

## Daño a la membrana y respiración celular de *Passalora fulva* por extractos de hojas de *Citrus aurantiifolia*

Katia Ojito-Ramos<sup>1</sup>, Daykenis Gonzáles-Hernández<sup>1</sup>, Dianella Iglesias<sup>1,2</sup>, Orelvis Portal<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001 Loma Bonita. Cuernavaca. Morelos. México. CP 62210.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

\*Autor para correspondencia e-mail: orelvispv@uclv.cu

### RESUMEN

El moho foliar del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), producido por *Passalora fulva*, constituye un problema fitosanitario importante que afecta la producción de tomate en casas de cultivo. El uso de extractos de plantas pudiera contribuir al manejo de esta enfermedad. En este sentido, extractos etanólicos de hojas de *Citrus aurantiifolia* han mostrado actividad antifúngica frente a *P. fulva*. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un extracto de *C. aurantiifolia* en la membrana celular y la respiración de *P. fulva*. El extracto se obtuvo mediante extracción asistida por ultrasonido y se cuantificó el contenido de fenoles totales. El efecto de los extractos en la membrana celular se evaluó mediante la determinación de las concentraciones de fósforo y potasio en el medio extracelular y el efecto en la respiración, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. Las altas concentraciones de fósforo y potasio encontradas en el medio extracelular sugirieron daños en la permeabilidad de la membrana celular de *P. fulva*. De manera similar, la inactividad de la enzima succinato deshidrogenasa indicó la inhibición de la respiración celular del hongo por el extracto evaluado. Los resultados de este estudio confirmaron las propiedades antifúngicas del extracto de hojas de *C. aurantiifolia*.

Palabras clave: limón criollo, moho foliar, modo de acción

## Damage to membrane and cellular respiration of *Passalora fulva* by extracts of leaves of *Citrus aurantiifolia*

### ABSTRACT

The foliar mold of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), produced by *Passalora fulva*, constitutes an important phytosanitary problem that affects the production of tomato in greenhouse. The use of plant extracts could contribute to the disease management. In this sense, ethanolic extracts of *Citrus aurantiifolia* leaves have shown antifungal activity against *P. fulva*. The aim of this study was to determine the effect of *C. aurantiifolia* extract on the cell membrane and respiration of *P. fulva*. The extract was obtained by ultrasound-assisted extraction and the content of total phenols was quantified. The effect of the extracts on the cell membrane was evaluated by determining the phosphorus and potassium concentrations in the extracellular medium and the effect in respiration for succinate dehydrogenase activity. The high concentrations of phosphorus and potassium in the extracellular medium suggested damage in the permeability of the cellular membrane of *P. fulva*. Similarly, the inactivity of the enzyme succinate dehydrogenase indicated an inhibition of cellular respiration of *P. fulva* by the extract evaluated. The results of this study confirmed the antifungal properties of the leaf extract of *C. aurantiifolia*.

Keywords: action mode, leaf mould, lemon

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa el primer lugar de importancia en la producción hortícola cubana (ONEI, 2018). El cultivo protegido del tomate constituye un sistema de producción útil para extender los calendarios de cosecha y asegurar el suministro de frutos fresco y de calidad al mercado. Sin embargo, las condiciones climáticas y agronómicas que se presentan en estos sistemas favorecen la infección por hongos fitopatógenos como *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, que ocasiona la enfermedad moho foliar del tomate y provoca graves perjuicios a la producción (Altin, 2016; Iida *et al.*, 2018).

El manejo de la enfermedad se realiza fundamentalmente con fungicidas químicos, sustancias que poseen un elevado costo económico y ambiental, además del riesgo del desarrollo de resistencia por parte de los hongos patógenos (Altin, 2016; Watanabe *et al.*, 2017; Iida *et al.*, 2018). Una alternativa es el control biológico mediante bioproductos efectivos, que resulta respetuosa con el medio ambiente. Frente a esta enfermedad se han realizado investigaciones con microorganismos (Chen *et al.*, 2015) y extractos de plantas (Timofte *et al.*, 2017; Iida *et al.*, 2018) por su potencial como agentes de control biológico, pero estos son insuficientes. Por otra parte, aunque la introducción de genes de resistencia *Cf* en cultivares de tomate ha proporcionado un control efectivo sobre *P. fulva*, todavía se informan brotes en los países en vías de desarrollo donde se emplean cultivares sin estos genes. Además, están surgiendo nuevas razas de *P. fulva* en cultivares de tomate (Li *et al.*, 2015). En este contexto se requiere continuar las investigaciones que contribuyan al manejo integrado de la enfermedad.

En este sentido, el género *Citrus* es una importante fuente de sustancias con actividad antimicrobiana, dentro de las que se destacan los compuestos fenólicos (Al-Aamri *et al.*, 2018; Elkhatim *et al.*, 2018; Manuranjan *et al.*, 2019). Estudios realizados en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas han demostrado que extractos etanólicos de hojas de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle presentan actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos del tomate (Iglesias *et*

*al.*, 2017; Ojito-Ramos *et al.*, 2017). Sin embargo, se hace necesario demostrar los mecanismos de acción.

Atendiendo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del extracto etanólico de *C. aurantiifolia* sobre la membrana y la respiración celular de *P. fulva*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Hojas de plantas adultas de *C. aurantiifolia* recolectadas en áreas del Jardín Botánico de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba (22N25'5", 79W53'4") se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en estufa a 60 °C por 12 h. Posteriormente, se molieron y a 2 g de hojas pulverizadas se le adicionaron 20 ml de etanol al 70% (v/v). El extracto se obtuvo mediante extracción asistida por ultrasonido (Scientz Ltd., China) durante 20 min según lo referido por Ojito-Ramos *et al.* (2012). La concentración de fenoles totales se determinó por el método descrito por Elkhatim *et al.* (2018).

### Cepa fúngica

La cepa de *P. fulva* utilizada se obtuvo de la Colección de Cultivos Microorganismos del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba. *P. fulva* se mantuvo en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Difco) a 27 °C durante 21 días.

### Efecto sobre la integridad de la membrana citoplasmática de *P. fulva*

Para comprobar el efecto del extracto etanólico de *Citrus aurantiifolia* sobre la integridad de la membrana citoplasmática de *P. fulva* se determinaron las concentraciones de fósforo y potasio en el medio extracelular. Para ello, discos de 0.6 cm de diámetro de *P. fulva*, tomados de colonias crecidas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, Difco) durante 21 días a 27 °C en oscuridad, se transfirieron a medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB, Difco) y se mantuvieron en constante movimiento por 7 días, a 120 rpm y 27 °C. Posteriormente, el micelio se separó por filtración y se trituraron 0.5 g, en un homogenizador *Ultra-Turrax* T25 (Rose

Scientific Ltd.) en tampón Tris-HCl 5 mM (UniChem) pH 7.0 y la suspensión de micelio se ajustó a una concentración aproximada de  $5 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$  y se incubaron con el extracto a una concentración final de fenoles totales de 20 mg EAG  $\text{ml}^{-1}$  (Iglesias, 2012) en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.0. Como control se emplearon fragmentos de micelio en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.0 a la misma concentración. En ambos casos se incubaron durante 24 y 48 h a 27 °C en oscuridad. Posteriormente, se obtuvo el medio extracelular mediante filtrado con papel de filtro (Whatman) estéril.

La concentración de fósforo en el medio extracelular se determinó según Vásquez y Torres (1982) y Worsfold *et al.* (2016) y la de potasio en un espectrofotómetro de absorción atómica SP9 Pye UNICAM (Philips). Las determinaciones se realizaron por triplicado y cada ensayo se repitió dos veces. Los valores se expresaron en  $\text{mg l}^{-1}$ .

#### Efecto sobre la respiración celular de *P. fulva*

El efecto del extracto etanólico en la respiración celular de *P. fulva* se determinó mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH; EC 1.3.5.1). Se tomó 1 g de micelio de *P. fulva* crecido en las condiciones descritas anteriormente y se aislaron las mitocondrias de *P. fulva* por centrifugación diferencial (Ojito-Ramos *et al.*, 2017).

En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml de la fracción mitocondrial, 0.5 ml de tampón Tris-HCl 2.5  $\text{mmol l}^{-1}$  pH 4, 0 ml de succinato de sodio al 1% (m/v) (Merck), 0.5 ml de azul de metileno 0.01% (m/v) (Merck) y 1 ml del extracto a una concentración de fenoles totales 20 mg EAG  $\text{ml}^{-1}$ . En el control positivo de la respiración celular se adicionó sacarosa al 0.25% (m/v) en lugar del extracto y en el control negativo de la respiración también se adicionó sacarosa al 0.25% (m/v) en lugar del extracto y la fracción citoplasmática en lugar de la fracción mitocondrial. Posteriormente, se añadió una capa de aceite mineral y se incubó a 37 °C en baño termostático (Julabo). Se observó el cambio de coloración del azul de metileno cada 4 h durante 48 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado y el ensayo se repitió dos veces.

#### Análisis estadísticos

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con la ayuda del programa SPSS Statistics, versión 21 para Windows. En todos los casos se verificaron los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene). Los análisis de varianza se realizaron mediante la prueba H de Kruskal Wallis  $p \leq 0.05$  y U de Mann Whitney *a posteriori*  $p \leq 0.05$ .

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Efecto sobre la integridad de la membrana citoplasmática de *P. fulva*

A las 24 y 48 h de incubación de *P. fulva* con el extracto etanólico de *C. aurantiifolia*, la concentración de fósforo en el medio extracelular fue superior con respecto al control en 51.86% y 22.47%, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre los tiempos de incubación (Figura 1). De igual forma, la concentración de potasio en el medio extracelular aumentó 82.35% y 70.67% a las 24 h y 48 h de incubación, respectivamente, respecto al control (Figura 1).

Estos resultados sugieren que el extracto produjo daño a la integridad de la membrana citoplasmática de *P. fulva*. En este sentido, se ha referido que la pérdida de la permeabilidad de la membrana puede inducir la ruptura de la membrana celular. Además, los compuestos fenólicos pueden inhibir la actividad microbiana al dañar las membranas celulares, penetran en las células, interrumpen el estado redox intracelular y alteran las vías metabólicas (Chen *et al.*, 2015; Coelho-Júnior *et al.*, 2019). Otros autores han demostrado que la pérdida de iones en el micelio de *P. fulva* es un indicador de daño a la membrana, similar a los resultados de este trabajo. Por ejemplo, se ha demostrado que la actividad antifúngica de *Streptomyces albidoflavus* L131 frente a *P. fulva* (Chen *et al.*, 2015) y la actividad antimicrobiana de la silimarina, compuesto derivado de las semillas de *Silybum marianum* (L.) Gaertn, frente a varios microorganismos (Yun y Lee, 2017), implican la ruptura de la membrana con incremento de potasio en el medio extracelular. La salida de iones intracelulares al medio extracelular constituye una medida indirecta de daño a la integridad de la membrana citoplasmática de los hongos, que podría conducir a la muerte celular (Choi *et al.*, 2017).

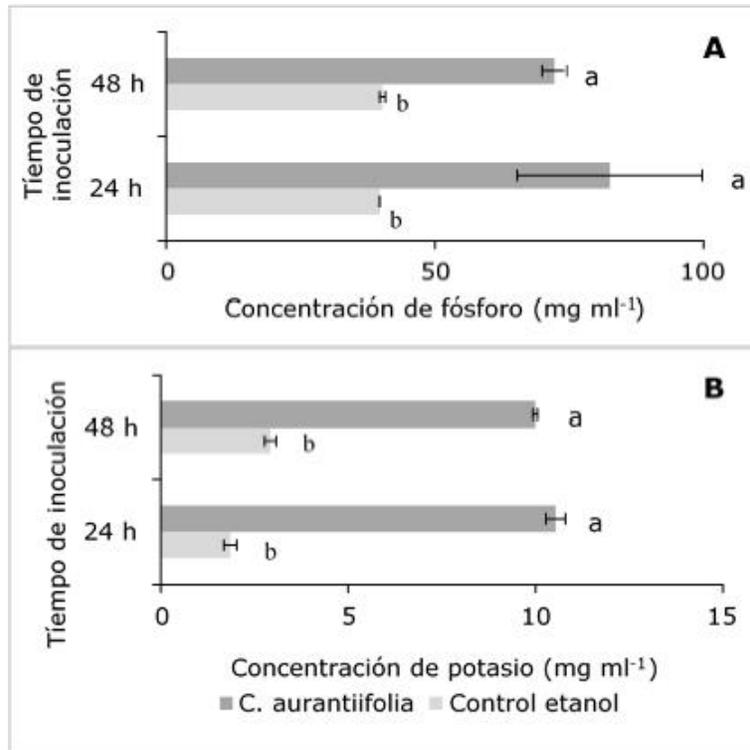


Figura 1. Concentración de fósforo (A) y potasio (B) en el medio extracelular de *Passalora fulva* incubado con extracto etanólico de hojas de *C. aurantiifolia*. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes  $\pm$  el error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias del mismo tratamiento, a diferentes tiempos de incubación, difieren significativamente para  $p \leq 0.05$  según las pruebas H de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney.

#### Efecto sobre la respiración celular de *P. fulva*

A las 48 h de incubación no se observó un cambio de coloración en el azul de metileno en los tubos donde se encontraba la fracción mitocondrial de *P. fulva* con el extracto etanólico, similar a lo observado en el control negativo de la respiración celular. Esto indicó que el azul de metileno no se utilizó como agente reductor en la reacción catalizada por la enzima SDH, lo que implica la inhibición de su actividad. Sin embargo, en el control positivo de la respiración celular se apreció la decoloración total del azul de metileno. Este resultado evidenció una posible afectación en la actividad de la enzima SDH inducida por el extracto etanólico de *C. aurantiifolia*.

La enzima SDH está unida a la membrana interna de la mitocondria, y cataliza la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico a expensas de la reducción del FAD a FADH<sub>2</sub>. Además, forma parte del complejo II de la

cadena de transporte de electrones (Nelson *et al.*, 2018). Al encontrarse las mitocondrias de *P. fulva* aisladas y expuestas al extracto etanólico de hojas de *C. aurantiifolia* pudo haber ocurrido un desacople de la enzima SDH, debido a la afectación de la integridad de la membrana que produce el extracto. De esta manera también pudo afectarse la respiración celular.

Varios son los trabajos que refieren la actividad antifúngica de *C. aurantiifolia* (Al-Aamri *et al.*, 2018; Tchameni *et al.*, 2018; Ramírez-Pelayo *et al.*, 2019), sin embargo no se encontraron evidencias en la literatura científica de su empleo frente a *P. fulva*.

Los resultados de este trabajo permiten sugerir que el daño a la membrana citoplasmática y a la respiración celular son mecanismos de acción del extracto etanólico de *C. aurantiifolia* frente a *P. fulva*. A partir de su evaluación en casa de cultivo pudiera constituir una alternativa para el manejo de este hongo fitopatógeno.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demostraron que el extracto etanólico de hojas de *C. aurantiifolia* (70%) (m/v) afecta la integridad de la membrana citoplasmática y la respiración celular de *P. fulva*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ángel Mollineda Trujillo (Centro de Investigaciones Agropecuarias) por la asistencia técnica en el uso del espectrofotómetro de absorción atómica.

## Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Altin N (2016) Identification of race 2.5 of leaf mold (*Passalora fulva*, syn. *Cladosporium fulvum*) on tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection* 123(6): 279–284; doi: 10.1007/s41348-016-0040-1

Al-Aamri MS, Al-Abousi NM, Al-Jabri SS, Alam T, Khan SA (2018) Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 13(2): 108-112; doi: 10.1016/j.jtumed.2017.12.002

Coelho-Júnior LF, Ferreira-Silva SL, Vieira MR, Carnelossi MA, Simoes AN (2019) Darkening, damage and oxidative protection are stimulated in tissues closer to the yam cut, attenuated or not by the environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(1): 334-342; doi: 10.1002/jsfa.9192

Chen C, Wang Y, Su C, Zhao X, Li M, Meng X, Jin Y, Yang SH, Ma Y, Wei D, Suh JW (2015) Antifungal activity of *Streptomyces albidoflavus* L131 against the leaf mold pathogen *Passalora fulva* involves membrane leakage and oxidative damage. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58(1): 111-119; doi: 10.1007/s13765-015-0012-3

Choi H, Kim K, Lee DG (2017) Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride

and its mode of action. *Fungal Biology* 121(1): 53-60; doi: 10.1016/j.funbio.2016.09.001

Elkhatim KAS, Elagib RAA, Hassan AB (2018) Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food Science & Nutrition* 6(5): 1214-1219; doi: 10.1002/fsn3.660

Iglesias D, Ojito-Ramos K, Rivero CL, Portal O (2017) Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Stemphyllium solani* Weber. *Centro Agrícola* 44(3): 5-12

Iida Y, Ikeda K, Sakai H, Nakagawa H, Nishi O, Higashi Y (2018) Evaluation of the potential biocontrol activity of *Dicyma pulvinata* against *Cladosporium fulvum*, the causal agent of tomato leaf mould. *Plant Pathology* 67(9): 1883-1890; doi: 10.1111/ppa.12916

Li S, Zhao T, Li H, Xu X, Li J (2015) First report of races 2.5 and 2.4.5 of *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), causal fungus of tomato leaf mold disease in China. *Journal of General Plant Pathology* 81: 162–165; doi: 10.1007/s10327-015-0577-z

Manuranjan G, Laldusanga P, Lahlhenmawia H, Bibhuti K, Thanzami K (2019) Physicochemical, antibacterial and antioxidant properties of fixed and essential oils extracted from the peels of *Citrus macroptera* Fruit. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 81(1): 82-88

Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2018) Lehninger Principles of Biochemistry 6ta Edición, OMEGA, España

Ojito-Ramos K, Herrera Y, Vega N, Portal O (2012) Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17(4): 368-379

Ojito-Ramos K, González-Hernández D, Iglesias D, Portal O (2017) Efectos de extractos de hojas de *Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka y *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle sobre la membrana y la respiración celular de *Alternaria solani* Sor. *Revista Protección Vegetal* 32(1): 68-75

- ONEI (2018) Oficina Nacional de Estadística e Información. Disponible en: <http://www.onei.cu>. Consultado 22/11/2018
- Tchameni SN, Mbiakeu SN, Sameza ML, Jazet PMD, Tchoumboungang F (2018) Using *Citrus aurantifolia* essential oil for the potential biocontrol of *Colocasia esculenta* (taro) leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae*. Environmental Science and Pollution Research 25(30): 29929-29935; doi: 10.1007/s11356-017-0506-0
- Timofte AA, Lip'a FD, Florea AM, Ulea E (2017) Antifungal activity of essential oils and homemade fungicides against *Passalora fulva*. Lucrări Stiintifice 60(1): 109-112
- Vásquez E, Torres S (1982) Manual de Fisiología Vegetal. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara
- Watanabe H, Horinouchi H, Muramoto Y, Ishiib H (2017) Occurrence of azoxystrobin-resistant isolates in *Passalora fulva*, the pathogen of tomato leaf mould disease. Plant Pathology 66(9): 1472–1479; doi: 10.1111/ppa.12701
- Worsfold P, McKelvie I, Monbet P (2016) Determination of phosphorus in natural waters: A historical review. Analytica Chimica Acta 918(1): 8-20; doi: 10.1016/j.aca.2016.02.047
- Yun DG, Lee DG (2017) Silymarin exerts antifungal effects via membrane-targeted mode of action by increasing permeability and inducing oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta 1859(3): 467-474; doi: 10.1016/j.bbamem.2017.01.009

Recibido: 16-01-2019

Aceptado: 28-02-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.