

Evaluación de extractos acuosos de diferentes especies vegetales para el control *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Evaluation of aqueous extracts of various plant species for the *in vitro* control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Cesar RIVERO QUIJADA¹, María Claudia SÁNCHEZ CUEVAS¹✉ y Ramón SILVA ACUÑA²

¹Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA), Postgrado de Agricultura Tropical, Núcleo Monagas, Universidad de Oriente. *Campus* Juanico, Maturín, 6201, estado Monagas, Venezuela e ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Monagas), San Agustín de La Pica, estado Monagas
E-mail: mcsanchez@udo.edu.ve ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 27/06/2013 Fin de arbitraje: 12/09/2013 Revisión recibida: 30/09/2013 Aceptado: 24/10/2013

RESUMEN

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* es el patógeno que causa mayor daño al cultivo de la yuca. En los últimos años, con el uso de productos de origen natural se ha dado un nuevo enfoque al control de enfermedades incluyendo las bacteriosis. El objetivo fue evaluar el efecto de extractos acuosos de mamón (*Melicocca bijuga*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), rosa de berbería (*Nerium oleander*), cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) sobre la bacteriosis de la yuca. Para la preparación de los extractos se utilizaron hojas de mamón, eucalipto y rosa de berbería; bulbos de cebolla y ajo y agua destilada, para el control. Se utilizó el diseño completamente aleatorizado con seis tratamientos, cuatro repeticiones y tres placas por unidad experimental. Los 200 g de cada material vegetal se trituraron con licuadora en 1 L de agua destilada y filtrados en dos capas de gasa. Se utilizó como medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), una vez solidificado el medio, se agregó 0,5 ml de solución bacteriana ajustada a $1,2 \times 10^6$ UFC, distribuido uniformemente en la superficie de cada placa, con cuatro aberturas, donde se añadió 0,5 ml de cada extracto. Las evaluaciones del halo de inhibición se realizaron a las 24, 48 y 72 h y sus valores analizados estadísticamente y comparados por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad. Todos los extractos vegetales evaluados inhibieron el crecimiento de la bacteria y sus valores promedios fueron similares y difirieron del testigo, con el menor halo de inhibición. Los extractos acuosos de mamón, eucalipto, rosa de berbería, cebolla y ajo se presentan como alternativas válidas para el manejo integrado de la bacteriosis vascular en el cultivo de la yuca.

Palabras clave: *Xanthomonas* sp., inhibición, control *in vitro*, bacteriosis, manejo fitosanitario.

ABSTRACT

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* is the pathogen that causes greater damage to the cassava crop. In recent years, with the use of natural products has been given a new approach to the control of diseases including bacterial canker. The objective was to evaluate the effect of aqueous extracts of mammon (*Melicocca bijuga*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), rosa of berberia (*Nerium oleander*), onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) on the cassava bacterial blight of cassava. For the preparation of extracts, mammon, eucalyptus and rosa of berberia leaves and onion and garlic bulbs were used and distilled water was the control. Fully randomized design was used with six treatments and four replications and three plates per experimental unit. The 200 g of each plant material were mashed with blender in 1 L of distilled water, and filtered in two layers of cheese cloth. PDA was used as culture medium (potato dextrose agar) and once solidified, it was added 0.5 ml of bacterial solution adjusted to 1.2×10^6 cfu, evenly distributed on the surface of each plate, with four openings, where 0.5 ml of each extract were added. The inhibition zone assessments were performed at 24, 48 and 72 h and their values statistically analyzed and compared by Tukey test at 5% probability. All the tested plant extracts inhibited the growth of the bacterial and their average values were similar and differ from the control, with the lowest zone of inhibition. Aqueous extracts of mammon, eucalyptus, rosa of berberia, onion and garlic are presented as alternatives that are valid for the integrated management of vascular bacteriosis in the cultivation of cassava.

Key words: *Xanthomonas* sp., inhibition, *in vitro* control, cassava bacterial blight, plant disease management.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores limitantes de la producción de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es la bacteriosis vascular, más conocida como Cassava Bacterial Blight (CBB). Esta enfermedad se

distribuye extensamente tanto en África como en América del Sur, donde los perjuicios causados a las plantaciones comerciales de yuca, particularmente en Venezuela son de importancia económica (Verdier, 2000). El agente causal de la bacteriosis vascular es *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, un patógeno

sistémico y epífita, que se caracteriza por inducir una amplia combinación de síntomas, entre los cuales se pueden mencionar, manchas angulares en las hojas, añublo (quemazón), marchitez, exudados y lesiones en el tallo y muerte de la planta (Restrepo y Verdier, 1997). La infección de la bacteriosis vascular comienza con una fase epífita del patógeno en las hojas, que construye el inóculo, el cual incrementa de forma significativa la probabilidad de una futura infección. Normalmente el patógeno penetra en el hospedero a través de estomas y de heridas en el tejido epidermal, invade los tejidos vasculares y necrosa los tejidos parenquimatosos de hojas y cogollos. En los tejidos maduros y altamente lignificados del tallo, la bacteria está circunscrita a los tejidos vasculares. Los síntomas de la enfermedad se presentan entre 11 y 13 días después de la infección (Veronique *et al.* 1999)

Las manchas en las hojas, aparecen como áreas angulares húmedas, claramente distinguibles en la superficie inferior. La bacteria coloniza los espacios intercelulares del mesófilo foliar y se multiplica rápidamente; las manchas exudan una sustancia amarillenta y pegajosa que se concentra en gotas, principalmente en el envés (Verdier, 2000). Los exudados bacterianos se esparcen a otras plantas, cuando las gotas de lluvia caen y salpican durante la lluvia y en menor grado, mediante insectos. La multiplicación del patógeno y la consecuente producción de exudado bacteriano bloquean los tejidos vasculares, causando la marchitez de las hojas (Lozano y Booth, 1975).

La disminución de la producción causada por esta bacteriosis varía entre 30 y 80 %. Si las condiciones del medio son favorables para el desarrollo de la enfermedad y si no se adopta alguna labor del cultivo tendiente a controlarla, las pérdidas pueden alcanzar el 100%, en solo dos o tres ciclos del cultivo. Las disminuciones en la producción pueden reducirse si se utiliza una combinación de prácticas de manejo agronómico y técnicas de detección, así como también empleando variedades con resistencia varietal para la siembra. Según Lozano y Booth (1975) y Veronique *et al.* (1999), el método más efectivo para controlar esta enfermedad sería la combinación entre el uso de variedades resistentes y material de propagación libre de la bacteria. Otros procedimientos de control consisten en rotación de cultivos y el desarrollo de barbechos durante seis meses. La erradicación de las plantas infectadas es una metodología exitosa cuando las variedades sembradas presentan resistencia moderada.

Las plantas con potencial uso como agentes antimicrobianos utilizadas en el ensayo fueron seleccionadas tomando en consideración su utilidad y aplicación en actividades cotidianas, por ejemplo, la rosa de berbería (*Nerium oleander* L) es utilizada para el tratamiento del cáncer, problemas respiratorios y afecciones cardíacas y en relación a su actividad antimicrobiana, Tannua *et al.* (2012) comprobaron su efectividad al inhibir el crecimiento de la cepa *Wistar albino rats* All.; de manera similar, el extracto acuoso de ajo (*Allium sativum* L) empleado como condimento, se ha relatado su uso para inhibir el crecimiento de *Candida albican* (Perez, 2002). Para el caso de cebolla (*Allium cepa* L.) y el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) indicados para el tratamiento de la gripe común, ha sido también utilizado por medio de sus extractos para inhibición del crecimiento de *Xanthomonas phaseoli* (Stauffer *et al.*, 2000) y el mamón (*Melicocca bijuga* L), fruta de consumo tropical, Guevara *et al.* (2000), indicaron que es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas* spp.

Lo antes expuesto ratifica que solo la prevención es la única alternativa contra la bacteria causante de la bacteriosis de la yuca, pues no se recomienda la aplicación de ningún agroquímico que sea rentable y que proporcione los resultados requeridos para evitar la disminución en los rendimientos del cultivo; sin embargo, en la búsqueda de equilibrio entre el ambiente, la producción y el hombre, se ha implementado la protección de cultivos mediante productos naturales, en cuyo enfoque se considera primero, la acción específica del metabolito antimicrobiano sobre el problema fitosanitario, segundo, el impacto bajo o nulo sobre organismos circundantes y el ambiente y por último, el impacto bajo o nulo sobre el cultivo (Molina, 2001).

El objetivo fue evaluar la aplicación de los extractos acuosos de ajo, rosa de berbería, mamón, eucalipto y cebolla para el control *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de la bacteria

La bacteria se aisló de hojas de yuca var. “La Reina”, cultivadas en el Banco de Germoplasma del Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Anzoátegui (INIA). Las hojas con la sintomatología fueron llevadas al laboratorio, se cortaron trozos, con la característica de presentar una parte con manchas

angulares y la otra con parte sana; además, de las plantas muestreadas se hizo una prueba en trozos enfermos para determinar la presencia de exudado bacteriano en agua destilada. Los fragmentos de tejidos foliares fueron desinfectados sumergiéndolos en una solución de cloro al 10 %, durante 3 min, y posteriormente se lavaron tres veces en agua destilada durante 1 min, luego fueron colocados en placas de Petri, en las cuales se había vertido previamente el medio selectivo levadura, dextrosa y calcio (YDC). Las placas fueron incubadas bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz/ 12 h oscuridad, 28 °C) y observadas a las 24 horas después de la incubación, para verificar el crecimiento bacteriano. Una vez obtenido el aislamiento, se procedió a la verificación de los postulados de Koch.

Lugar de realización y disposición del experimento

El ensayo se realizó en la Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA), adscrita al Postgrado de Agricultura Tropical, ubicada en el Campus de Juanico del Núcleo Monagas de la Universidad de Oriente, Maturín, estado Monagas, Venezuela.

Para la instalación del ensayo se procedió a preparar una solución bacteriana, tomando parte del exudado formado por el crecimiento bacteriano en el medio selectivo y colocándolo con el asa de inoculación en agua destilada. En espectrofotómetro Génesis 20, modelo 4001/4, se calibró el inóculo bacteriano a la concentración de $1,2 \times 10^6$ UFC, luego se tomó 0,5 ml de la solución, con una pipeta, y se colocó en la superficie del medio, distribuido uniformemente. Se realizaron cuatro aberturas de 1,0 cm de diámetro por placa, en las cuales se colocó 0,5 ml de cada extracto y de agua destilada para el control. Las placas se colocaron en el refrigerador a 5 °C por 24 h, para que los extractos pudieran difundirse en el medio de cultivo y además, a esta temperatura se provoca retardo en el crecimiento de la bacteria (Sánchez-Cuevas, 2010). Posteriormente, las placas fueron incubadas bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz/ 12 h oscuridad, 28 °C).

Preparación de los extractos y diseño experimental

Para la preparación de los extractos se utilizaron muestras de hojas de mamón (*Melicocca bijuga* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) y rosa de berbería (*Nerium oleander* L.) colectada en el municipio Maturín del estado Monagas, y los bulbos de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del ajo (*Allium*

sativum L.) se adquirieron en el mercado Municipal de Maturín. Las muestras vegetales de hojas sanas, adultas y sin daños físicos, fueron licuadas por separado, colocando 200 g de cada parte de la planta en 1 L de agua destilada y luego se filtraron a través de dos capas de gasa para obtener el extracto de cada planta; posteriormente, cada uno fue envasado e identificado y esterilizado en autoclave HARVEY por 15 min, 15 psi y 121 °C (Chirinos *et al.*, 2009). Se utilizó el diseño estadístico completamente aleatorizado, con seis tratamientos (cinco extractos y agua destilada para el control) cuatro repeticiones, para un total de 72 placas en el ensayo y la unidad experimental constituida de tres placas. Para el análisis e interpretación de los resultados se empleó análisis de varianza y para la comparación de los tratamientos se aplicó la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad (Steel y Torrie, 1985). Los valores porcentuales de las áreas de inhibición fueron transformados en $\arcsen \sqrt{(\% \times 0,05)/100}$ para efecto del análisis e interpretación de los datos.

Medio de cultivo para el ensayo

Para la instalación del ensayo se utilizó como medio de cultivo PDA (Papa-dextrosa-agar), a razón de 1 L de la decocción de 200 g de papa, 20 g dextrosa y 15 g de agar. Todos los ingredientes se colocaron en 2 erlenmeyer de 500 mL de capacidad y mantenidos sobre agitación constante y a la temperatura de 100 ± 2 °C en calentador-agitador Orbital PC-351. Una vez homogenizado, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave Harvey por 15 min, 15 psi y 121 °C (Chirinos *et al.* 2009) y fue vertido en placas de Petri dentro de una cámara de flujo laminar. La cámara de flujo recibió asepsia, previamente con cloro comercial al 10 %.

Evaluaciones del efecto de los extractos

Las observaciones se realizaron a las 24, 48 y 72 h, con el objetivo de verificar la formación del halo de inhibición alrededor de cada abertura, donde se colocaron los extractos. Las evaluaciones culminaron cuando la bacteria colonizó toda el área del cultivo en las placas del tratamiento testigo, lo cual ocurrió a las 72 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las 72 horas de la incubación se realizó una observación de todo el ensayo y se pudo constatar la formación de halos de inhibición alrededor de las aberturas realizadas en el medio de cultivo y las

cuales contenían extractos acuosos de las plantas utilizadas. A través de las áreas de inhibición del crecimiento bacteriano inducidas por los diferentes extractos evaluados, se constató diferencias entre los tratamientos en el análisis de varianza (Cuadro 1).

La comparación de los valores promedios de las áreas de inhibición de los extractos evaluados por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad (Cuadro 2) permite señalar la similitud estadística entre los extractos de ajo, cebolla, rosa de berbería, mamón y eucalipto y a su vez distintos del tratamiento testigo con agua destilada, el cual presentó la menor área de inhibición. Entre los extractos evaluados, los de mamón y cebolla presentaron las mayores áreas de inhibición del crecimiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Hubo efecto bactericida de los extractos, al constatarse los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en las áreas donde se difundió el extracto acuoso de las especies estudiadas. En las áreas de inhibición, el extracto eliminó por completo el crecimiento de las bacterias inicialmente sembradas en la superficie del medio.

Cuadro 1. Análisis de varianza del área de inhibición del aislamiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* transformada mediante $\arcsen \sqrt{(\% \times 0,05)/100}$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Tratamiento	5	15193,2	3038,64	32,76**
Error Exp.	18	1669,3	92,73	
C. V. (%)		14,15		

Error Exp: Error experimental y CV: Coeficiente de variación. ** Significativo ($p \leq 0,01$) por la Prueba de F.

Cuadro 2. Área de inhibición del crecimiento del aislamiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Tratamientos	Área de inhibición (cm ²) †
Mamón	87,13 a
Cebolla	82,14 a
Ajo	77,57 a
Rosa de berbería	75,08 a
Eucalipto	73,68 a
Control	12,70 b
Error estándar	4,41
DSH	21,54 cm ²

† Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

DSH: Diferencia Significativa Honesta

El comportamiento de los extractos evaluados en esta investigación, en función del área de inhibición, presentan tendencia similar a los resultados obtenidos por Viveros y Castaño (2006), quienes detectaron que el efecto inhibitorio de los extractos vegetales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y de neem (*Azadirachta indica* Juss) aunque variables sobre *Paracercospora fijiensis* y se observaron diferencias estadísticas significativas entre las especies vegetales y el testigo; de manera similar Barrera y García (2008) obtuvieron similares resultados sobre el crecimiento del *Fusarium* sp, en condiciones controladas. Rivera y Loaiza (1996) obtuvieron resultados similares evaluando extractos hidro-alcohólicos de *Picramnia antidesma* sub. *Fessonia*, *Platimicium pleiostachium*, *Jacquinea pungens*, *Vatairea lundeli*, *Ateleia herbert* y *Cassia emarginata*, los cuales exhibieron los menores halos de inhibición en comparación con el testigo al controlar *in vitro* las bacterias *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas solanacearum*. Stauffer *et al.* (2000) hallaron resultados excelentes al observar la formación de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, con la aplicación de los extractos acuosos de ajo, cebolla, quebracho colorado, agrial, palo santo, chirca, guayaba, eucalipto y pino. Estos resultados se ratifican en este trabajo de investigación, aun no empleando las mismas especies vegetales, pero utilizando extractos acuosos, en relación al patógeno bacteriano de la yuca.

Resultados similares fueron presentados por Fayette (2007), quien para proteger sus derechos autorales, codificó sus extractos acuosos y comprobó la actividad inhibitoria a una concentración de 250 mg/L sobre el crecimiento de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. La mínima concentración que indujo actividad inhibitoria fue de 50 mg/L, resultados que muestran que las especies vegetales de donde provienen estos extractos son potenciales fuentes de compuestos antimicrobianos y que ofrecen resultados promisorios de control de enfermedades de plantas. De forma similar, Obledo *et al.* (2004), encontraron factibilidad en la aplicación del extracto vegetal comercial Citricidal[®] provenientes de toronja (*Citrus paradisi* L.), para controlar *in vitro* la contaminación microbiana durante la producción de *Agave tequilana*.

Los resultados obtenidos por Fayette (2007), Vázquez *et al.*, (2004), Viveros y Castaño (2006), Rivera y Loaiza (1996) y Stauffer *et al.*, (2000), muestran la clara evidencia de la potencialidad de uso

que presentan los extractos vegetales en la inhibición del crecimiento de microorganismos, sean ellos hongos o bacterias *in vitro*; asimismo, es de particular importancia que ese extracto sea de fácil acceso tanto en su preparación como en la obtención de la especie de donde se extrae y que su costo sea muy bajo para no competir con el precio de algún agroquímico; en el caso que esto llegara a ocurrir, el mismo productor lo sustituiría de inmediato por las facilidades que posee para su manipulación y adquisición.

Es necesario enfocar estrategias de control empleando estos extractos vegetales pero directamente en el manejo agronómico de los cultivos en condiciones de campo para evaluar sus bondades de uso; así como también, en otras líneas la de identificar sus ingredientes activos para que en un futuro no muy lejano puedan sintetizarse químicamente y de esta manera hacerlos de uso corriente en el manejo de los cultivos en condiciones de invernaderos o campos.

CONCLUSIONES

Los extractos acuosos de ajo, rosa de berbería, mamón, eucalipto y cebolla mostraron efectividad en la inhibición del crecimiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Los extractos acuosos de mamón y cebolla presentaron los mayores halos de inhibición del crecimiento de la bacteriosis vascular de la yuca.

LITERATURA CITADA

Barrera N., L. L. y L. J. García B. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola 8 (1): 33-41.

Chirinos, J.; J. Montilla y M. C. Alfonzo Jiménez. 2009. Evaluación de la eficiencia de extractos naturales para el control *in vitro* del hongo *Sclerotium* spp. Fitopatología Venezolana 22 (2): 69.

Fayette, J. 2007. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de extractos vegetales sobre el crecimiento de una bacteria y dos hongos fitopatógenos. Trabajo de grado para Ingeniero Agrónomo. Universidad EARTH. Guácimo, Limón, Costa Rica. 41 p.

Guevara, Y.; A. Masselli y M. Sánchez. 2000. Los extractos acuosos vegetales en el control de bacterias fitopatógenas. FONAIAP Divulga 66: 36-39.

Molina, N. 2001. Uso de extractos botánicos en el control de plagas y enfermedades. Revista Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 59: 76-77.

Lozano, J. y L. Booth. 1975. Enfermedad del añublo bacterial de la yuca. Documento en línea. Disponible en: <http://www.agbioinfo.com/pathos/Gender/Cbb.htm>

Obledo V., E.; V. Flores y M. J. Cervantes. 2004. Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. *azul*) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por láser. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (3): 328-332

Pérez, D. 2002. Efecto inhibitorio de un extracto acuoso de ajo sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. Universidad Francisco Marroquín, Guatemala. 51 p.

Restrepo, S. y V. Verdier. 1997. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. Plant Pathology 47: 601-606.

Rivera, C. y J. Loaiza. 1996. Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales sobre las bacterias *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas solanacearum*. X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, III Congreso Nacional de Fitopatología y II Congreso Nacional de Suelos. Memorias San José, Costa Rica del 8-12 Julio 1996. V. 2, p. 118. San José, Costa Rica.

Sánchez Cuevas, M. C. 2010. Metodología para la realización de bioensayos empleando extractos de plantas. Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Oriente, Núcleo Monagas. 15 p.

Stauffer, B. A.; A. Orrego y A. Aquino. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología 1 (2): 29-33

Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1985. Bioestadística. Principios y procedimientos. McGraw-Hill, Bogotá, Colombia. 220 p.

Tannua, G.; A. K. Gupta, S. Kumar and K. Singh. 2012. Anti-microbial activity of *Nerium oleander* stem extract. International Journal Of Pharma Professional's Research. 3 (4): 674-675.

Verdier, V. 2000. Bacteriosis vascular o añublo bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Disponible en: www.narth.com/docs/extractos.pdf

Veronique, J.; M. Fregene, M. Bonierbale, J. Tohme and V. Verdier. 1999. Molecular genetic mapping of resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in *cassava*. Plant & Animal Genome XVII Conference January 17-21. Town & Country Hotel, San Diego, California, United States of America.

Viveros, F. J. y Z. J. Castaño. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Agronomía (Colombia) 14 (1): 37-50.