*, 2005; 37 (4), 1023-1030
11. Cadenas GC. Fitopatógenos que afectan palta Hass y Fuerte en Luricocha y Huanta .*Anales Científicos Universidad Nacional Agraria La Molina*, 2007; 68(1): 11-17
12. Alama I, Maldonado E, Rodríguez E. *Lasiodyplodia theobromae* afectando el cultivo de palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia*, 2006; 11(2): 15-21
13. Cadenas GC. Agentes causales de enfermedades de cuello y raíces en algunos cultivos de Selva Alta Central. *Anales Científicos de la Universidad Nacional Agraria La Molina*, 2007; 68(1): 18-22
14. Montes R, Cruz V, Martínez G, Sandoval G, García R, et al. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. *Rev Mexicana Fitopatol*, 2000; 18(2): 125-131
15. Aguilar P, Navarro A, Sánchez A, Meneses M, Ávila R. Efecto antifúngico de plantas originarias del estado de Puebla sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México*, 2013; 25(1): 6-11
16. Palacios Z, Delgado G, Moreno M, Kato M, Rojas C. Actividad antifúngica in vitro de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. *Rev Peru biol*, 2009; 16(2): 209-214
17. Ramos de León N, Sanabria M, Rodríguez D, Ulacio D. Efecto del extracto etanólico de albahaca genovesa (*Ocimum basilicum* var. *Genovese*) sobre *Cercospora apii* Fressen y el tizón temprano del celery (*Apium graveolens*). *Científica UDO Agrícola*, 2012; 12(2): 472-478
18. Singh G, Singh O, De Lampasona M, Catalán C. Studies on essential oils. Chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Falvour and Fragance J*, 2003; 18: 62-65.
19. Araluce R, González N, Arévalo R, Puertas A. Utilización de cepas bacterianas para el control *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *Electrónica Granma Ciencia*, 2008; 12(3): 46-51
20. Briceño G, García J, Maselli A, Rosales L. Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. *Agronomía Tropical*, 2011; 61(2):141-148
21. Rodríguez GE. *Lasiodyplodia theobromae*: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas S.A.C. 2010
22. González E, Umana G, Felipe L. Combate de la pudrición peduncular del mango causada por *Botryodyplodia theobromae* Pat. mediante el mantenimiento de los pedicelos y el deslechado sobre láminas. *Agronomía Costarricense*, 1999; 23(1): 31-35
23. García GRM, Palou GE. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos Universidad de las Américas-Puebla. México*, 2008; 2(2): 41-51
24. Rodríguez M, Chico J. Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de chamico, *Datura stramonium*, sobre *Fusarium oxysporum* asparagi y *Stemphylium vesicarium* aislados del cultivo de espárrago, *Asparagus officinalis*, de Moche, Trujillo (Perú). *REBIOL*, 2012; 32(1): 96-103.