

Humberto Jorge Sarubbi Orué²Alicia Susana Aquino Jara³

X

ABSTRACT

In the laboratory of Fitopatología of the College of Agricultural Sciences of the National University of Asunción, four vegetable extracts: bulb of garlic (*Allium sativum*), seeds of Tártago (*Ricinus comunis*), horse line (*Equisetum arvense*), Lonlife (commercial product of seeds of citric) and kombucha tea were evaluated for the control of *Rhizoctonia solani*. The fungus was isolated from plants of petunia (*Petunia hybrid x*) in Petri plates with half potato-dextrosa-agar (PDA). The vegetable extracts and the kombucha tea were incorporated to culture media PDA in plates of Petri in three different dose for the control of the fungus phytopatogenic *R. solani*. The results showed that the extract of bulb of garlic at 30.000 ppm and the kombucha tea at 200.000 ppm inhibited in 100% the fungus growing.

RESUMEN

En el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA fueron evaluados cuatro extractos vegetales: bulbo de ajo (*Allium sativum*), semillas de Tártago (*Ricinus comunis*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), Lonlife (producto comercial de semillas de cítricos) y té de kombucha para el control de *Rhizoctonia solani*. El hongo fue aislado a partir de plantas enfermas de petunia (*Petunia x híbrida*), en placas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA). Los extractos vegetales y el té de kombucha fueron incorporados a un medio de cultivo PDA en placas de Petri en tres diferentes dosis para el control del hongo fitopatógeno *R. solani*. Los resultados mostraron que el extracto de bulbo de ajo a 30.000 ppm y el té de kombucha a 200.000 ppm inhibieron en 100 % el crecimiento micelial del hongo.

Key Words: Alternative control, vegetable extract, *Rhizoctonia solani* Kühn.

Palabras clave: Control Alternativo, extracto vegetal, *Rhizoctonia solani* Kühn.

0082 (563)

¹ Trabajo de Investigación presentado como requisito para la obtención del grado de Magister en Protección Vegetal, FCA-UNA.

² Ing. Agr., M.Sc., Docente Investigador a Tiempo Completo del Departamento de Producción Agrícola, FCA-UNA.

³ Ing. Agr., M.Sc., Docente Investigadora a Tiempo Completo del Departamento de Protección Vegetal, FCA-UNA.

INTRODUCCIÓN

Numerosos investigadores han reportado en los últimos años el control de diversas especies de hongos fitopatógenos con extractos vegetales. Quarles (2001), menciona que la cola de caballo (*Equisetum arvense*), posee 15 a 40 % de silica natural, sustancia que en estudios de enfermedades de cucurbitáceas, como el *damping off* y oidio, demostró un control eficiente. Ferracini et al., (1990), comprobaron *in vitro* que el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* a diluciones de 1:200 y 1:1000 inhibió la germinación de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* en un 84 a 93 % respectivamente.

En investigaciones realizadas con el hongo *Rhizoctonia spp.* Bolkan y Ribeiro (1981) mencionan que el extracto de bulbo de ajo (*Allium sativum*) a una concentración de 5.000 ppm produjo *in vitro* una inhibición del crecimiento micelial de 66,9 % del hongo *Rhizoctonia solani*. En trabajo similar, Bianchi et al., (1997), demostraron que en laboratorio el extracto de ajo a 10 mL/litro de PDA (papa-dextrosa-agar) redujo el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en un 85 %. Otros investigadores trabajando con extracto de bulbo de ajo relatan un efecto inhibitorio en laboratorio de *Rhizoctonia sp.* (Stauffer et al., 1996).

Entre los componentes del ajo se cita a la alicina (Wills, 1956), aceite volátil, considerado por Bastos (1992), citando a Cavallito y Bailey (1944); Gasparim et al., (1998) y Kyung y Lee (2001), como principal compuesto anti-biótico del ajo.

Wagner y Flores (1994), utilizando un compuesto llamado taxol, extraído de la planta ornamental *Taxus brevifolia*, demostraron la eficacia de este en el control del crecimiento de hongos como *Phytophthora sp.* y *Rhizoctonia solani*. Los autores señalan que el taxol es un inhibidor de la mitosis celular.

Vargas González (1994), manifiesta entre los ingredientes del producto Lonlife, (extracto de semillas de cítricos), al ácido láctico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido palmítico, glucosa, manosa y tocoferoles. El ácido láctico mencionado como antimicótico (Budanari, 1989), también se encuentra presente en esta formulación; este componente estaría actuando en forma solitaria o sinergisándose con los otros ácidos orgánicos.

El té de kombucha contiene numerosos microorganismos (levaduras y bacterias) y ácidos orgánicos, entre los que se menciona la presencia del ácido láctico; dicho té es caracterizado por inhibir el crecimiento de numerosos microorganismos en su medio (Gunther, 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de los extractos y el té de kombucha en el control del crecimiento micelial de hongo *Rhizoctonia solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas de extractos y té de kombucha *in vitro* fueron realizadas en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, durante el mes de febrero de 2001.

La temperatura media del laboratorio fue mantenida en 27°C y la humedad media a 70 %. Se emplearon lámparas fluorescentes con fotofase de 24 horas y 350 lux de intensidad.

Aislamiento del patógeno

El hongo *R. solani* fue aislado a partir de plantas de petunia (*Petunia x híbrida*) con síntomas de la enfermedad (pudrición de la base y de las ramas laterales). El medio de cultivo utilizado para la aislación del patógeno fue PDA (papa-dextrosa-agar). Bajo cámara de aislación, pequeños trozos de ramas enfermas fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 30 % durante 1 minuto e inmediatamente lavadas 3 veces con agua destilada esterilizada. Luego fueron depositados en placas de Petri con el medio (PDA), a razón de tres trozos por placa e incubadas a 27 °C con luz fluorescente las 24 horas. Una vez obtenido el crecimiento micelial, fue identificado el hongo para luego realizarse repicajes en placas de Petri con medio de cultivo PDA y para la obtención de cultivos puros.

Preparación del inóculo

En una placa de Petri con medio de cultivo PDA se colocaron sobre la superficie de esta, discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro.

En el centro de la placa fue colocado un pequeño disco de PDA con micelio puro de *R. solani*. La placa fue colocada en ambiente de 27 °C y fotoperiodo de 24 h con luz fluorescente con una intensidad de 350 lux. Al quinto día, el micelio del hongo había crecido, cubriendo totalmente la superficie del PDA con los discos. Estos discos con micelio del hongo fueron utilizados para la inoculación de las otras placas.

Preparación de extractos y té de kombucha

Para la obtención de los extractos vegetales fue utilizada agua destilada, y para el té de kombucha, té negro (comercial) con adición de azúcar blanca (sacarosa comercial). Para la producción de los extractos fue preparada una concentración base a partir de la cual se realizaron las diluciones, que fueron las siguientes:

- Extracto de cola de caballo: 500 g de hojas y tallos frescos hervidos en un litro de agua destilada durante 5 minutos.
- Extracto de ajo: 150 g de bulbo fresco licuado por 2 minutos en un litro de agua destilada y filtrado con malla de 30 mesh.
- Extracto de semillas de tártago: 2.000 g de semillas

enteras hervidas durante 10 minutos en un litro de agua destilada.

- Extracto de cítricos: producto comercial llamado Lonlife 20 %, cuyos componentes son el ácido ascórbico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido láctico, glucosa, manosa y tocoferoles. (Formulado por Citrex Inc. Miami, FL. U.S.A.).
- Té de kombucha: té estacionado por 15 días con la kombucha obtenida del laboratorio de Fitopatología de la F.C.A. de la U.N.A. (Gunther, 2001). La fermentación se realizó con un fotoperiodo de 8 horas y una intensidad lumínica de 350 lux.

Antibiograma

Al medio de cultivo (PDA) aún no solidificado a 45 °C, fueron agregados los extractos vegetales de bulbo de ajo, de cola de caballo, de semilla de tártago, semillas de cítricos y el té de kombucha a diferentes concentraciones (Cuadro 1), que representa a los tratamientos empleados.

Cuadro 1. Concentraciones de extractos vegetales y té de kombucha utilizadas in vitro en el control de *R. solani*. San Lorenzo, 2001.

PRODUCTOS	Concentración 1 ppm	Concentración 2 ppm	Concentración 3 ppm
Extracto de cola de caballo	100.000	50.000	30.000
Extracto de semilla de tártago	400.000	300.000	200.000
Extracto de bulbo de ajo	30.000	20.000	10.000
Té de kombucha	200.000	100.000	50.000
Extracto de semillas de cítricos (Lonlife)	8.000	6.000	5.000

Una vez solidificado el medio de cultivo con los extractos y el té en placas de Petri, fue colocado en el centro de cada placa un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio del hongo *R. solani*. Fue observado el crecimiento micelial del hongo a los 5 días después de haber instalado el experimento. Se midió el diámetro de crecimiento del hongo y se obtuvo el porcentaje de inhibición de crecimiento con respecto al testigo (medio de cultivo libre de extractos o té).

Análisis estadístico

Fueron evaluados 15 tratamientos con 4 repeticiones, más 4 testigos en un diseño completamente al azar.

Los resultados finales fueron analizados estadísticamente, realizándose un análisis de varianza y prueba F para comparar las medias fue empleado el test de Duncan al nivel de 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios observados se muestran en la Tabla 2, así como los resultados de las comparaciones de las medias.

Tabla 2. Medias de crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* obtenidas en laboratorio con diferentes extractos vegetales y té de kombucha en el medio de cultivo. San Lorenzo, 2001.

Tratamientos	Crecimiento micelial (en diámetro cm)*	Control (%)
Testigo	9,0 a	0
Cola de caballo a 100.000 ppm,	7,4 ab	18
Cola de caballo a 50.000 ppm,	7,2 ab	19
Cola de caballo a 33.000 ppm	6,9 ab	23
Lonlife a 6.000 ppm	6,3 ab	30
Lonlife a 5.000 ppm	6,28 ab	30
Lonlife a 8.000 ppm	6,0 ab	34
Semilla de tártago a 400.000 ppm	4,7 abc	48
Bulbo de ajo a 10.000 ppm	4,7 abc	47
Bulbo de ajo a 20.000 ppm	3,9 bcd	57
Té de kombucha a 50.000 ppm	3,5 bcd	61
Semilla de tártago a 300.000 ppm	3,0 bcd	70
Semilla de tártago a 200.000 ppm	2,9 bcd	68
Té de kombucha a 100.000 ppm	0,9 cd	90
Té de kombucha a 200.000 ppm	0 d	100
Bulbo de ajo a 30.000 ppm	0 d	100

* Test de Duncan al 0,05

En el análisis de varianza de los resultados fue observado que el extracto de ajo a 30.000 ppm y 20.000 ppm (Figura 1), de semilla de tártago a 300.000 y 200.000 ppm y el té de kombucha a 200.000 y 100.000 ppm (Figura 2), mostraron un nivel de control en el desarrollo micelial de *R. solani* diferente a los demás tratamientos evaluados. Puede observarse también que los extractos de bulbo de ajo a 30.000 ppm y el té de kombucha a 200.000 ppm no permitieron ningún crecimiento micelial.

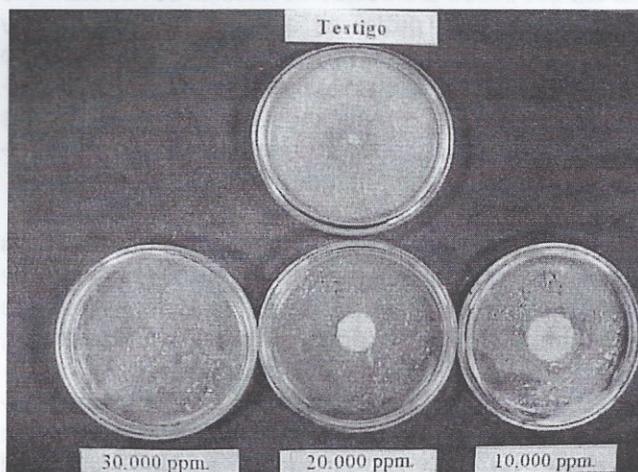


Figura 1. Crecimiento a los 5 días del hongo *R. solani* en placa de Petri con PDA (testigo) y placas de Petri con PDA más extracto de bulbo de ajo a las concentraciones de 30.000, 20.000 y 10.000 ppm. San Lorenzo, 2001.

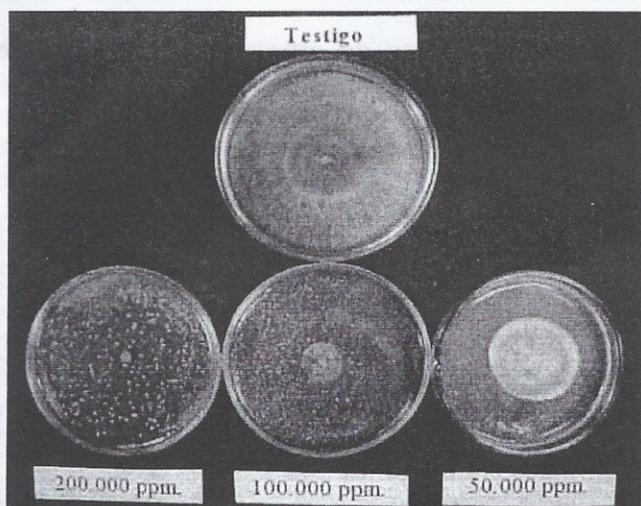


Figura 2. Crecimiento a los 5 días de la inoculación del hongo *R. solani* en placa de petri con PDA (testigo) y placas de petri con PDA más té de kombucha a las concentraciones de 200.000, 100.000 y 50.000 ppm. San Lorenzo, 2001.

El efecto inhibitorio del extracto de bulbo de ajo sobre el crecimiento de *R. solani*, confirma las investigaciones de Bolkan y Ribeiro (1981), quienes mencionan un control del 66,9 % a 5.000 ppm *in vitro*. Asimismo, Bianchi et al., (1997), utilizando el mismo extracto a una concentración de 10.000 ppm *in vitro*, afirman un control del 85 % del crecimiento micelial del mismo hongo. Probablemente la alicina, de característico olor fuerte, es la sustancia que inhibe el crecimiento micelial de *R. solani* que actúa sobre varias proteínas, aminoácidos esenciales y enzimas importantes como la xantina oxidasa, succinato deshidrogenasa y la triosa fosfato dehidrogenasa del patógeno; oxidando o realizando uniones a los grupos sulfidrilos, interrumpiendo el normal desarrollo del metabolismo celular (Tariq y Magee, 1990).

El té de kombucha contiene numerosos microorganismos (levaduras y bacterias) y ácidos orgánicos, entre los que se menciona la presencia del ácido láctico y este se encontraría en una concentración de 0,5 a 1 % (Gunther, 2001). Este ácido es conocido como un excelente agente antiséptico (Budanari, 1989). En ensayos preliminares utilizándose ácido láctico en concentración al 1 % en el medio de cultivo, demostró una gran capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *R. solani*. Posiblemente el control eficiente ejercido en el laboratorio por parte del té de kombucha, sobre el crecimiento micelial del patógeno, fue por causa del ácido láctico (actuando en forma solitaria o sinergizado con otra sustancia).

El extracto que prácticamente no manifestó ningún efecto inhibitorio a las dosis estudiadas, fue el de cola de caballo aunque el micelio del hongo presentó menor densidad de hifas con relación al testigo mostrando en ese sentido un cierto control por parte del producto sobre el hongo, desconociéndose el componente o sustancia que estaría actuando. A pesar de esto, Quarles (2001), men-

ciona a la cola de caballo como efectivo en el control de damping off y *Oidium* sp, lo cual no coincide con estos resultados.

El extracto de semilla de tártago mostró una eficiencia de 50 a 70 % de control, manifestando una aceptable calidad como agente inhibitorio. Los componentes que podrían actuar en el efecto antimicótico serían los aceites, ya que el 48 % de la semilla está compuesta de aceites, que a su vez contienen grandes cantidades de ácidos orgánicos como el ácido ricinoléico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido dioxiesteárico y ácido esteárico (Fornazieri Junior, 1986).

El extracto de semillas de cítricos (Lonlife) controló el desarrollo micelial del hongo entre 21,1 a 38,9 %, siempre con respecto al testigo. Probablemente la concentración del extracto de semillas de cítricos debería ser mayor a las utilizadas, ya que Pimentel y Lucon (1995), mencionan haber utilizado extracto de cítricos en una dosis de 20.000 ppm *in vitro* y haber reducido el crecimiento micelial de los hongos foliares *Colletotrichum*, *Alternaria* y *Mycosphaerella*.

CONCLUSIONES

- El extracto de bulbo de ajo (*Allium sativum*) a 30.000 ppm y el té de kombucha a 200.000 ppm inhiben 100 % el crecimiento micelial de *R. solani* *in vitro*.
- El extracto de semilla de tártago (*Ricinus comunis*) *in vitro* en las concentraciones de 300.000 ppm y a 200.000 ppm controla *R. solani* en un 67 % con respecto al testigo.

LITERATURA CITADA

- BASTOS, C. N. 1992. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinepellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extracto de bulbo de alho (*Allium sativum*). Fitopatología Brasileira, São Paulo (Br). 17(4):234 – 235.
- BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D & AULERIO, A.; BELLESIA, F. 1997. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. Plant Diseases (US). 81:1241-1246.
- BOLKAN, H.A.; RIBEIRO, W.R.C. 1981. Efeito de extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. Fitopatología Brasileira, São Paulo (Br). 6:566.
- BUDANARI, S. 1989. Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. U.S.A.: Merck & Co. Inc. 600 p.
- FORNAZIERI JUNIOR, A. 1986. Mamona, uma rica fonte de óleo e de divisas. São Paulo, Brasil: Icone. 71 p.

- FERRACINI, I. S.; DE MELO, I. S.; FRIGHETTO, R. T. S. 1990. Influencia de extratos de *Chenopodium ambrosioides* L. no crescimento micelial e germinação de esclerodios de *Sclerotium rolfsii*. Fitopatología Brasileira, São Paulo (Br). 15(2):149.
- GASPARIN, M.D.; MORAES, L.M.; SCHWAN ESTRADA, K.; STANGARLIN, J.R. 1998. Efeito do óleo essencial e do extracto bruto de alho (*Allium sativum*) no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Alternaria stevia*. Summa Phytopathologyca, São Paulo (Br). 24 (1):74.
- GUNTHER, F. Kombucha journal. Consultado 7 febrero 2001. Disponible en www.Kombu.de/
- KYUNG, K. H.; LEE, Y. C. 2001. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-Alk(EN)YL-L-Cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*. Consultado 20 Agosto 2001. Disponible en dasan.sejong.ac.kr
- PIMENTEL, C; LUCON, C; FARIA, R. 1995. Ensaio in vitro para o controle de fungos fitopatogénicos por extratos cítricos. Fitopatología Brasileira, São Paulo (Br). 20:350.
- QUARLES, W. Manual of natural control of disease. Consultado 6 Setiembre 2001. Disponible en www.bbg.org/gar2/topics/sustainable/handbooks/naturaldisease/leasttoxic.html
- STAUFFER, A; ORREGO, A; AQUINO, A. 1996. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. San Lorenzo, Paraguay: UNA, Dipri 50 p.
- TARIQ, V.N.; MAGEE, A.C. 1990. Effect of volatiles from garlic bulb extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mycological Research (UK). 94(5):617-620.
- VARGAS GONZALEZ, E. 1994. Lonlife aplicado en la agricultura. U.S.A.: Citrex, Fl.. 80 p.
- WAGNER, L. J.; FLORES, H. E. 1994. Effect of Taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi. Phytopathology (US) 84(10):1173-1178.
- WILLS, E.D. 1956. Enzyme inhibition by Allicin, the active principle of garlic. Biochemical Journal (UK). 63:514-519.