

## ARTICULO ORIGINAL

### EFFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Rhizoctonia solani*

#### ANTIFUNGAL EFFECT OF *Origanum vulgare* ESSENTIAL OIL ON THE MYCELIAL GROWTH OF *Rhizoctonia solani*

Cynthia Catherine Cuzco Bobadilla<sup>1</sup> & Julio Chico-Ruiz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Asistente de Investigación. Laboratorio de Biotecnología y Patología de Plantas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Perú. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología y Patología de Plantas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Perú  
cbcuzco@hotmail.com<sup>1</sup> jchico@unitru.edu.pe<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Las enfermedades fúngicas a lo largo de los años han dependido casi exclusivamente del uso de agroquímicos, sin embargo, representa un severo riesgo para la salud humana y elevado la contaminación ambiental. Una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades son los productos derivados de las plantas, porque no afectan el medio ambiente debido a que sus residuos son fáciles de degradar. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*. El aceite esencial se obtuvo a partir de hojas secas de orégano las cuales se sometieron a destilación por arrastre de vapor; el aceite obtenido se agregó en diferentes concentraciones a los medios agar papa preparados para los cuatro tratamientos; tratamiento 1 (0 ppm), tratamiento 2 (250 ppm), tratamiento 3 (500 ppm) y el tratamiento 4 (1000 ppm). El crecimiento micelial se evaluó durante 4 días observándose que el mayor porcentaje de inhibición se logró con el tratamiento 4 (99.7%), comprobándose que el uso del aceite esencial de orégano puede ser una eficiente forma de control para *R. solani*.

**Palabras claves:** aceite esencial, antifúngico, crecimiento micelial, *Rhizoctonia solani*.

#### ABSTRACT

Fungal diseases over the years have depended almost exclusively on the use of agrochemicals; however, it has posed a serious risk to human health and raised environmental pollution. An economical and efficient alternative for the control of diseases is the products derived from plants, since they do not affect the environment because their residues are easy to degrade. This is why the objective of the present work was to evaluate the antifungal effect of the essential oil of *Origanum vulgare* L. "oregano" on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*. The essential oil was obtained from dried leaves of oregano which were subjected to steam distillation, the oil obtained was added in different concentrations to the potato agar media prepared for the four treatments; Treatment 1 (0 ppm), treatment 2 (250 ppm), treatment 3 (500 ppm) and treatment 4 (1000 ppm). After the sowing of *R. solani*. Was carried out, the mycelial growth was evaluated during 4 days. The highest percentage of inhibition was achieved with treatment 4 with a percentage of 99.7%, proving that the use of the essential oil of oregano can be an efficient form of control for *R. solani*.

**Keywords:** essential oil, antifungal, mycelial growth, *Rhizoctonia solani*

**Recibido:** 10 Julio 2017.

**Aceptado:** 20 Setiembre 2017.

**Publicado online:** 30 Diciembre 2017

## INTRODUCCIÓN

Diversos estudios alrededor del mundo han revelado que la actividad antifúngica y antimicrobiana de algunos metabolitos presentes en las plantas pueden ofrecer una alternativa promisoría para el control de plagas y enfermedades (Villa *et al.*, 2014). El uso de extractos vegetales y/o aceites esenciales, además, de poseer origen biológico, son biodegradables y manifiestan un mínimo impacto (negativo) sobre la salud humana y el ambiente (Ochoa *et al.*, 2012).

El género *Origanum*, pertenece a la familia Lamiaceae, y es una planta herbácea vivaz muy aromática (Carhuapoma, 2006). Sus hojas (tanto frescas como secas) se emplean como condimento en numerosas recetas culinarias por el excelente sabor que le confieren a las comidas. Se ha demostrado que el orégano contiene aceites esenciales, por lo que no solo es benéfico para la salud humana, sino que además puede sustituir los aditivos sintéticos de los alimentos (Acevedo *et al.*, 2013).

En el aceite esencial de esta planta se han identificado más de 25 compuestos volátiles entre los que se encuentran  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno, carvacrol y timol. El aceite esencial de orégano ha sido reconocido como un importante agente antioxidante y se ha demostrado su actividad antifúngica contra hongos contaminantes de alimentos. Además, se ha establecido que tanto el aceite esencial, como el extracto hexánico inhiben el desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Cueto, 2010).

*Rhizoctonia solani* es un deuteromiceto reconocido como uno de los patógenos más importantes de plantas. Asexualmente forma sus primeras estructuras como un micelio vegetativo y/o esclerosos. Usualmente se le conoce como hongo estéril, debido a que durante muchos años se pensó que era incapaz de producir algún tipo de espora, ya fuera sexual o asexual. Las condiciones óptimas para su desarrollo son suelos moderadamente húmedos y temperaturas de 15 a 18°C, aunque algunas razas incrementan su actividad a temperaturas mayores de 35°C (Chávez, 2014; Tovar, 2008).

Entre las enfermedades más comunes causadas por este fitopatógeno está el llamado damping-off o caída de las plántulas, como consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel del cuello en plántulas recién emergidas (Tovar, 2008). Otros síntomas comunes que causa una enfermedad por este fitopatógeno son: ahogamiento en plántulas, pudrición de raíz, pudrición y cancrisis del tallo y pudrición de follaje (Chávez, 2014).

Gaspar Ku (2008) en su trabajo "Actividad antimicrobiana de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos", menciona la evaluación de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare*) para determinar su actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Ambos aceites presentaron actividad antifúngica in vitro. Así mismo se comprobó la actividad antifúngica del aceite esencial contra el hongo filamentoso *Phymatotrichopsis omnivora*, causal de la pudrición texana, el cual se aisló de la cepa de *P. omnivora* de un cultivo de pistachero infectado y por medio de inhibición del crecimiento radial, se evaluó el efecto antagónico de dos aceites esenciales de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer y *Origanum vulgare*), así como tres fracciones del mismo contra el hongo aislado. Se utilizaron seis concentraciones de las cuales las que demostraron que tuvieron inhibición fueron las de 50 y 100 ppm teniendo una disminución considerable en crecimiento.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *O. vulgare* sobre el crecimiento micelial de *R. solani*, y como objetivos específicos, evaluar la velocidad de crecimiento y el porcentaje de inhibición micelial en medios envenenados con aceite esencial de *O. vulgare* a concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección, transporte y preparación del material vegetal.

Las hojas de *O. vulgare* L. "orégano" fueron adquiridas en el Mercado Zonal La Hermelinda del distrito de Trujillo, el material fue transportado en bolsas de papel, su desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos, posteriormente las hojas se cortaron en pequeñas porciones y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 4 días.

### Obtención y siembra del hongo fitopatógeno

*R. solani* se obtuvo por medio de un monocultivo procedente del laboratorio de Fitopatología. Luego se procedió a activar el hongo, inoculándolo en placas Petri que contenían el medio papa-dextrosa-agar (PDA). Finalmente las placas Petri ya sembradas se incubaron por siete días a 25 °C hasta el desarrollo de las colonias.

### Extracción del aceite esencial de la corteza de canela.

El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor a partir de 600 gr de hojas secas de orégano y se siguió la técnica propuesta por Peredo-Luna *et al.*, (2009).

### Preparación de los medios envenenados.

Se preparó 100 ml de PDA, luego se esterilizó en autoclave a 30 min por 1 atm. Al PDA tibio y esterilizado se le agregó el aceite esencial utilizando un filtro de esterilización (22 µM), a diferentes concentraciones, 100, 200 y 400 ppm, luego se dispensó en placas Petri.

### Inoculación en placas Petri con el medio envenenado.

Se realizó la siembra del patógeno por puntura en cada placa, luego se incubaron a 25 °C y se evaluó durante cuatro días, momento en el que el crecimiento de *R. solani* se extendió por toda la placa testigo.

### Evaluación del crecimiento micelial de las colonias según cada tratamiento.

El crecimiento micelial (radio de la colonia) se midió utilizando una regla (cm). Se consideró tres repeticiones para cada tratamiento (100, 200 y 400 ppm) del aceite esencial. La placa Petri control solo tenía PDA.

### Cálculo del porcentaje de inhibición y curva de crecimiento.

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del hongo según cada tratamiento, con respecto al control utilizado, el cual se consideró como el 100% de crecimiento micelial (cm), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición micelial (\%IM)} = \frac{(\text{CM control} - \text{CM tratamiento})}{\text{CM control}} \times 100$$

La curva de crecimiento se elaboró con los datos diarios al medir el radio de la colonia.

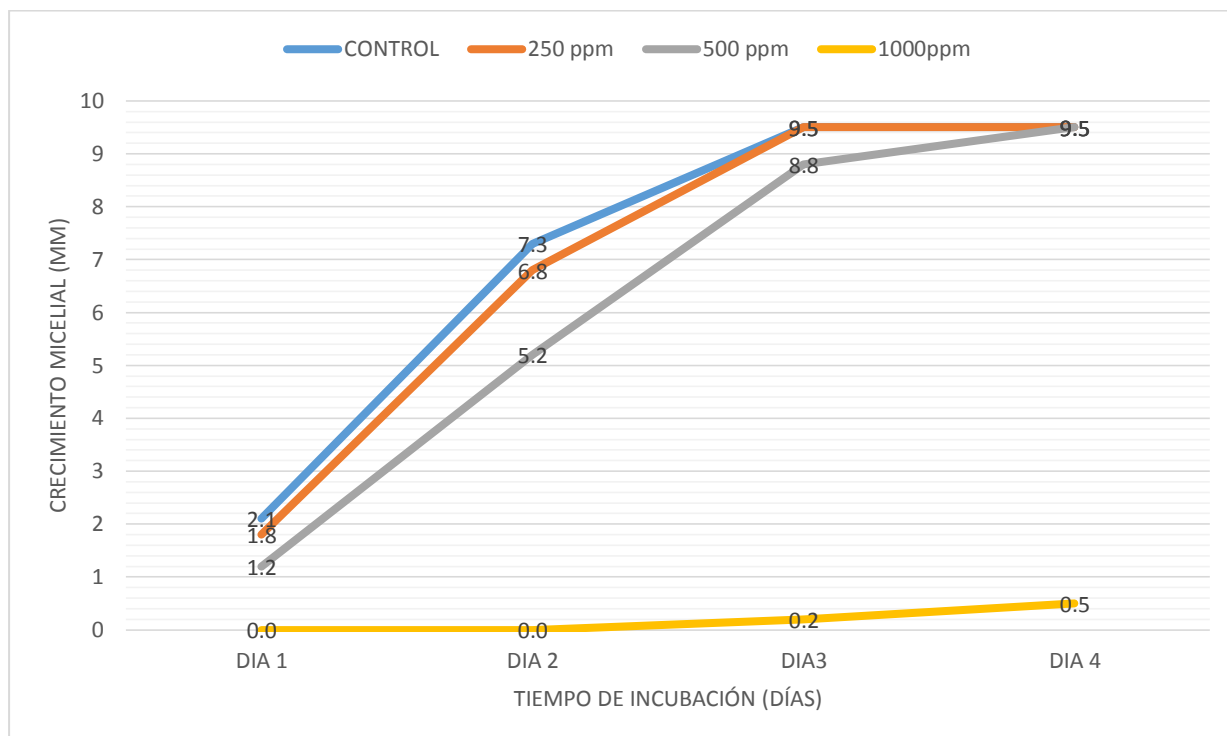
### Análisis y tratamiento estadístico.

Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado (D.E.C.A.) ajustado a un diseño experimental de estímulo creciente de tres concentraciones del aceite esencial de orégano, considerando además un control (cuatro tratamientos). Los datos obtenidos fueron promediados,

se halló la desviación estándar y fueron sometidos a ANOVA (Análisis de varianza) y Prueba de Comparación de medias de Tukey, para determinar si hubo diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. Se utilizó como estadístico SPSS versión 21

## RESULTADOS

Se muestra el efecto antifúngico del aceite esencial de *O. vulgare* sobre el crecimiento micelial (cm) de *R. solani* en los diferentes tratamientos durante los 4 días de evaluación (Fig.1)



**Fig. 1.** Velocidad de crecimiento micelial de *R. solani* en mm frente a la actividad del aceite esencial de *O. vulgare* en los diferentes tratamientos (T1, T2, T3 y T4) durante los cuatro días de incubación.

En la Fig. 1 se muestra la velocidad del crecimiento micelial (cm) del patógeno en los diferentes tratamientos en los 4 días evaluados, en los que se observa una disminución, conforme aumenta la concentración (ppm) de los tratamientos. El Tratamiento 4 (1000 ppm) del aceite esencial es el que presenta mayor efecto inhibitorio del crecimiento micelial.

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%IM) de *R. solani* para los tratamientos 2, 3 y 4 (250, 500 y 1000 ppm) del aceite esencial de *O. vulgare*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	% IM
T2	250	2.8
T3	500	13.0
T4	1000	99.7

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, los tratamientos 2 y 3 presentaron un efecto inhibitorio bajo, de 2.8% y 13%. El Tratamiento 4 (400 ppm) presentó un alto porcentaje de inhibición 99.7%.

**Tabla 2.** Análisis de Varianza de un Factor para el crecimiento micelial (CM) de *R. solani* en cm bajo el efecto del aceite esencial de *O. vulgare* “orégano” durante los cuatro días de incubación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	130,6025	3	43,5341667	4,35650	0,02705633	3,490294
Dentro de los grupos	119,915	12	9,99291667	252		82
Total	250,5175	15				

En la Tabla 2 se muestra el análisis de varianza (ANOVA), donde el valor-P es menor que 0.05 afirmando que al menos un tratamiento tiene efecto antifúngico sobre *Rhizoctonia* sp, con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 3.** Análisis prueba de Tukey aplicado al crecimiento micelial de *R. solani*. en los cuatro tratamientos con significación de datos.

Tratamiento	1 (control)	2 (250 ppm)	3 (500 ppm)	4 (1000 ppm)
Promedio	7,1 <sup>a</sup>	6,9 <sup>ab</sup>	6,18 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>d</sup>

En la tabla 3 se muestra la prueba de comparación de medias de Tukey, que indica que el tratamiento 4 (1000 ppm) presenta diferencia significativa respecto a los tratamientos 1 (control), 2 (250 ppm) y 3 (500 ppm) con un nivel de confianza del 95%

## DISCUSIÓN

El aceite esencial de orégano presentó un efecto antifúngico sobre *R. solani*. (Tabla 1) en todos los tratamientos siendo mayor conforme se aumentaba la concentración del aceite. Estos resultados coinciden con lo reportado en otros trabajos realizados sobre los efectos antifúngico de orégano frente a distintos patógenos de interés médico y agrícola. Autores como Soliman y Badeaa en el 2002, observaron un efecto fungistático del aceite esencial de orégano a partir de las concentraciones de 250 y 500 ppm al ser enfrentadas contra *Aspergillus flavus*. De igual forma Bolívar *et al.* (2009) señalan que *Lippia organoides* “orégano silvestre” ejerce un efectivo control sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris maydis*, *R. solani* y *Fusarium oxysporum*. Así mismo Contreras (2012) reporta una mayor efectividad de *Lippia graveolens* “orégano mexicano”, con un índice antifúngico (IA) igual al 100%, a una concentración de 400 ppm contra cinco especies de hongos xilófagos basidiomicetos de árboles de interés económico. Resultados superiores a los obtenidos con *O. vulgare* “orégano mediterráneo” debido a que la concentración del aceite esencial en éste es del 1,1% o de alrededor de 2%, mientras que en *L. graveolens* posee una concentración mucho más alta, de alrededor al 4%. (Gómez & López, 2009)

Gómez & López (2009) señalan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contienen. Estos actúan rompiendo los lípidos de la membrana favoreciendo el flujo de electrones y de otros contenidos celulares. La pérdida prolongada de estas partículas y compuestos conduce a la muerte de los microorganismos. Los componentes de los aceites esenciales parecen actuar

también en las proteínas celulares de la membrana citoplasmática y afectar a enzimas del ATP, las cuales se encuentran rodeadas de moléculas lipídicas. Los mecanismos sugeridos indican que las moléculas de monoterpenos se acumulan en la bicapa lipídica, lo que hace posible la interacción directa de estos compuestos lipofílicos con las partes hidrofóbicas de las proteínas.

El efecto que ejerce el aceite esencial del orégano se le atribuye a la presencia de timol y carvacrol principalmente (Cueto, 2010), así como a la presencia de p-cimeno y γ-terpineno (Gómez & López, 2009). Compuestos que se han evaluado de manera independiente y han demostrado ser efectivos agentes antibacterianos y antifúngicos (Cueto, 2010). Nychas (1995) reporta que estos compuestos actúan sobre la membrana citoplasmática de los microorganismos destruyendo su capacidad selectiva, permitiendo con esto la salida de componentes intracelulares. Este hecho, aunado a la capacidad de inactivar enzimas podía explicar la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Albado *et al.* (2001) mencionan que existen publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de *O. vulgare*, que indican que los diferentes rendimientos se deben al tiempo y modo de proceso desde su recolección hasta su extracción, las diferencias cuantitativas pueden atribuirse a los métodos de obtención, fecha y tiempo transcurrido entre la recolección y el proceso de obtención del aceite esencial.

Por otra parte, Jacinto *et al.* (2007) señala que investigaciones anteriores atribuyen estas variaciones a factores de calor y sequía o factores de tipo ambiental. Sin embargo no comparte estas opiniones y afirma que la producción y calidad del aceite son atributos ligados a la variabilidad genética de las poblaciones de orégano.

Los resultados obtenidos con el presente trabajo evidencian el poder antifúngico del aceite esencial de *O. vulgare* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, los cuales deben ser considerados relevantes ya que utilizando este estudio y los antecedentes previos confirman su posible práctica en una agricultura sostenible con una reducción drástica de plaguicidas.

## CONCLUSIONES

Se confirmó el efecto antifúngico del aceite esencial de *O. vulgare* sobre el crecimiento micelial de *R. solani* evaluado durante los cuatro días de incubación.

Los tratamientos 2, 3 y 4 evidencian la actividad antifúngica del aceite esencial de *O. vulgare*, obteniéndose que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con el tratamiento 4 (1000 ppm). Se estimó los porcentajes de inhibición del aceite esencial de orégano, siendo 400 ppm el de mayor inhibición con 66.74%, y con un 4.6% y 14%, para 100 y 200 ppm, respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, D.; M. Navarro & M. Monroy.** 2013. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Información Tecnológica*, 24 (4): 43-48. doi:10.4067/S0718-07642013000400005
- Albado, P.; F. Saenz & A. Gabriel.** 2001. Composición química y actividad bacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*. 12: 16-19
- Bolívar, K.; M. Sanabria; D. Rodríguez; M. Camacaro; D. Ulacio; J. Cumana; O. Crescente.** 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. Venezuela.

- Carhuapoma, M.** 2006. *Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray "arrayán"*. Tesis Maestría, Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- Chávez, A.** 2014. Evaluación de flutolanil para el control de *Rhizoctonia solani* en semillero de crisantemo (*Chrysanthemum spp*); San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis de Grado. Univ. Rafael Landívar. Guatemala.
- Contreras, C.** 2012. Actividad fungistática in vitro de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos. Tesis Profesional para obtener el título de Ingeniero Forestal Industrial. Univ. Autónoma Chapingo. México.
- Cueto, M.** 2010. Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto in vitro como en plántula de tomate. Tesis Doctorado Ciencias Biológicas, Univ. Autónoma de Nuevo León.
- Gaspar, K.** 2008. Actividad antimicrobiana de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos. Tesis de Grado. Univ. Autónoma de Queretaro.
- Gómez, A. & A. López,** 2009. Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Univ. De las Américas Puebla. México.
- Jacinto S.; H. Flores; F. Castro & V. Silva .** 2007. Identificación y selección de genotipos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobresalientes en producción de timol y carvacrol. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. 6: 25-36.
- Nychas G.J.E.** 1995. Natural antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation, ed. Gould, G.W. pp. 58-89. London: Blackie Academic Professional.
- Ochoa, Y.; E. Cerna; J. Landeros; S. Hernández & J. Delgado.** 2012. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp*. *Revista Internacional De Botánica Experimental*, 81. doi: [http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol81/9-OCHOA\\_FUENTES.pdf](http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol81/9-OCHOA_FUENTES.pdf)
- Peredo-Luna, H.A.; E. Palou-García & A. López-Malo.** 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 3-1: 24-32
- Soliman, K.M. & R.I. Badeaa** 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40:1669-1675.
- Tovar, C.** 2008. Determinación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Tesis para optar el Título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Univ. Pontificia Javeriana.
- Villa, A.; R. Pérez; H. Morales; M. Basurto; J. Soto & E. Martínez** 2014. Situación actual en el control de *Fusarium spp*. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64 (2): 194-205. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

