

Actividad antifúngica de extractos de propóleos sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*: alerta fitosanitaria en la industria del Banano

Antifungal activity of propolis extracts on the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*: phytosanitary alert in the Banana industry

María Paula Becerra-Miranda¹, Tatiana María Rendón-Londoño¹

Resumen

El banano es el tercer producto agrícola de mayor exportación en Colombia, y, por consiguiente, representa un cultivo de gran trascendencia socio-económica para el país. Genera cerca de 160.000 empleos entre directo e indirectos, así como ingresos, que, según el reporte de la Coyuntura Bananera, superaron los US \$800 millones en el 2018. A lo largo de los años, las zonas bananeras se han enfrentado a ciertos fitopatógenos que han afectado considerablemente los cultivos, generando a millonarias pérdidas económicas. *Fusarium oxysporum f. sp.*, es un hongo que desde los últimos años ha venido tomando relevancia científica ya que las afecciones que genera en un cultivo de musáceas son devastadoras y su gran resistencia a los controles existentes dificulta su manejo, sobreviviendo incluso por más de 30 años en el suelo. Por tal razón, se hace necesario encontrar alternativas biológicas para el manejo de ese fitopatógeno, por lo que en el presente trabajo se mencionan las propiedades antifúngicas de extractos de propóleo y su posible uso contra Foc4, mediante la implementación del Método de Referencia Estándar CLSI M38A2, teniendo como modelo extractos de propóleo provenientes de dos zonas del departamento de Antioquia, Colombia.

Palabras claves: banano, fitopatógeno, *Fusarium oxysporum f. sp.*, control biológico, propóleo.

Abstract

Bananas are the third most exported agricultural product in Colombia and, for this reason, represent a crop of great socio-economic significance for the country. It generates about 160,000 jobs between direct and indirect employees, as well as a considerable income to the Colombian economy, which, according to the "Coyuntura Bananera" report, exceeded the US \$ 800 million in 2018. Over the years, banana crops have faced specific plant pathogens that have affected crops, generating millionaire economic losses. *Fusarium oxysporum f. sp.*, is a fungus with a scientific relevance since the last few years because of the affections that it causes in the cultivation of Musaceae. This fungus is devastating in Plantain crops with high resistance to controls and difficult to manage, which may survive on crop fields for more than 30 years in the soil. It is desirable, though, to find natural alternatives for the management of this phytopathogen. In this work, we want to find antifungal compounds in Colombian propolis against *Fusarium oxysporum f. sp.* Race 4 (Foc4). We suggest the implementation of the Reference Method CLSI M38A2 to measure the antifungal activity of propolis extracts from two Colombian regions of the department of Antioquia, against Foc4.

Keywords: banana, phytopathogen, *Fusarium oxysporum f. sp.*, biological control, propolis

¹ .Estudiantes del curso seminario de investigación Química Farmacéutica, Universidad CES, Medellín, Colombia

INTRODUCCIÓN

El banano es un cultivo de trascendencia socio-económica, ya que sus frutos son considerados alimentos básicos y a la vez, constituyen una fuente generadora de altos ingresos económicos en donde se cultiva y comercializa, a través de la generación de un alto número de empleos directos e indirectos. (Horta, 2009; Ploetz, et al, 2015).

En Colombia, la Coyuntura Bananera reportó que para el año 2018 las exportaciones de la industria sumaron US \$868,7 millones, siendo el banano el tercer producto agrícola de mayor exportación y cuyos principales destinos se encuentran en la Unión Europea. Además, genera cerca de 160,000 empleos entre directos e indirectos (AUGURA, 2018).

En las zonas productoras de banano se presentan diversos problemas fitosanitarios causados por plagas y enfermedades que afectan los cultivos en mayor o menor grado de severidad y cuyo manejo suele ser difícil; asimismo conllevan al uso y abuso de agroquímicos, que a su vez, pueden llegar a causar afectaciones a la salud humana, así como a daños ambientales (Silva et al., 2016; Gamez, et al, 2019) (Rossi, 2013)

Entre las principales enfermedades que atacan este cultivo se encuentran Sigatoka Negra causado por el hongo *Mycospherella fijiensis* (Churchill, 2011), Moko ocasionada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Cardozo, et al, 2009), Mal de Panamá y Foc4, ambas causadas por *Fusarium oxysporum* (REPCar, 2009).

Fusarium oxysporum raza 4 o *Foc4* es una de las enfermedades más destructivas del cultivo del banano, conocida como Mal de Panamá (Dita, et al, 2018), esta se caracteriza por atacar las raíces e invadir el sistema vascular de la planta, impidiendo su normal alimentación y una progresiva deshidratación, genera marchitez y amarillamiento de la hoja, haciendo que los racimos se desarrollen de forma anormal y provoquen la muerte de la planta (Figura 1). Su importancia radica en la dificultad en combatirla y por ende en eliminarla, ya que dicho hongo tiene la habilidad de sobrevivir durante largos períodos de tiempo sobre los restos vegetales de estas plantas y presenta colonias de rápido crecimiento, además queda siempre dispuesto a infectar nuevos cultivos debido a su persistencia en suelos y de su fácil propagación en agua y en partículas de barro procedentes de zapatos, herramientas y ropa sucia, generando grandes pérdidas económicas (BBC, 2013; Blesa Rodríguez & Fernández Caldas, 1973; Gordon, 2017; Silva et al., 2016)



Figura 1. Síntomas del Mal de Panamá. (A) Amarillamiento de hojas desde el borde hacia la nervadura central y de las hojas nuevas a las viejas. (B) Colapso de hojas por la base, quedando colgadas. (C) Coloraciones marrones y rojizas en tejidos internos de la planta. Tomado de: ICA, 2019.

Con base a la especificidad patogénica de *Fusarium oxysporum*, este se subdivide en cuatro razas fisiológicas; raza 1, raza 2, raza 3 y raza 4, siendo esta última la más agresiva ya que tiene la capacidad de destruir el 80% de las especies de banano y plátano comercializadas a nivel mundial, además contamina los campos de cultivo por más de 30 años; debido a esto, representa una gran amenaza mundial (Bosland, 1988; ICA, 2019; Ploetz, 2015).

En Colombia la siembra de musáceas ocupa un área de 561.922 hectáreas, de las cuales el 11.27% son para exportación y las restantes constituyen la base de la alimentación de millones de colombianos. Es por ello que desde el año 2013 *Fusarium oxysporum* raza 4 es una plaga reglamentada en Colombia mediante una resolución ICA (ICA, 2015), y junto con La Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA) diseñaron un plan de acción para salvaguardar la industria bananera colombiana, especialmente en Urabá, Magdalena y la Guajira. Pero en esta última región, a mediados del año 2019, laboratorios holandeses confirmaron la presencia de este fitopatógeno, haciendo que las autoridades competentes incrementaran los controles en cada una de las zonas productoras de banano del país (ICA, 2019).

Actualmente no existe un control químico, biológico o genético para contrarrestar su acción patogénica. Aunque, en los últimos años, productos como quitosano, bacteriocinas, aceites esenciales, propóleos, entre otros, han surgido como una alternativa a los métodos de control microbiano tradicionales, debido a las ventajas, como son los bajos costos, biodegradabilidad y biocompatibilidad, que presenta la utilización de productos de origen natural (ICA, 2019; Barragán, et al, 2016).

El propóleo es una sustancia de origen natural, resinosa, gomosa y balsámica colectada por las abejas y es ampliamente empleado por sus múltiples beneficios y actividades biológicas (Biological Chemistry Laboratory, 1994). Su nombre proviene de raíces griegas *pro* (en defensa de) *polis* (Ciudad) dado a los usos que desde la antigüedad se popularizaron; los Egipcios, por ejemplo, lo empleaban para embalsamar cadáveres al observar su potente efecto antiputrefactivo e incluso en la época Romana, los soldados lo llevaban

como medicamento de emergencia para sanar las heridas de guerra. Con el pasar de los años y el avance de la ciencia, se pudo ampliar la visión de sus propiedades, antioxidantes, antibacteriana, antifúngicas, inmunomoduladoras, antitumorales, antiinflamatorias, cariostáticas, antivirales e incluso ha emergido su uso en la industria alimenticia como conservante natural. Cabe mencionar, que su actividad biológica, estrechamente ligada a su composición química, depende de su origen geográfico, ya que está influenciado por la flora circundante en la colmena, las condiciones climáticas y el proceso o método por el cual sea recolectado (Julian Martínez, 2009). Se considera que este material vegetal puede ser una alternativa para el control de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* raza 4 (Barragán, et al, 2016), (Esquivias, Calleros, Ponce, & Lourdes, 2008), (Jesús Viloría Barragán, 2016) debido a que se ha demostrado efectos inhibitorios de crecimiento en especies de *Colletotrichum*, *Aspergillus spp* y *Penicillium spp* (Julian Martínez, 2009), incluso contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, (Manzo, et al, 2019) el cual constituye otro de los grandes retos de la industria bananera dado que es el agente causal de la enfermedad foliar Sigatoka Negra, que conlleva a millonarias pérdidas económicas en países a nivel mundial, incluido Colombia (Douglas Marin, 2003) (Chica, R; Herrera, M; Jiménez, I; Lizcano, S; Montoya, J; Patiño, L; Rodríguez, P, Ruiz, L)

En Colombia se requieren métodos de monitoreo más robustos, que favorezcan la búsqueda de sustancias antifúngicas. En el presente trabajo se utilizará la cepa *Fusarium oxysporum* H3 del Grupo Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, debido a que no es posible manipular *Foc4* por protocolos del ICA (ICA 2015), pero este estudio permite tener una cepa de laboratorio a la cual se le puede realizar la evaluación de sustancias promisorias, que podrían ser enviadas a Holanda, a laboratorios como KeyGene N.V, como lo ha estado haciendo el ICA (ICA, 2019) o a laboratorios certificados donde haya la autorización de ejecutar este tipo de estudios con esta nueva amenaza mundial.

Debido al aumento de las enfermedades fúngicas y a las emergencias de hongos resistentes a los antifúngicos, el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ha elaborado guías y métodos de

referencia de susceptibilidad antifúngica. Dentro de estas se encuentra la metodología de microdilución en caldo para la evaluación de sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos (Lozniewski, 2012) que causan enfermedades invasivas y con la cual se puede determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Efectiva (CME). (Espinel-Ingroff, et al, 2009)

El presente trabajo tiene como objetivo implementar el Método de Referencia Estándar CLSI M38-A2 para el estudio de agentes antifúngicos para *Fusarium oxysporum* raza 4, utilizando una cepa de laboratorio *Fusarium oxysporum* y teniendo como modelo extractos de propóleo provenientes de dos zonas del departamento de Antioquia, Colombia

METODOLOGÍA

Microorganismo *Fusarium oxysporum*

La cepa de *Fusarium oxysporum* H3 fue obtenida del banco de cepas del Grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia; ésta fue activada en agar PDA en condiciones de oscuridad, a 26°C por 8 días y mantenida en agar PDA a una temperatura de 4°C.

Obtención de extracto de propóleo

El propóleo, fue recolectado en el suroeste del departamento de Antioquia, Colombia, específicamente en los apiarios ubicados en las veredas La Lindaja y Montebello, del municipio de Salgar. Las muestras se obtuvieron de trampas de captura de propóleos ubicadas en dos apiarios de la región mencionada. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas y conservadas en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad CES a una temperatura de -80 °C.

Para hacer la extracción del propóleo, se realizó un raspado a cada malla para obtener 20 g de propóleo por cada zona; cada muestra se llevó a un frasco y se adicionaron 100 ml de Diclorometano, dejando en disolución durante una semana (Figura 2). Después, cada muestra se filtró y finalmente se retiró el solvente mediante evaporación al vacío con rotación, para obtener los extractos de propóleo por cada zona lo más puro posible (Figura 3).



Figura 2. Preparación de las muestras de propóleo. (A) Propóleo obtenido vereda La Lindaja. (B) Propóleo obtenido vereda Montebello Abajo. (C) Muestras de propóleo con diclorometano. Tomada por María Paula Becerra.



Figura 3. Filtración de las muestras de propóleo. Tomada por María Paula Becerra

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE FUSARIUM OXYSPORUM A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPÓLEO DE DOS REGIONES DE ANTIOQUIA

Método de Referencia Estándar CLSI M38-A2 para la Determinación de la Susceptibilidad Antifúngica mediante la Técnica de Microdilución.

Con la metodología de microdilución en caldo, se pretende determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Efectiva (MEC) con la que se pueda evaluar la sensibilidad del hongo en cuestión, ante el control (Etridiazol) y los diferentes extractos de propóleo.

Preparación del antifúngico

Se seleccionó Etridiazol como control positivo. Este es un fungicida usado principalmente en *Fusarium oxysporum melani* y *Fusarium oxysporum radicylopersic*. El fungicida será preparado como solución de almacenamiento a una concentración de 5000 ppm en Dimetilsulfóxido (DMSO), de la cual se prepararán soluciones de trabajo de 1000 ppm, 500 ppm y 300 ppm.

Preparación del inóculo

La siembra del hongo se efectuó tomando la cepa *F. oxysporum* H3 y luego de realizar cortes para obtener trozos de aproximadamente 0.5 cm, se dispusieron dos de éstos por cada caja de Petri. (Figura 4). Las cajas fueron almacenadas en condiciones de poca luz por siete días.

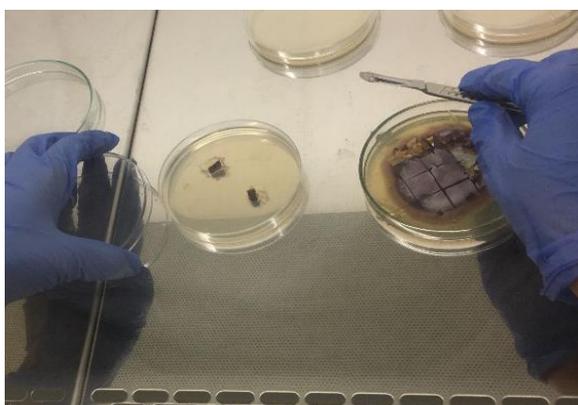


Figura 4. Siembra del hongo *F. oxysporum* H3 en las cajas de Petri.

A partir de la nueva siembra de *F. oxysporum*, se realiza un raspado del micelio y se lleva a un mortero previamente esterilizado, donde se macera y resuspende en 30 mL de agar de caldo Saboraud. La suspensión fue filtrada en una malla N° 50 y dejada en reposo por 15 minutos. Finalmente, se determina la densidad óptica en un espectrofotómetro, la cual es ajustada adicionando caldo Saboraud hasta un valor de 0.1 de absorbancia a una λ de 600 nm lo que corresponde a 4×10^8 fragmentos del micelio/mL y después se procede a inocular en los microplatos, teniendo en cuenta que es uno por cada zona evaluada (CLSI, 2008).

Cada microplato deberá contener una concentración distinta correspondiente a 100, 10, 1.0, 0.1 y 0.01 ppm, y cuya ubicación será de mayor a menor concentración iniciando desde la columna 1 hasta la 5. Los otros microplatos corresponderán a los controles que se deben tener en cuenta para asegurar que la sensibilidad del hongo si corresponda al extracto de propóleo. De esta manera se tendrá en cuenta el medio de cultivo junto el hongo como control de crecimiento, el control del DMSO con el hongo, y el medio de cultivo como control de esterilidad, que corresponderán respectivamente a las columnas 6, 7 y 8. Cada uno de los tratamientos y controles se realizan en base a 3 repeticiones y teniendo en la parte inferior de los microplatos el fungicida de referencia.

Incubación

Los microplatos fueron incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días bajo condiciones de oscuridad (CLSI, 2008).

Toma de datos y análisis de resultados

Pasados los 7 días, se realizarán las lecturas en el espectrofotómetro a una λ de 450 nm según la Norma Estándar. El cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento para cada concentración del extracto de propóleo será determinado según la (Ecuación 1). (CLSI, 2008;)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del extracto}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

(Ecuación 1)

El análisis de los resultados se lleva a cabo bajo una regresión no lineal de inhibición de crecimiento (dosis-respuesta), entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración; utilizando el programa estadístico PRISMA 8.

CONCLUSIONES

Es de suma importancia y urgencia encontrar un control biológico efectivo para combatir el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* raza 4, ya que el Mal de Panamá representa un panorama devastador para los cultivos de banano por su fácil y rápida propagación y los daños tan irremediables que genera tanto en la planta como en los suelos. Si bien los agentes antifúngicos químicos pueden llegar a ser útiles, en cualquier momento el hongo puede desarrollar resistencia a los mismos, haciendo más difícil su control.

Aunque el propóleo tiene actividad antifúngica, es necesario evaluar su efectividad con *Fusarium oxysporum* raza 4, por lo que se presentan las condiciones requeridas para llevar a cabo el ensayo mediante el método CLSI M38-A2 y la técnica de microdilución, aunque pueden considerarse otras técnicas como la evaluación de la susceptibilidad en base al halo de inhibición, lo fundamental es contar con los controles necesarios para llegar a resultados confiables.

REFERENCIAS

1. Asociación de bananeros de Colombia (AUGURA). (2018). Coyuntura bananera 2018. AUGURA. Obtenido de: <https://www.augura.com.co/wp-content/uploads/2019/04/COYUNTURA-BANANERA-2018.pdf>
2. Barragán, Jesús Vilorio, Gil-González, Jesús, Durango-Restrepo, Diego, Marín-Loaiza, Juan, & Correa-Londoño, Guillermo. (2016). ACTIVIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS DEL BAJO CAUCA ANTIOQUEÑO SOBRE DOS HONGOS FILAMENTOSOS Y UNO LEVADURIFORME. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 19(2), 333-340. Retrieved October 26, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262016000200010&lng=en&tlng=es.
3. BBC. (2013). El mal que está haciendo peligrar las bananas. Recuperado el 25 de octubre de 2019, de <https://www.bbc.com/mundo/noticias/2013/12/1>

- 31205_ciencia_epidemia_bananas_mal_de_panama_n p
4. Blesa Rodríguez, A., & Fernández Caldas, E. (1973). *Enfermedad de Panamá* [Ebook]. Madrid. Obtenido de: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/18772/1/A-NEA-1973-32-233.pdf>
5. Bornacelly Horta, H. (2009). Estudio del ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en tres clones de banano en tres regiones de la zona bananera del Magdalena (Doctora). Universidad Nacional de Colombia
6. Bosland, P.W. (1988). *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in plant pathology*, 6: 281-289.
7. Cardozo, C., Rodríguez, P., Cotes, J. M., & Marín, M. (2010). Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia) [Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia)]. *Revista de biología tropical*, 58(1), 31-44.
8. Churchill, A. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307-328. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00672.
9. CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Second Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 28(16), 1-35.
10. Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E., & Staver, C. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers In Plant Science*, 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01468
11. Espinel-Ingroff, Ana & Cantón, Emilia & Peman, Javier. (2009). Updates in antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Current Fungal Infection Reports*. 3. 133-141. 10.1007/s12281-009-0017-7.
12. Gamez, R. M., Rodríguez, F., Vidal, N. M., Ramirez, S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Mariño-Ramírez, L. (2019). Banana (*Musa acuminata*) transcriptome profiling in response to rhizobacteria: *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 and *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *BMC genomics*, 20(1), 378. doi: 10.1186/s12864-019-5763-5
13. Gordon, T. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review Of Phytopathology*, 55(1), 23-39. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095919
14. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2019). *VIGILANCIA FITOSANITARIA DE Fusarium oxysporum f.sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc R4T) EN COLOMBIA*.
15. Ploetz, R. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512-1521. doi: 10.1094/phyto-04-15-0101-rvv
16. Ploetz, R., Kema, G., & Ma, L. (2015). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annual Review Of Phytopathology*, 53(1), 269-288. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120305

17. REPCar. (2009). Identificación y manejo integrado de PLAGAS en Banano y Plátano en Magdalena y Urabá [Ebook]. Medellín, Colombia: Comunicaciones AUGURA. Disponible en: http://www.bananotecnia.com/wp-content/uploads/2018/04/identificacion_plagas_banano_colombia.pdf
18. Silva, P., de Jesus, O., Bragança, C., Haddad, F., Amorim, E., & Ferreira, C. (2016). Development of a thematic collection of *Musa* spp accessions using SCAR markers for preventive breeding against *Fusarium oxysporum* f. sp cubense tropical race 4. *Genetics And Molecular Research*, 15(1). doi: 10.4238/gmr.15017765
19. Gamez, R. M., Rodríguez, F., Vidal, N. M., Ramirez, S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Mariño-Ramírez, L. (2019). Banana (*Musa acuminata*) transcriptome profiling in response to rhizobacteria: *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 and *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *BMC genomics*, 20(1), 378.
20. Resolución ICA 3593 de 2015. Disponible en <https://www.ica.gov.co/getattachment/a6a72675-e009-42f7-8c25-89b406e494d9/2015R3593.aspx>
21. Biological Chemistry Laboratory, C. I. (1994). Propolis: chemical composition, biological. Elsevier.
22. Chica, R; Herrera, M; Jiménez, I; Lizcano, S; Montoya, J; Patiño, L; Rodríguez, P, Ruiz, L. (n.d.). Retrieved from http://www.musalit.org/viewPdf.php?file=IN050659_spa.pdf&id=9609
23. Douglas Marin, R. R. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. The American Phytopathological Society .
24. Esquivias, T. d., Calleros, G. V., Ponce, P. P., & Lourdes, M. d. (2008). Actividad fungicida de los propóleos sobre *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*.
25. ICA. (2019). ICA amplía y refuerza las medidas, que ya venía implementando, para atender la presencia de *Fusarium R4T* en cultivos de banano en La Guajira.
26. Jesús Viloria Barragán, J. G. (2016). Actividad in vitro de extractos etanólicos de propóleos del Bajo
27. Lozniewski, A. D. (2012). Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
28. Rossi, D. (2013). Los Agroquímicos usados en Las Plantaciones Bananeras y sus Efectos en el Agua, la Gente, y el Ambiente en la Comunidad de Changuinola, Bocas del Toro, Panamá. SIT.