

EVALUACIÓN DE DOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE PROPÓLEOS EN EL CONTROL IN VITRO DE *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN EL MANGO (*Mangifera indica* L.)

EVALUATION OF TWO HIDROALCOHOLICS EXTRACTS OF PROPOLIS FOR *IN VITRO* CONTROL OF *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. CAUSAL AGENT OF MANGO (*Mangifera indica* L.) ANTRACNOSIS.

Autor(es): Lic. Tania Mulkey², Lic. Adrián Paumier², Lic. Ingrid González² y Lic. Mario Fajardo¹

1. Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera El Cano a El Chico, Km 0, Arenas, La Lisa, La Habana, CP 19190, Teléfono 202 0890.

2. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical IIFT, Cuba. Tel. 2025526

poscosecha@iift.cu

Recibido: 23-4-2014

Aprobado: 3-5-2014

RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa elaborada por varias especies de abejas melíferas (*Apis* spp.) (Gil *et al.*, 2012) a partir de los brotes y exudados de ciertas plantas. Una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, que se atribuye fundamentalmente a la presencia de flavonoides. El hongo *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) Penz. & Sacc se considera muy polimórfico y polífago, ocasiona la enfermedad conocida como la antracnosis en el mango (*Mangifera indica* L.) (Nelson, 2008 y Parra, 2008). En Cuba, se producen diferentes extractos hidroalcohólicos para su empleo en la industria farmacéutica, cosmética, alimentación y en la medicina. Sin embargo, existen escasos estudios relacionados con la aplicación de estos extractos para el control de patógenos que ocasionan enfermedades en los frutos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos extractos hidroalcohólicos de propóleos (EHP) en el control de *C. gloeosporioides* agente causal de la antracnosis en el mango.

Palabras claves: propóleos, extractos hidroalcohólicos, agente causal de la antracnosis en el mango

ABSTRACT:

Propolis is a resinous substance produced by several species of honey bees (*Apis* spp.) (Gil *et al.*, 2012) from buds and exudates of certain plants. One of the most important properties of propolis is its antimicrobial activity has been mainly attributed to the presence of flavonoids. The *Colletotrichum gloeosporoides*(Penz.) Penz. & Sacc fungus is considered highly polymorphic and polyphagous, causes the disease known as anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) (Nelson, 2008 and Parra, 2008). In Cuba, different hydroalcoholic extracts for use in the pharmaceutical, cosmetic, food and medicine are produced. However, there are a few related to the application of these extracts for the control of pathogens that cause disease in fruit studies. The aim of this study was to evaluate the effect of two propolis hydroalcoholic extracts (PHE) in the control of *C. gloeosporioides* causal agent of mango anthracnosis.

Keywords: propolis, extracts hidroalcohólic, causal agent of the anthracnosis in the mango

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia resinosa elaborada por varias especies de abejas melíferas (*Apis* spp.) (Gil *et al.*, 2012) a partir de los brotes y exudados de ciertas plantas. Una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, que se atribuye fundamentalmente a la presencia de flavonoides (pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato), ésteres bencílicos del ácido p-cumárico, mezclas de ésteres del ácido caféico, ácidos fenólicos entre otros. (Kalogeropou, 2009).

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc se considera muy polimórfico y polífago, ocasiona la enfermedad conocida como la antracnosis en el mango (*Mangifera indica* L.) (Nelson, 2008 y Parra, 2008).

La incidencia y severidad de los daños por la antracnosis en las frutas de mango afectan su calidad comercial y provocan pérdidas elevadas durante la conservación y comercialización. Su control en la pos cosecha se efectúa mediante los métodos físicos (hidrotérmico) y químico o la combinación de ambos. La inmersión de las frutas a 53°C por 5 min. y las aplicaciones de fungicidas como el Imazalil y Procloraz a 250 mg/L, 500 mg/L y 750 mg/L son recomendadas (Arias y Carrizales, 2007 y Mulkay *et al.*, 2010).

En Cuba, el mango es la fruta que más se produce en el país, representando más del 30% de la producción total de frutales (MINAG, 2007) y existe un gran interés en incrementar su comercialización hacia el mercado en fresco (frontera y exportación), pero las pérdidas durante la postproducción son elevadas, siendo una de las principales causas la incidencia de la antracnosis.

Teniendo en cuenta las tendencias actuales del consumo de frutas sin residuos químicos, otras alternativas se buscan para el control de las enfermedades poscosecha, como es la aplicación de los productos bioactivos. Diferentes estudios *in Vitro* muestran que el propóleo tiene propiedades para inhibir el crecimiento micelial en varios hongos fitopatógenos (Martínez, 2009; Palomino *et al.*, 2010 y Abramovic, *et al.*, 2012).

En Cuba, se producen diferentes extractos hidroalcohólicos para su empleo en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y en la medicina. Sin embargo, existen escasos estudios relacionados con la aplicación de estos extractos para el control de patógenos que ocasionan enfermedades en los frutos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos extractos hidroalcohólicos de propóleos (EHP) en el control de *C. gloeosporioides* agente causal de la antracnosis en el mango.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio *in vitro* se aisló el hongo *C. gloeosporioides* de frutos de mango con síntomas de antracnosis, se identificó y se conservó en el laboratorio de Patología Poscosecha del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

Los extractos hidroalcohólicos (EHP) rojo (10%) y pardo (7%) se obtuvieron en el Centro de Investigaciones Apícolas y se probaron a las concentraciones de 500 mg/L, 2000 mg/L, 3000 mg/L, 5000 mg/L y 10000 mg/L.

En enlarmeyers con 50 mL de medio papa dextrosa agar (PDA) previamente licuados se añadieron los dos EHP para cada concentración y se utilizó un enlarmeyer sin aplicación (testigo) y uno con etanol 70%. El PDA se extendió en placas Petri (5 réplicas) y después de solidificado se ubicó en el centro de cada placa un disco de 0,5 cm de diámetro de la colonia del hongo, tomados de la periferia de las colonias a partir de cultivos puros con siete días de edad.

Las placas Petri se incubaron a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días y el efecto de los dos EHP se determinó mediante las siguientes evaluaciones:

- La medición del diámetro de crecimiento de las colonias (cm) en forma diagonal con una regla acrílica graduada.
- Para la producción de conidios se tomaron 5 discos de 0,5 cm de diámetro de las colonias en la zona cercana al inóculo (3 réplicas) y se realizaron diluciones cuantitativas de 10^{-2} . Con una cámara de Neubauer y un microscopio Olympus (40x) se efectuaron los conteos (conidios/mL).
- Para la germinación de los conidios se utilizó una concentración de 10^{-2} conidios/mL, se tomaron 100 μL y se extendieron en una película con PDA más los EHP a 500 mg/L, 2000 mg/L, 3000 mg/L, 5000 mg/L 10000 mg/L y 0 mg/L (testigo) sobre portaobjetos (3 réplicas) y se incubaron a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. El porcentaje de germinación se determinó sobre la base de 100 conidios con un microscopio Olympus (40x) a las 8 horas.

Los experimentos se ejecutaron mediante un diseño completamente aleatorizado. Los datos se analizaron mediante un ANOVA Bifactorial. Las medias se compararon por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Se utilizó el programa estadístico STATISTICA Versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos EHP a las cinco concentraciones mostraron actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides*. El crecimiento del hongo se redujo significativamente en comparación con el testigo, a 5000 mg/L la colonia creció 1.84 cm con el EHPR y 1.78 cm con el EHPP, lo que representó un 73.7% y 74.5% respectivamente y a 10000 mg/L fue inhibido totalmente. La aplicación del etanol no influyó en el crecimiento del hongo (Fig.1 y Fig.2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sosa *et al.* 2000 quienes controlaron el crecimiento *C. gloeosporioides* con una solución etanólico de propóleos a 10 000 mg/L.

Otros autores reportaron la actividad antifúngica de los extractos etanólico para el género de *Colletotrichum*, pero no coinciden con los resultados expuestos en este trabajo, en cuanto a las dosis

recomendadas. Pineda *et al.*, 2010 encontraron un 30% de inhibición del crecimiento de tres aislados de *Colletotrichum* con diluciones del propóleos al 15%, 20% y 30%, mientras que Barrera *et al.*, 2012 hallaron un 57% de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* al primer día de incubación con la aplicación de extracto etanólico de propóleos a 5000 ($\mu\text{g mL}^{-1}$), sin embargo a los 6 días de incubación se redujo a 23%, lo que le confiere un efecto fungistático. También Cupull *et al.*, 2013 con extractos etanólicos de propóleos obtenidos de tres provincias de Cuba, el crecimiento de *Colletotrichum* spp se inhibió a valores de hasta 32 mm a la dosis de 400 mg/L. Por otro lado, Obasa *et al.*, 2007 encontraron una inhibición del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum lindemutianum* a concentraciones mayores al 5%.

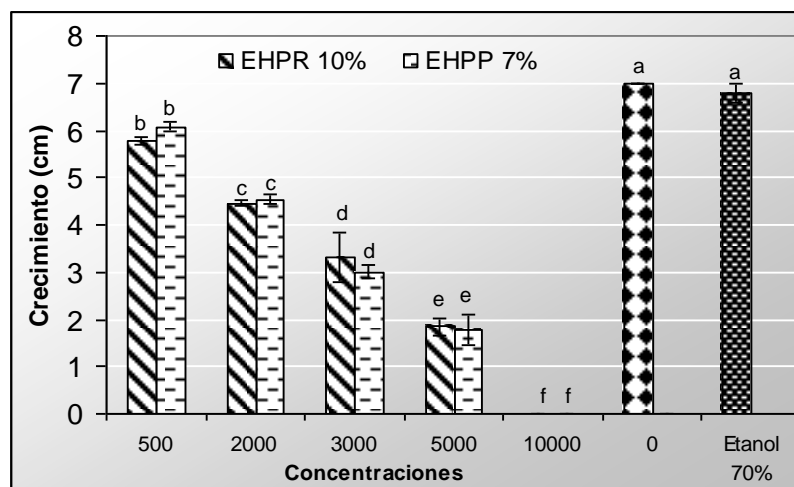


Fig.1. Efecto de los extractos hidroalcohólicos (EHP) rojo (10%) y pardo (7%) en el crecimiento de las colonias de *C. gloeosporioides*. Las barras representan las medias de crecimiento de las colonias. \pm Desviación Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Estos resultados demuestran que el control del crecimiento de los hongos del género *Colletotrichum* es mayor a medida que se incrementa la concentración del extracto de propóleos. Las diferencias en la actividad antifúngica por efecto de concentración posiblemente estén asociadas a un mayor contenido de los metabolitos bioactivos del tipo diterpénico, flavonoide y fenólico presentes en el extracto (Markham *et al.*, 1996). También, la composición de este producto de la colmena es altamente variable y dependiente de la flora local en el sitio de recolección (Marcucci 1995; Bankova *et al.*, 1996; Martínez, 2008).

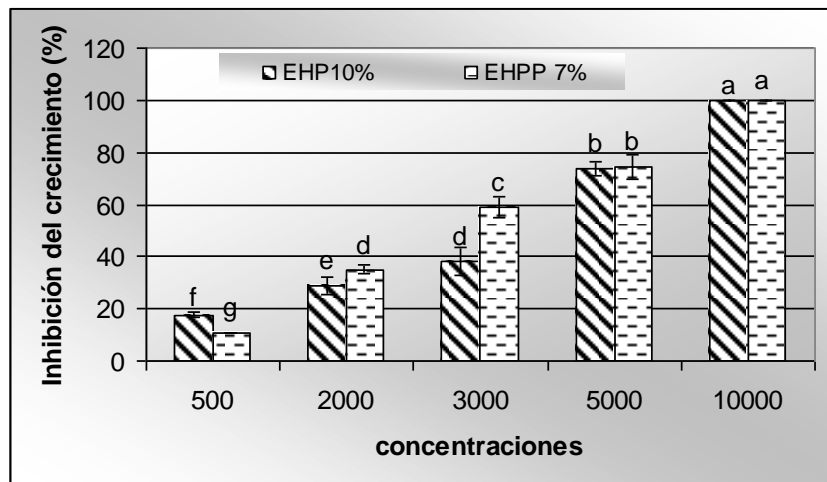


Fig.2. Efecto de los extractos hidroalcohólicos (EHP) rojo (10%) y pardo (7%) en el porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias de *C. gloeosporioides*. Las barras representan las medias del porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias. \pm Desviación Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

La producción de conidios *C. gloeosporioides* disminuyó significativamente en comparación con el testigo, los valores más bajo se observaron a partir 2000 mg/L con el EHPP. A 10 000 mg/L no hubo crecimiento de las colonias, por lo que no se produjo esporulación (Fig.3). Estos resultados son importantes teniendo en cuenta que los conidios son considerados la principal fase infectiva de este patógeno, que se trasladan fundamentalmente por el aire y el agua y se depositan en la superficie de las hojas, ramas, flores y frutos, bajo determinadas condiciones de temperatura, humedad relativa y características propias de la maduración de las frutas se produce el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, para efectos comparativos, la literatura revisada, no reporta esta determinación.

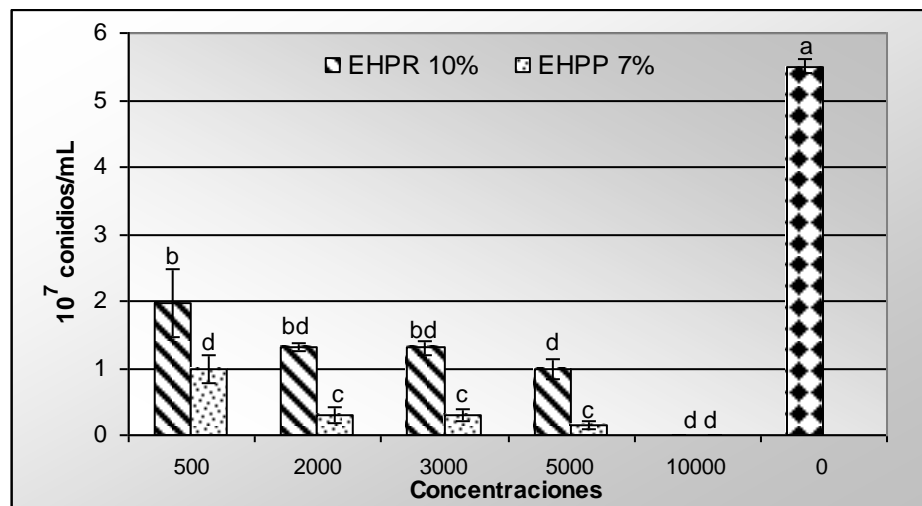


Fig. 3. Efecto de los extractos hidroalcohólicos (EHP) rojo (10%) y pardo (7%) en la conidiación *C. gloeosporioides*. Las barras representan las medias de crecimiento de las colonias. \pm Desviación Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

A las 8 horas, el EHPP redujo significativamente la germinación de los conidios de *C. gloeosporioides* en comparación con el testigo y controló a 10 000 mg/L, mientras que el EHPR controló a 3000 mg/L (Fig.4). Corrado (2008) encontró un efecto positivo en la inhibición de la germinación de *Colletotrichum* aislado de aguacate con extractos etanólicos de propóleos a 5 mg/L, resultado que no coincide con los obtenidos en este estudio en cuanto a la dosis utilizada.

La sensibilidad del *C. gloeosporioides* demostrada frente a los extractos hidroalcohólicos rojo y pardo permite señalar que la aplicación de estos productos de origen natural podrían ser una alternativa para el control este patógeno, causante de enfermedades en la poscosecha de frutas, principalmente el mango. Además se ha reportado sus efectos positivos en la combinación con otros tratamientos poscosecha que contribuyen alargar la vida de anaquel de las frutas como son la aplicación de los recubrimientos o películas comestibles (Pastor *et al.* 2010; Figueroa *et al.*, 2011).

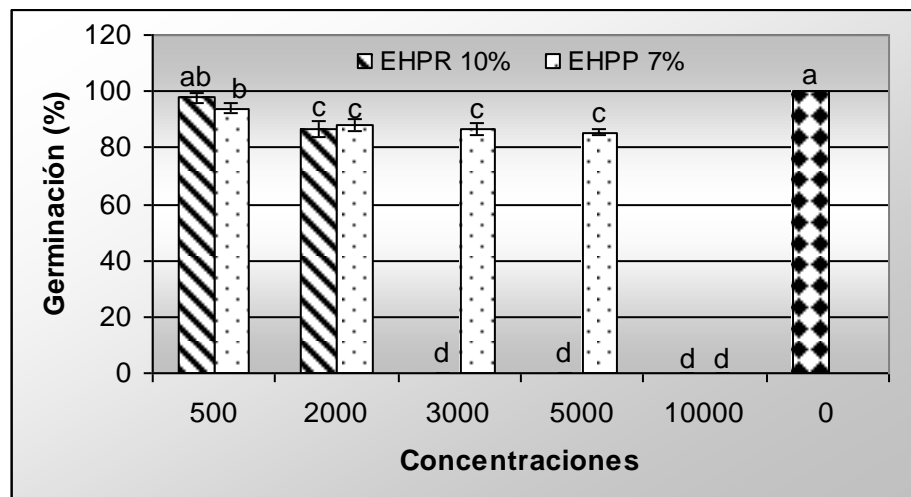


Fig. 4. Efecto de los extractos hidroalcohólicos (EHP) rojo (10%) y pardo (7%) en la germinación de los conidios de *C. gloeosporioides*. Las barras representan las medias de crecimiento de las colonias. \pm Desviación Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

- Los extractos hidroalcohólicos rojo (10%) y pardo (7%) muestran actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, la cual se manifiesta en el crecimiento de las colonias, la concentración y germinación de los conidios.
- El efecto de los extractos hidroalcohólicos rojo (10%) y pardo (7%) varía de acuerdo a la estructura somática y reproductiva de *C. gloeosporioides*.
- Los extractos hidroalcohólicos rojo (10%) y pardo (7%) a 10000 mg/L fue la concentración más efectivas en el crecimiento y germinación de *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramovic, H., Polar, T., Bertoncelj, J., Jamnik, P., Smole, S. & Jersey, B. V. 2012. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *ChemBiodivers*, 9(8):1545-1558.
2. Arias, B. y Carrizales, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el Municipio Cedeño, estado Monagas, Venezuela. *Bioagro* 19(1): 19-25.
3. Barrera, E.; Gil, M; García, C.; Durango, D.; Gil, H. 2012. Empleo de un Recubrimiento Formulado con Propóleos para el Manejo Poscosecha de Frutos de Papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana). *Rev.Fac.Nac.Agr.Medellín* 65(1): 6497-6506.

4. Bankova, V.S., Marcucci, S.; Simova, N.; Nikolova, A.; Kujumgiev, S.; Popov, S. 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung* 51(5-6): 277-280.
5. Corrado, L. 2008. Evaluation of an Ethanolic Extract of Propolis as a Potential Pre- and Post-Harvest Fungicide for 'Fuerte' Avocado (*Persea americana* Mill.) Fruits and Orchards. The Degree of Master of Science to the University of the Witwatersrand, Johannesburg. 113 pp.
6. Cupull, R.; Cortés, R.; Olazábal, E.; Hernández, C. Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Guanajato. *Acta Universitaria* 23(6):3-9
7. Figueroa, J.; Salcedo, J.; Aguas, Y.; Olivero, R.; Narvaez, G. 2011. Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva, al uso del propóleos en su formulación. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 3(2):386-399.
8. Gil, M., Perelli, A., Alvarado, R., Arias, Y.; Blumenthal, E. 2012. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Salus online*, 16(3), 29-37. Recuperado de http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/tintura_propoleos.pdf
9. Kalogeropoulos, N.; Konteles, S.; Troullidou, E.; Mourtzinou, I.; Karathanos, V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116: 452-461.
10. Marcucci, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26(2): 83-99.
11. Martínez, J. 2009. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Maestría en ciencia y tecnología de alimentos Medellín. 102 pp.
12. Markham, K.; Mitchell, K.; Wilkins, A.; Daldy, J.; Lu, Y. 1996. HPLC and GCMS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42(3), 205-211.
13. MINAGRI. 2007. Reporte Estadístico
14. Mulkay, T.; Paumier, A.; Sisino, A.; Alonso, O. y González, G. 2010. Evaluación y control de las enfermedades poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) cv Super Haden en dos regiones de Cuba. (Edición Especial) ISSN: 1665-0204 *Rev. Iber. Tecnología Poscosecha* 11(1):1-152.
15. Nelson, S. 2008. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Collage of Tropical Agriculture and Human Resource, University of Hawaii. Plant Disease*. PD-48. 10p.

16. Obasa, K.; Adeoti, A.; Enikuomehin, O.; Bodunde, J. 2007. Efficacy of Bee-Propolis in control of *Colletotrichum lindemutianum* (Sacc. and Magn.) Brosiand Cav. *in vitro*. *Research Journal on Microbiology*, 15(2): 175-179.
17. Palomino., L.; Martínez, J.; García, C. 2010. Caracterización Fisicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(1): 5373-5383.
18. Parra, L. 2008. Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y los diferentes estados de desarrollo del fruto de mango (*Mangifera indica* L.) Variedad Hilacha. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Ciencias Básicas. Bogota, Colombia. 112p.
19. Pastor, C.; Sánchez, L.; Marcilla, A.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; González, C. 2010. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropyl-methylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology* 60(1):64-70.
20. Pineda, J.; Principal., J.; Barrios, C.; Milla, D.; Solano, Y.; Gil., E. 2010. Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* *Zootecnia Trop.* 28(1): 7pp.
21. Sosa, A., Cabrera, M., Álvarez, R., Ramírez, S. y Rolin, H. 2000. Propóleos: alternativa en el control biológico de patologías fungosas de las plantas cultivadas. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.*