

Obtención de extractos alcohólicos de tomillo (*Thymus vulgaris*) con capacidad de inhibir *Colletotrichum* sp. causante de la enfermedad de las cerezas del café (CBD)

Jaramillo Molina Mario Alejandro¹, Osorio E. Víctor Manuel²

¹ Estudiante de Biotecnología. Semillero SIFACS. Facultad de Ciencias de la Salud
I.U. Colegio Mayor de Antioquia

² Grupo Biociencias. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.

Introducción.

El café es uno de los cultivos más importantes en Colombia, ya que representa el segundo renglón generador de divisas para el país, correspondiente a un porcentaje alto en el PIB. Entre los aspectos que se asocian a grandes pérdidas económicas para los caficultores que, por las particularidades organolépticas del producto en taza, se cultivan hoy en día, como las variedades susceptibles como Caturra, Típica y Borbón, así como otras nuevas que se producen por cruzamientos entre éstas, son el daño que sufren las plantas por microorganismos patógenos como hongos y bacterias (Rivillas Osorio et al., 2011).

El café es particularmente sensible a las enfermedades como el CBD. Las alteraciones en las condiciones climáticas de las zonas cafeteras (precipitación, temperatura y humedad relativa, entre otros factores), han generado estrés en las plantaciones de café y han favorecido circunstancias propicias para magnificar el desarrollo de estas epidemias en las variedades susceptibles (Rivillas Osorio et al., 2011). El gran impacto que presenta la enfermedad de las cerezas del café, generada por el hongo *C. kahawae*, es la capacidad que tiene este microorganismo de atacar el fruto en todos los estados de desarrollo, desde cojines florales hasta

cerezas maduras e incluso, en ocasiones, puede llegar a afectar las hojas. Su principal daño económico lo causa al atacar frutos verdes, especialmente frutos jóvenes en desarrollo. Su control se realiza aplicando fungicidas cúpricos y orgánicos, solos o en mezclas, bajo un esquema de calendarios fijos para 6 a 8 aplicaciones al año (Gil Vallejo et al., 2002).

Esta enfermedad puede generar pérdidas hasta del 80% de la producción (Gil Vallejo et al., 2002). Bajo este panorama, el manejo biológico de esta enfermedad ha motivado el desarrollo de investigaciones orientadas a la búsqueda de estrategias amigables con el medio ambiente y menos riesgosas para la salud humana, que los fungicidas químicos. El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una de estas plantas cuyos aceites esenciales obtenidos por diferentes métodos de extracción, han demostrado actividad antifúngica contra hongos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, aunque no hay reporte sobre la capacidad de estos aceites para inhibir el crecimiento de los hongos causantes de CBD.

Metodología.

El proyecto se realizó en el Centro de Biotecnología de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia. Se compraron las plantas de tomillo en un mercado local y para el procesamiento de la materia vegetal, se secarán en estufa a 60 °C, luego se procesaron en una picadora hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo, al cual se le realizaron extracciones alcohólicas mediadas por Soxhlet, extracción en frío y asistida por ultrasonido, para la obtención de los extractos.

El aislamiento de *C. kahawae* se realizó a partir de un fruto de café con manchas negras consistente con la enfermedad. Una vez obtenidos los extractos y recuperados los microorganismos, se evaluó la actividad antifúngica del tomillo frente a *C. kahawae* por la técnica de envenenamiento por sustrato.

El hongo *C. kahawae*, se reactivó en PDA con incubación en oscuridad, durante 7-10 días a 30°C y se preparó una suspensión de 1×10^6 conidias/ml en agua con 0.1% de Tween 80. Cada extracto obtenido se adicionó a un medio PDA estéril a 43-45°C, hasta alcanzar concentraciones de 1%, 0,5% y 0,25 v/v, este agar se sirvió en cajas de Petri y se solidificó a 4°C durante una hora. Se ubicó un disco de papel filtro de celulosa de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas de agar y se inocularon 10µl de la suspensión de conidias. Se incubaron los medios a 30°C durante 14 días y se determinó la inhibición cada 24 horas (Gumus, 2010). Se usó como control positivo el fungicida carbendazim, griseofulbina y ketoconazol, como control negativo se usó el solvente utilizado para la recuperación del aceite esencial. Cada aceite será evaluado por triplicado por medio de la siguiente ecuación:

$$I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Donde I es la inhibición (%), C el diámetro de la colonia del hongo en las cajas control (mm) y T el diámetro de la colonia en cada caja que contiene el aceite esencial (mm).

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante tabulación de los datos en Excel. Se verificó el supuesto de distribución normal de los datos y de homogeneidad de varianzas y se realizó un ANOVA y pruebas de comparación múltiple de medias con una significancia del 0,05.

Resultados.

El hongo *Colletotrichum* sp. se aisló de un grano de café que presentaba manchas oscuras características de la enfermedad. Se realizó una valoración macro y microscópica que evidenció la morfología típica que se encuentra descrita en literatura para este género. Se encontraron diferencias significativas para los rendimientos según los diferentes métodos de extracción, con un nivel de

significancia del 0,05. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes métodos de extracción para los porcentajes de inhibición según una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

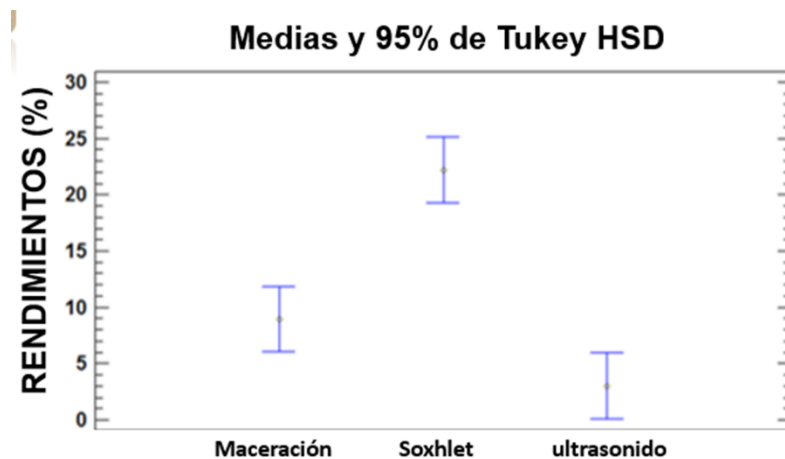


Figura 1. Rendimientos de extracción en porcentajes para cada uno de los métodos evaluados

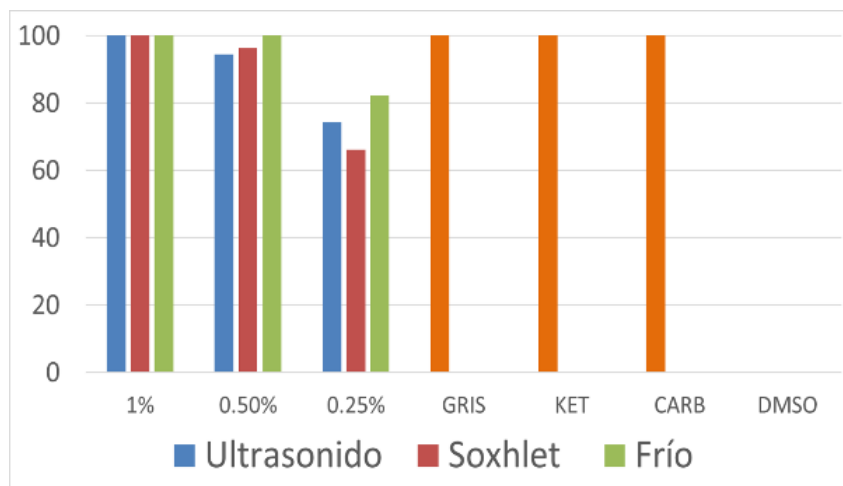


Figura 2. Porcentajes de inhibición de los extractos obtenidos frente a *Colletotrichum* sp. (GRIS: Griseofulvina, KET: ketoconazol, CARB: Carbendazim)

Conclusiones.

Por las características descritas para la enfermedad causada por *Colletotrichum* sp. se logró el aislamiento del mismo. El método que permite una mayor extracción es el método de extracción mediada por Soxhlet. No se encontró una diferencia significativa para la inhibición alcanzada con los tres métodos de extracción evaluados.

Referencias.

- Gil Vallejo, L. F., Varzea, V. M. P., & Silva, M. D. C. (2002). La enfermedad de las cerezas del café -CBD- causada por *Colletotrichum kahawae*. *Cenicafé*, 298, 8.
- Gumus, T. (2010). Determination of the changes of antifungal properties of *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* exposed to gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.07.025>
- Rivillas Osorio, C. A., Serna Giraldo, C. A., Cristancho Ardila, M. A., & Gaitán Bustamante, A. L. (2011). La roya del cafeto en Colombia: Impacto manejo y costos del control. *Boletín Técnico Cenicafé*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>