

GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Gliricidia sepium* Y SU POTENCIAL ANTIFÚNGICO SOBRE *Colletotrichum acutatum*

Lilia Urdaneta, María E. Sanabria, Dorian Rodríguez y María Pérez de Camacaro

RESUMEN

Gliricidia sepium es conocida en Venezuela con el nombre de 'mata ratón'. Sus extractos vegetales tienen un gran potencial como fungicidas y han sido evaluados sobre hongos fitopatógenos. Con la finalidad de definir los grupos de metabolitos secundarios presentes en esta planta, se obtuvo por rotaevaporación el extracto etanólico de hojas colectadas en Yaritagua, estado Yaracuy, Venezuela. Los alcaloides, fenoles y flavonoides fueron detectados por cromatografía de capa fina y además se determinó la presencia de saponinas y aceites esenciales. Para establecer su potencial fungicida contra *Colletotrichum acutatum*, principal causante de la antracnosis del fruto de la fresa en los estados Lara y Trujillo, se evaluó el efecto del extracto sobre el crecimiento y esporulación de siete cepas del hongo a concentraciones de 0; 1;

1,5 y 2% v/v; y sobre la severidad de dos cepas del patógeno, en frutos de fresa maduros, al 0, 5, 10, 15 y 20% v/v. Para ambos ensayos el diseño fue completamente al azar con arreglo factorial 7×3 y 2×5, respectivamente. Los resultados indicaron presencia de aceites esenciales, fenoles, alcaloides, flavonoides y saponinas en el extracto etanólico de *G. sepium*. Hubo diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las concentraciones evaluadas *in vitro*, donde aquella al 2% produjo la mayor inhibición del crecimiento micelial y la esporulación. En los frutos sólo se presentaron diferencias significativas entre 0 (testigo) y 20%. El extracto etanólico de *G. sepium* mostró potencial como fungicida y puede ser usado para el manejo ecológico de la antracnosis del fruto de la fresa.

Introducción

Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp. es una planta de la familia Fabaceae, originaria de Centroamérica y se distribuye desde México hasta el norte de Sudamérica (Hoyos, 1992). En Venezuela es ampliamente conocida en las regiones cálidas del país, donde es usada para formar cercas vivas y como alimento para ganado (Castillo *et al.*, 2005). Su nombre común 'mata ratón', es atribuido a que sus raíces producen una sustancia tóxica para estos roedores (Skerman *et al.*, 1988; Hoyos, 1992).

De los extractos de *G. sepium* se han aislado e identificado un gran número de metabolitos secundarios (MS), entre los cuales se destacan fenoles (Hochman, 1966), alcaloides (Calle *et al.*, 1987; Skerman *et al.*, 1988), flavonoides (Manners y Jurd, 1979), aceites esenciales (Joji y Beena, 2010) y saponinas (Kaniampady *et al.*, 2007). Gracias a las propiedades

alelopáticas de estos compuestos, los extractos obtenidos de esta planta tienen un gran potencial como biofungicidas y han sido evaluados sobre hongos fitopatógenos tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, aislado a partir de frutos de *Carica papaya* L. y de *Mangifera indica* L., con antracnosis (Loaiza y Rivera, 2000; Bolívar *et al.*, 2009).

La antracnosis que afecta al cultivo de la fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) es ocasionada por tres especies de *Colletotrichum* (*C. fragariae* A. N. Brooks; *C. acutatum* J. H. Simmonds y *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc) (Smith, 2008; Xie *et al.*, 2010). En Venezuela, esta enfermedad es de importancia económica, se presenta principalmente en la época lluviosa e incide negativamente en los rendimientos del cultivo, debido a que afecta, principalmente, a los frutos y los estolones, pudiendo además ocasionar la muerte de la planta (Farrera *et al.*, 2007).

Para su manejo se aplican, durante el ciclo del cultivo, grandes cantidades de fungicidas, la mayoría de los cuales son tóxicos o moderadamente tóxicos. Ante esta problemática se determinaron los grupos de MS contenidos en el extracto etanólico (EE) de hojas de 'mata ratón' y se evaluó su efecto *in vitro* e *in vivo* sobre *Colletotrichum acutatum* aislado de frutos de fresa con antracnosis.

Materiales y Métodos

Obtención del extracto etanólico de hojas de *G. sepium*

Se colectaron hojas aparentemente sanas y plenamente desarrolladas de 'mata ratón' (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) en Yaritagua, municipio Peña, estado Yaracuy, Venezuela (10°04'30.11"N, 69°7'41.73"O; 385,27msnm), en junio 2010. Las condiciones climáticas de la zona (INIA, 2011) para

ese mes fueron: precipitación 200,2mm, evaporación 201,2mm y temperaturas máxima, mínima y media de 29,6; 22,1 y 25,9°C, respectivamente.

Las hojas se secaron a la sombra y se pulverizaron con la ayuda de una licuadora convencional Oster®. El polvo resultante se pesó, se colocó en un frasco de vidrio y se agregó etanol (96%) hasta cubrirlo completamente (434,38g de polvo vegetal en 2000ml de etanol). El envase, con el contenido, fue cubierto con una bolsa plástica negra para evitar la exposición a la luz y se almacenó a 25°C. El macerado se filtró a través de papel filtro Whatman N° 1, de 11µm de retención, el filtrado se colocó en un balón de destilación y se concentró al vacío en un rotaevaporador Brinkmann®, separando el alcohol y obteniendo el extracto etanólico (EE) crudo.

PALABRAS CLAVE / Antracnosis / *Colletotrichum acutatum* / Extractos Etanólicos / Fresa / *Gliricidia sepium* /

Recibido: 18/10/2012. Modificado: 31/05/2013. Aceptado: 20/06/2013.

Lilia Urdaneta. Ingeniera Agrónoma y M.Sc. en Fitopatología, Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Profesora, LUZ. Venezuela

María E. Sanabria. Licenciada en Biología y M.Sc. en Botánica, Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela. Profesora, UCLA, Venezuela. e-mail: mesanabria@ucla.edu.ve

Dorian Rodríguez. Ingeniero Agrónomo y Ph.D. en Fitopatología, UCLA, Venezuela. Profesor, UCLA, Venezuela. e-mail: rdorian@ucla.edu.ve

María Pérez de Camacaro. Ingeniera Agrónoma y Ph.D. en Producción Vegetal, UCLA, Venezuela. Profesora, UCLA, Venezuela.

GROUPS OF SECONDARY METABOLITES IN THE ETHANOL EXTRACT OF *Gliricidia sepium* AND THEIR ANTIFUNGAL POTENTIAL ON *Colletotrichum acutatum*

Lilia Urdaneta, María E. Sanabria, Dorian Rodríguez and María Pérez de Camacaro

SUMMARY

Gliricidia sepium is known in Venezuela as 'mata ratón' ('mouse killer'). Its plant extracts have great potential as fungicides and have been evaluated on phytopathogenic fungi. In order to define the groups of secondary metabolites present in this plant, the ethanol extract of leaves collected in Yaritagua, Yaracuy State, Venezuela, was obtained by roto-evaporation. Alkaloids, phenols and flavonoids were detected in thin layer chromatography and the presence of saponins and essential oils was also determined. To establish its potential as a fungicide against *Colletotrichum acutatum*, the main cause of antrachnosis the strawberry fruits in the Lara and Trujillo States, the effect of the extract on growth and sporulation of seven strains of the fungus at concentrations of 0, 1, 1.5 and

2% v/v, and on the severity of two strains of the pathogen on mature fruits at 0, 5, 10, 15 and 20% v/v. Both essays were designed as random with factorial arrays of 7×3 y 2×5, respectively. Results indicated the presence of essential oils, phenols, alkaloids, flavonoids and saponins in the ethanol extract of *G. sepium*. There were significant differences ($P<0.01$) between the concentrations evaluated in vitro, where that at 2% produced the largest inhibition of mycelial growth and sporulation. In fruits, significant differences were only present between 0 (control) and 20%. The ethanol extract of *G. sepium* showed fungicidal potential and can be used for the ecological management of strawberries.

GRUPOS DE METABÓLITOS SECUNDARIOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Gliricidia sepium* E SEU POTENCIAL ANTIFÚNGICO SOBRE *Colletotrichum acutatum*

Lilia Urdaneta, María E. Sanabria, Dorian Rodríguez e María Pérez de Camacaro

RESUMO

Gliricidia sepium é conhecida na Venezuela com o nome de 'mata ratón', que quer dizer 'mata camundongo', e seus extratos vegetais têm um grande potencial como fungicidas e têm sido avaliados sobre fungos fito patogênicos. Com a finalidade de definir os grupos de metabólitos secundários presentes nesta planta, se obteve por rotaevaporação o extrato etanólico de folhas coletadas em Yaritagua, estado Yaracuy, Venezuela. Os alcaloides, fenóis e flavonoides foram detectados por cromatografia de capa fina. Além disso, se determinou a presença das saponinas e óleos essenciais. Para estabelecer seu potencial fungicida contra *Colletotrichum acutatum*, principal causante da antracnose do fruto do morango nos estados Lara e Trujillo, se avaliou o efeito do extrato sobre o crescimento e esporulação de sete ce-

pas do fungo em concentrações de 0; 1; 1,5 e 2% v/v; e sobre a severidade de duas cepas do patógeno, em frutos de morango maduros, ao 0, 5, 10, 15 e 20% v/v. Para ambos ensaios o desenho foi completamente aleatório com arranjo fatorial 7×3 e 2×5, respectivamente. Os resultados indicaram presença de óleos essenciais, fenóis, alcaloides, flavonoides e saponinas no extrato etanólico de *G. sepium*. Houve diferenças significativas ($P<0,01$) entre as concentrações avaliadas in vitro, onde aquela aos 2% produziu a maior inibição do crescimento micelial e esporulação. Nos frutos somente se apresentaram diferenças significativas entre 0 (testemunha) e 20%. O extrato etanólico de *G. sepium* mostrou potencial como fungicida e pode ser usado para o manejo ecológico da antracnose do fruto do morango.

Detección de metabolitos secundarios (MS) en EE de hojas de *G. sepium*

Las saponinas, aceites esenciales, alcaloides, flavonoides y fenoles se detectaron siguiendo la metodología recomendada por Marcano y Hasegawa (2002). Para las saponinas, el EE se diluyó con agua destilada (1:1), se agitó durante 1min y se dejó reposar por 20min, si la espuma persistía, se consideraba como positiva la presencia de este grupo de MS. Los aceites esenciales se detectaron por el olor característico de ellos en el material durante el proceso de obtención del EE.

Para los alcaloides, flavonoides y fenoles, se emplearon cromatofolios de sílica gel

TLC 60 F254 Merck®, 20×20cm², cortados a 6,5×2,5cm². En cada uno, a una distancia de 0,7cm de uno de los extremos se dispensaron dos gotas de 10µl cada una del EE. Luego, los cromatofolios fueron colocados en cámaras cromatográficas, con el eluyente específico para cada MS (Tabla I), hasta que el mismo alcanzó 4mm antes del borde del cromatofolio. Se colocaron tres cromatofolios por cámara, dos con el EE y uno con sólo solvente (testigo).

Efecto in vitro del EE sobre el crecimiento micelial y esporulación de *C. acutatum*

La evaluación del efecto del EE de hojas de 'mata ratón' sobre el crecimiento micelial y

esporulación del hongo se realizó con siete cepas de *Colletotrichum acutatum* (L1F5, L2F3, L3F1, Tr1F1, Tr2F3, Tr3F4 y Tr4F2), aisladas de frutos de fresas con antracnosis, identificados del 1 al 5 (F1, F2, F3, F4, F5), en tres y cuatro unidades de producción de los estados Lara (L1, L2, L3) y Trujillo (Tr1, Tr2, Tr3 Tr4) respectivamente. Las cepas evaluadas fueron reactivadas en papa dextrosa agar acidificado (PDAA) con 10 gotas de ácido láctico (88%) por cada 250ml de medio, y siete días después se utilizaron en las pruebas. El EE puro de 'mata ratón' fue obtenido el mismo día en que se realizó el ensayo y fue mezclado al medio inmediatamente después de la esterilización de éste en el

autoclave, a las concentraciones de 0; 1; 1,5 y 2% (V/V).

El medio papa dextrosa agar (PDA) con la correspondiente concentración del EE fue dispensado en platos Petri de 5cm de diámetro (5ml/plato) y una vez solidificado, en el centro de cada uno se colocó un disco de 5mm de diámetro de PDA con micelio del hongo y se incubó a 27 ±2°C. Se realizaron tres repeticiones por concentración y por cepa del hongo, y en cada plato se realizaron cuatro mediciones en direcciones diferentes. El diámetro de cada colonia fue marcado y medido diariamente por el reverso del plato, hasta que la colonia en el tratamiento testigo (sin extracto) cubrió totalmente el plato (Rodríguez y Sanabria, 2005). Con los datos del último día de

TABLA I
ELUYENTES UTILIZADOS, MÉTODO DE REVELADO Y COLORACIÓN ESPERADA EN LA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES, FLAVONOIDES Y FENOLES EN EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE 'MATA RATÓN' (*G. sepium*)

Metabolito secundario	Solvente	Revelado	Coloración (+)
Alcaloides	N-butanol:ácido acético:agua (9:2:1)	Lámpara UV	Naranja fosforescente
Flavonoides	Benceno:ácido acético:agua (12:7:2)	Lámpara UV	Blanca-verdosa fosforescente
Fenoles	Agua:ácido acético (9:1)	Cloruro de hierro (III) 1%	Parda oscura

evaluación del crecimiento micelial se calculó el porcentaje de inhibición micelial (ICM) ocasionado por cada tratamiento mediante la aplicación de la fórmula establecida por Menten *et al.* (1976).

Una vez concluido el ensayo, cuando la colonia en el tratamiento testigo cubrió totalmente el plato, tres discos con micelio y conidios del hongo de cada uno de los tratamientos se cortaron con un sacabocados de 0,5mm y se colocaron en tubos de ensayo con 10ml de agua destilada estéril, los cuales se agitaron durante 1min para cuantificar en un hematocímetro el número de conidios por mililitro de suspensión. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición de la esporulación (IE) ocasionado por cada tratamiento.

Para ambas variables (ICM e IE), se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial mixto 7×3 y tres repeticiones. El primer factor correspondió a las siete cepas (L1F5, L2F3, L3F1, Tr1F1, Tr2F3, Tr3F4 y Tr4F2) y el segundo a las tres concentraciones del EE (1, 1,5 y 2%). Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey, utilizando el programa estadístico Statistix versión 8.0 (Analytical Software, 2003).

Efecto in vivo del EE sobre la severidad de la antracnosis por C. acutatum en frutos de fresa maduros

Para la ejecución de este ensayo se utilizaron sólo dos cepas de *C. acutatum* (Tr3F4 y L1F5), las cuales fueron

seleccionadas en base a los resultados de una prueba de virulencia realizada preliminarmente, con las siete cepas que fueron evaluadas en el ensayo *in vitro*. Las cepas Tr3F4 y L1F5 fueron las que presentaron la mayor y menor severidad respectivamente.

El extracto etanólico de 'mata ratón' fue obtenido el mismo día que se realizó la prueba y fue preparado a las concentraciones de 0; 5; 10; 15 y 20% (V/V), utilizando 10ml de agua destilada estéril (ADE) contenida en frascos de 15ml de capacidad con tapas de rosca.

Se preparó una suspensión de conidios a partir de las dos cepas de *C. acutatum* reactivadas en PDA (7 días de edad), ajustando la concentración a 1×10⁶ conidios/ml. Para la realización de ésta prueba, todos los frutos utilizados fueron adquiridos en mercados informales de la ciudad de Cabudare, que de acuerdo a la información suministrada por los vendedores correspondieron a las variedades Chandler, Camarosa, Capitola, Fehr y Galexia, las cuales son todas susceptibles a la antracnosis causada por *C. acutatum* (MacKenzie *et al.*, 2006; Smith, 2008). Todos los frutos presentaban el mismo grado de madurez (estado 9) recomendado por Smith (2007) para garantizar la mayor uniformidad en su susceptibilidad a la infección por el hongo. Los frutos fueron lavados con jabón líquido y enjuagados con agua corriente, desinfectados durante 3min con hipoclorito de sodio al 1,5%, lavados tres veces en ADE y secados con papel absorbente estéril.

Para la aplicación de cada una de las concentraciones del EE se colocaron 25 frutos desinfectados en bandejas de anime de 25×20cm donde el EE fue asperjado sobre los frutos con una asperjadora manual. Una hora después se colocaron cinco frutos en bandejas plásticas transparentes de 10×8,5×5cm con tapas de cierre hermético, las cuales contenían mallas metálicas colocadas sobre papel absorbente humedecido con ADE. Las bandejas se colocaron en una cámara de crecimiento a 22-23°C y 12h luz/oscuridad, donde se procedió a la inoculación de los frutos aplicando 50µl de la suspensión de conidios y permanecieron herméticamente cerradas por 48h (incubación): Se realizaron observaciones diarias hasta que se expresaron los síntomas característicos de la antracnosis (cinco días). Los frutos de fresa enfermos fueron seccionados longitudinalmente y fotografiados con un cámara Cyber-shot DSC-W70 de 7,2 megapixels, para determinar el área total del fruto (dos caras) y el área total necrosada, y así calcular el porcentaje de severidad utilizando el software ImageJ (ImageJ, 2009). Dado que la unidad experimental estaba constituida por cinco frutos de fresa por bandeja, se promedió la severidad de los frutos que llegaron al final de la prueba.

El ensayo fue realizado dos veces para las dos cepas del hongo evaluados, bajo las mismas condiciones de la cámara de crecimiento. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×2×5 (2²×5) y cinco repeticiones. El primer factor correspondió al tiempo, el segundo a las dos

cepas seleccionadas (L1F5 y Tr3F4) y el tercero a las cinco concentraciones del EE evaluadas. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey, utilizando el programa estadístico Statistix versión 8.0 (Analytical Software, 2003).

Resultados y Discusión

Detección de MS en EE de hojas de G. sepium

Se detectó cualitativamente en el EE la presencia de los siguientes grupos de metabolitos secundarios (MS): isoprenoides (saponinas y aceites esenciales), alcaloides, fenoles simples y flavonoides. Estos resultados coinciden totalmente con los señalados para hojas de 'mata ratón' colectadas en los estados Lara (Pineda, 2008) y Yaracuy (Torrealba, 2006; Sivira *et al.*, 2011). Sin embargo, difieren de los obtenidos por Castillo *et al.* (2005) y por Ortiz (2010), quienes no reportaron la presencia de flavonoides en el EE de la misma planta, colectada en los mismos estados venezolanos. En las hojas de 'mata ratón' se ha reportado la presencia de los ácidos fenólicos: gálico, protocateico, *p*-hidroxibenzoico, gentísico, *B*-resorcinólico, vanílico, melilotico, siringico, para-cumárico, *m*-cumárico, orto-cumárico, ferúlico, *trans*-sinapínico y *cis*-sinapínico, y los flavonoides cumarina, kaemferol y miricetina (Griffiths, 1962; Hochman, 1966; Ramamoorthy y Paliwal, 1993). Por otra parte, Calle *et al.* (1987) señalaron la presencia de D-pinitol en las hojas de esta planta y de estos mismos órganos se han identificado una serie de compuestos aromáticos (aceites esenciales) y saponinas (Rastrelli *et al.*, 1999; Kaniampady *et al.*, 2007).

Efecto in vitro del EE de hojas de G. sepium sobre el crecimiento micelial y esporulación de C. acutatum

Todas las concentraciones del EE evaluadas (1, 1,5 y 2%) inhibieron el crecimiento micelial (ICM) y la esporula-

TABLA II
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE 'MATA RATÓN' (*G. sepium*) SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (ICM) DE SIETE CEPAS DE *C. acutatum*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Cepa	6	5.113,1	852,2	19,54	<0,01 *
Conc EE	2	30.624,4	15.312,2	351,10	<0,01 *
Cepa × Conc	12	993,5	82,8	1,90	0,0628 NS
Error	42	1.831,7	43,6		
Total	62	38.562,8			

F: prueba de Fisher, P: probabilidad de igualar el valor de F. CV= 11,47.

TABLA III
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE 'MATA RATÓN' (*G. sepium*) SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA ESPORULACIÓN (IE) DE SIETE CEPAS DE *C. acutatum*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Cepa	6	8.019,8	1.336,63	22,53	<0,01 *
Conc EE	2	9.625,9	4.812,94	81,13	<0,01 *
Cepa × Conc	12	3.258,5	271,54	4,58	<0,01 *
Error	42	2.491,7	59,33		
Total	62	23.395,8			

CV: 9,56 F: prueba de Fisher, P: probabilidad de igualar el valor de F.

ción (IE) de *C. acutatum*, mostrando diferencias significativas ($P < 0,01$) entre ellas (Tablas II y III). El efecto fue directamente proporcional a las concentraciones del EE en ambas variables (Figura 1) evidenciándose, además, que la inhibición no fue total en caso alguno. El mayor ICM (86,61%) e IE (94,69%) se obtuvieron con la concentración de 2%, seguido del 1,5%, el cual logró reducir en más del 50% el crecimiento del hongo y en más del 80% la esporulación; por otra parte, el menor ICM (33,21%) e IE (66,76%) se obtuvieron con la menor concentración aplicada (1%).

Aunque no existen reportes del efecto de los EE de hojas de *G. sepium* sobre *C. acutatum*, su efecto *in vitro* ha sido estudiado sobre *C. gloeosporioides*, causante también de la antracnosis de la fresa. En tal sentido, Bolívar *et al.* (2009)

evaluaron el efecto del EE de hojas de 'mata ratón' a la única concentración de 2,5% (ml EE/100ml PDA) sobre este hongo aislado de frutos de mango con antracnosis, reportando una mínima reducción del crecimiento micelial (ICM= 4,35%), resultados éstos que contrastan con los aquí obtenidos, ya que la mayor

concentración evaluada (2%) logró un ICM de 86,61%.

Al comparar los valores obtenidos para ICM e IE (Figura 1) se puede apreciar que todas las concentraciones del EE de hojas de 'mata ratón' evaluadas tuvieron más efecto sobre la esporulación que sobre el crecimiento micelial de las siete cepas del hongo *C. acutatum*;

mientras que la menor concentración (1%) ocasionó un ICM menor al 35%, el IE a la misma concentración fue casi del 70%. Los MS presentes en los EE de 'mata ratón' tienen propiedades alelopáticas que han sido evaluadas con diversos hongos fitopatógenos, especialmente fenóles y alcaloides, por lo que éstos podrían ser los responsables de inhibir el crecimiento micelial y la esporulación de *C. acutatum* (Ramamoorthy y Paliwal, 1993; Hernández *et al.*, 2007).

En otro trabajo (aún no publicado) se

encontró una alta concentración del ácido orto-cumarico y cumarina en el extracto etanólico de *G. sepium*; al exponer el hongo a estos metabolitos se logró una disminución del crecimiento micelial del 98 y 100%, respectivamente; por lo que estos compuestos podrían estar involucrados en el efecto fungicida del extracto. Los extractos acuosos y etanólicos de los diferentes órganos de 'mata ratón' han sido también utilizados para evaluar *in vivo* e *in vitro* su potencial biocida contra hongos fitopatógenos, en diversos cultivos de interés agronómico, como es el caso de *Colletotrichum* spp., *Corynespora cassicola*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Loaiza y Rivera, 2000; Martín *et al.*, 2003; Torrealba, 2006; Pineda, 2008; Bolívar *et al.*, 2009).

En la Figura 2 se aprecia el comportamiento diferencial que presentaron las cepas de *C. acutatum* al exponerlas al EE de *G. sepium*, siendo Tr2F3 la más sensible con un ICM y una IE (promedio de las tres dosis) de 70,23 y 97,86%, respectivamente; mientras que L3F1 fue la más resistente al EE, ya que presentó el menor ICM e IE, 43,95 y 63,03%, respectivamente. En el caso de Tr3F4 se pudo apreciar que el efecto del EE sobre reducción de la esporulación fue más drástico que en el desarrollo micelial (IE= 97,43% e ICM= 49,88%). Este comportamiento diferencial ante el EE indica la variabilidad genética de las cepas de *C. acutatum*, lo cual resulta en la reducción de su sensibilidad al compuesto químico (Damicone, 2004) y, en este caso, a los grupos de MS presentes en el EE. En tal sentido, Freeman *et al.* (2001) señalaron que existe una extensa diversidad genética y heterogeneidad dentro de *C. acutatum*.

Efecto in vivo del EE de hojas de G. sepium sobre la antracnosis por C. acutatum en fresa

En el análisis de la varianza (Tabla IV) para el factor tiempo y sus interacciones con los

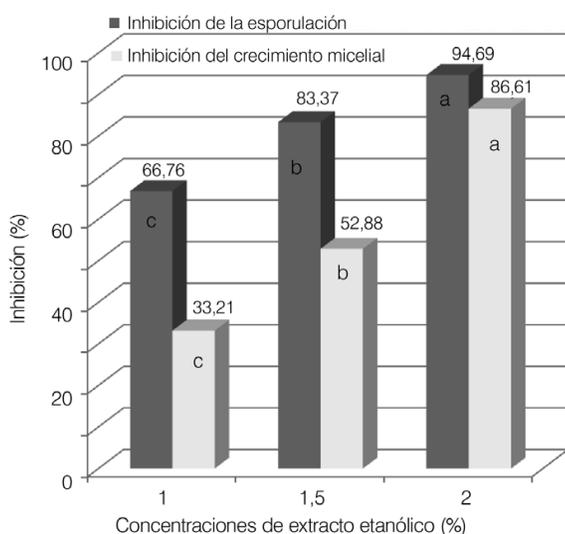


Figura 1. Inhibición promedio del crecimiento micelial (ICM) y de la esporulación (IE) de siete cepas de *Colletotrichum acutatum* ante el efecto de tres concentraciones del extracto etanólico de hojas de 'mata ratón' (*Glicidida sepium*). Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey ($P \leq 0,05$).

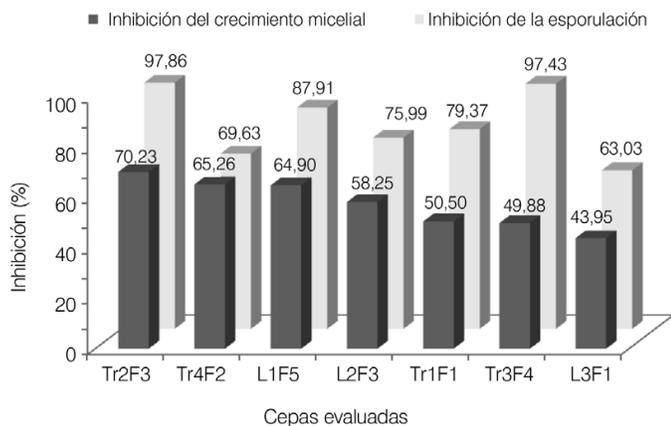


Figura 2. Inhibición del crecimiento micelial (ICM) y de la esporulación (IE) por cepa de *Colletotrichum acutatum* evaluada ante el extracto etanólico de hojas de ‘mata ratón’ (*G. sepium*). L1F5: Lara, finca 1, fruto 5; L2F3: Lara, finca 2, fruto 3; L3F1: Lara, finca 3, fruto 1; Tr1F1: Trujillo, finca 1, fruto 1; Tr2F3: Trujillo, finca 2, fruto 3; Tr3F4: Trujillo, finca 3, fruto 4; Tr4F2: Trujillo, finca 4, fruto 2.

TABLA IV
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ‘MATA RATÓN’ (*G. sepium*) SOBRE LA SEVERIDAD DE DOS CEPAS DE *C. acutatum* SOBRE FRUTOS DE FRESA (*Fragaria* × *ananassa* DUCH.) EN ESTADO DE MADUREZ DE CONSUMO

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Cepa	1	41,5	41,5	2,59	0,1113 NS
Conc	4	16.782,2	4195,55	262,05	<0,001 *
Tiempo	1	30,9	30,9	1,93	0,1689 NS
Cepa × Conc	4	281,6	70,41	4,40	0,0029 *
Cepa × Tiempo	1	0,9	0,9	0,06	0,8128 NS
Conc × Tiempo	4	63,4	15,86	0,99	0,4176 NS
Cepa × Conc × Tiempo	4	111,8	27,96	1,75	0,1480NS
Error	80	1280,9	16,01		
Total	99				

F: prueba de Fisher, P: probabilidad de igualar el valor de F. CV= 14,53.

factores cepa y concentración, no se presentaron diferencias significativas, por lo que el efecto de las concentraciones del EE sobre las dos cepas evaluadas fue similar para cada ejecución en el tiempo del ensayo. En la misma tabla se puede apreciar también que sólo se presentaron diferencias significativas ($P=0,0029$) para la interacción cepa por concentración, para la variable severidad de la antracnosis sobre frutos de fresa.

La Figura 3 muestra el comportamiento diferencial que presentaron las dos cepas evaluadas (L1F5 y Tr3F4) en cuanto a severidad ante el efecto de las concentraciones del EE de hojas de ‘mata ratón’; en ambos casos la respuesta a las concentraciones 5, 10 y 15% no fue

inversamente proporcional, como se esperaba, ya que a medida que éstas se incrementaron no hubo una reducción significativa de la severidad. Por el contrario, para las dos cepas, las severidades se incrementaron ligeramente, en comparación con los tratamientos testigos, a medida que aumentó la concentración del EE.

En el caso de la cepa L1F5 se apreció un incremento significativo de la severidad entre 0 y 5% (23,5 y 33,1%, respectivamente). Para las dos cepas, los mayo-

res valores de severidad se presentaron al 10% (37,5% Tr3F4 y 36,7% L1F5) aunque no existieron diferencias significativas entre las concentraciones del 5 y 15%. Estos resultados indican un efecto estimulante del EE sobre *C. acutatum* a bajas concentraciones (5, 10, 15%) y un efecto fungicida al 20%, situación que puede ser atribuida al fenómeno de hormesis, la cual según Ogunseitan (2004) es la observación de que la exposición de organismos a concentraciones subtóxicas de una sustancia puede estimular el crecimiento del mismo. En tal sentido, Ortiz (2010) reportó este fenómeno con los EE de

res de severidad de *Septoria apiicola* en plantas de céleri, lográndolos reducir a 14 y 19%, respectivamente. Pacheco (2010) también observó este fenómeno, al evaluar las dosis de 50 y 100µl de los eluatos etanólicos de *Agave cocuy* sobre el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina*, las cuales, en lugar de inhibir, estimularon el crecimiento, siendo la dosis de 150µl la que alcanzó un 5,77% de inhibición.

La concentración que logró reducir significativamente la severidad, para las dos cepas, en relación al tratamiento testigo (0%) fue la del 20%, alcanzado valores del 3,0% para Tr3F4 y de 1,8% para L1F5. Tales valores representan una disminución de la severidad de 90,26 y 92,34%, respectivamente, para cada cepa con respecto al testigo (Figura 3).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Bolívar *et al.* (2009), quienes reportaron un 30,80% de reducción del tamaño de la lesión causada por *C. gloeosporioides* en frutos de mango en postcosecha tratados con el EE de hojas de ‘mata ratón’ a 2,5%. Sin embargo, Ferreira *et al.* (2009) evaluaron los extractos hidroalcohólicos (EHA) de 11 especies de plantas medicinales a la concentración del 20% (v/v), sobre la severidad de la antracnosis en frutos de fresa poscosecha causada por *C. acutatum*; los EHA más efectivos fueron los de hojas y ramas de *Ruta graveolens* y *Artemisia absinthium*, y de los bulbos de *Allium sativum*. Del mismo modo, Ortiz (2010) determinó que el EE de *G. sepium* a la mayor concentración evaluada (19%) fue el mejor tratamiento preventivo y curativo contra el tizón tardío del céleri ocasionado por *S. apiicola*.

En la actual investigación, la concentración del 20% fue

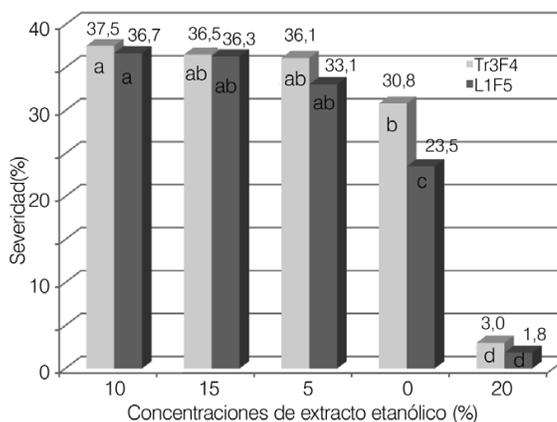


Figura 3. Severidad promedio (%) de las cepas L1F5 y Tr3F4 evaluadas ante cinco concentraciones del EE de hojas de ‘mata ratón’ (*Gliricidia sepium*). Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, Tukey ($P \leq 0,05$).

L. origanoides y *G. sepium*, los cuales a bajas concentraciones incrementaron los valo-

la única que logró reducir significativamente la severidad de la antracnosis en frutos de fresa en condiciones postcosecha. Dicha concentración constituye una dosis muy alta en comparación con la que *in vitro* indujo el mayor ICM e IE (2%). Ortiz (2010) reportó esta misma situación con el EE de esta misma planta, el cual a la concentración de 1,75% tuvo efectos fungicidas *in vitro* sobre los conidios de *S. apicola*, pero la dosis que logró reducir la severidad del tizón tardío del céleri en las pruebas fue la de 19%. Probablemente, esta diferencia entre la efectividad de las concentraciones usadas *in vitro* e *in vivo* se deba a que cuando se aplica el EE *in vivo* hay un tercer factor que participa en la interacción, que es la planta, la cual de alguna manera influye sobre la acción del EE sobre el hongo y la enfermedad que éste induce.

Conclusiones

En el extracto etanólico de hojas de 'mata ratón' se detectaron los grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, fenoles, aceites esenciales y saponinas, mostrando *in vitro* un efecto fungicida sobre *C. acutatum* a dosis muy bajas (2%), mientras que *in vivo*, logró reducir la severidad de la enfermedad sólo a la concentración del 20%. Estos resultados evidencian el potencial como fúngicida del EE de hojas de *Gliricidia sepium* para el manejo de la antracnosis del fruto de la fresa causado por *Colletotrichum acutatum*. Además, plantean la inquietud de determinar cuál es el metabolito secundario o grupo de éstos que está ejerciendo la toxicidad sobre este patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Venezuela, el aporte económico para la realización de ésta investigación, a través del proyecto CD-CHT 020-AG-2007 (Efecto del

Control Biológico y Cultural sobre Hongos y Nematodos).

REFERENCIAS

- Analytical Software (2003) Statistix for Windows. Versión 8.0. Tallahassee, FL, EEUU.
- Bolívar K, Sanabria M, Rodríguez D, de Camacaro M, Ulacio D, Cumana L, Crescente O (2009) Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc y de la antracnosis en frutos. *UDO Agrícola* 9: 175-181.
- Calle J, Rivera A, Joseph P (1987) Pinitol from the leaves of *Gliricidia sepium*. *Planta Med.* 53: 303.
- Castillo J, Sanabria M, Rodríguez D, Crescente O (2005) Metabolitos secundarios en plantas silvestres del Parque Nacional Terapaima, estado Lara. *SABER* 17: 280-281.
- Damicone J (2004) *Fungicide Resistance Management*. Oklahoma State University, f-7663. 7 p. <http://pearl.agcomm.okstate.edu/plantdiseases/f-7663.html>.
- Farrera R, Zambrano A, Ortiz F (2007) Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 24: 269-281.
- Ferreira T, Camargo M, Panizzi R (2009) Efeito de extractos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. *Summa Phytopathol.* 35: 196-201.
- Freeman S, Minz D, Maymon M, Veibil A (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. *Phytopathology* 91: 589-592.
- Griffiths L (1962) On the co-occurrence of coumarin acid, and melilotic acid in *Gliricidia sepium* and *Diptery odorata*. *J. Exp. Bot.* 13: 169-175.
- Hernández A, Bautista S, Velázquez M (2007) Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 119-123.
- Hochman H (1966) Mechanism of rodenticidal activity of *Gliricidia sepium*. Abstract. Defense Technical Information Center (DTIC). National Technical Information Service. AD0631002.
- Hoyos J (1992) *Árboles Tropicales Ornamentales Cultivados en Venezuela*. Monografía N° 38. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas, Venezuela. 272 pp.
- ImageJ (2009) *Image Processing and Analysis in Java*. <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>. (Cons. 25/09/2010).
- INIA (2011) *Agrometeorología*. Estación Yaritagua. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Venezuela. www.agrometeorologia.inia.gob.ve. (Cons. 20/07/2011).
- Joji L, Beena J (2010) Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from the bark of *Gliricidia sepium*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2: 177-179.
- Kaniampady M, Muhammed M, Jirovetz L, Mohamed P (2007) Essential composition of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and flowers. *Ind. J. Chem.* 46B: 1359-1360.
- Loaiza J, Rivera G (2000) Potencial biocida de extractos de *Gliricidia sepium*, contra organismos fitopatógenos del cultivo de la papaya (*Carica papaya*). *Agron. Costarric.* 24: 29-36.
- MacKenzie S, Legard D, Timmer L, Chandler C, Peres N (2006) Resistance of strawberry cultivars to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Florida. *Plant Dis.* 90: 1091-1097.
- Marcano D, Hasegawa M (2002) *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela., 588 pp.
- Martin A, González T, Marrero A, Millán V, Campaña H, Iglesias G (2003) Obtención de un extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud bajo irradiación con microondas. *Rev. Cub. Plant. Med.* 8: 1-3.
- Manners G, Jurd L (1979) Additional flavanoids in *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* 18: 1037-1042.
- Menten J, Machado C, Minussi E, Castro C, Kimati H (1976) Efeito de algunos funguicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. *In vitro. Fitopatol. Bras.* 1: 57-66.
- Ogunseitan O (2004) *Microbial Diversity. Form and Function in Prokaryotes*. Blackwell. New York, EEUU. 312 pp.
- Ortiz F (2010) *Etiología del Tizón Tardío del Céleri* (*Apium graveolens L. var dulce* (Miller) Pers.) y *Evaluación de su Control con Extractos Vegetales Bajo Condiciones Controladas*. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. 59 pp.
- Pacheco J (2010) *Efecto de Exudados y Extractos de Agave cocuy Trelease y Cyperus rotundus L., sobre Allium cepa, Cucumis sativus L. y Phaseolus vulgaris L. y los Hongos Fitopatógenos Fusarium oxysporum L. y Mac-*

rophomina phaseolina (Tassi) Goid. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. 59 pp.

- Pineda L (2008) *Evaluación del Efecto de los Metabolitos Secundarios de Lantana trifolia y Gliricidia sepium in vitro sobre el Crecimiento Micelial y la Formación de Esclerocios de Rhizoctonia solani AG1-1A*. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Vernezucla. 51 pp.
- Ramamoorthy M, Paliwal K (1993) Allelopathic compounds in leaves of *Gliricidia sepium* (JACQ.) Kunth Ex. Walp. and its effect on *Sorghum vulgare L. J. Chem. Ecol.* 19: 1961-1701.
- Rastrelli L, Caceres A, De Simone F, Aquino R (1999) Studies on the constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and roots: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1537-1540.
- Rodríguez D, Sanabria M (2005) Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizotomiosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que la causan. *Interciencia.* 30: 739-744.
- Sivira A, Sanabria M, Valera N y Vásquez C (2011) Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neotrop. Entomol.* 40: 375-379.
- Skerman P, Cameron D, Riveros F (1988) *Tropical Forage Legumes*. FAO Plant Production and Protection Series N° 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. Italia. 431 pp.
- Smith B (2007) Developmental stage and temperatura affect strawberry flower and fruit susceptibility to anthracnose. *NASS/NASGA Proceedings.* pp. 55-57.
- Smith B (2008) Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *HortScience* 43: 69-73.
- Torrealla S (2006) Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos etanólicos de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud y *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. y su efecto sobre el desarrollo *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. 59 pp.
- Xie L, Zhang J, Wan Y, Hu D (2010) Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang province and Shanghai city, China. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)* 11: 61-70.