

Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*

Dorian A. Rodríguez¹
José O. Montilla¹

RESUMEN. Se evaluó el efecto del extracto de semilla de *Citrus paradisi* (Citrex) sobre la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* y sobre la marchitez causada por el mismo patógeno en tomate. En el primer caso, se probaron concentraciones de 0,10,25,50,75,100 y 1000 mg/L i.a. de Citrex para determinar la dosis media efectiva (DE₅₀). Se encontró un efecto reductor de Citrex sobre el crecimiento micelial del hongo (P<0,01) con una DE₅₀ de 63 mg/L. Para la evaluación del efecto del extracto sobre la marchitez en plantas de tomate se utilizaron cinco tratamientos: inmersión de raíces de plantas en la solución de Citrex antes del trasplante, aplicación semanal al follaje; aplicación semanal al suelo; aplicación semanal al suelo y al follaje; e inmersión de raíces de plantas al trasplante más la aplicación semanal al suelo. El testigo fue suelo infestado sin la aplicación del producto. La inmersión de raíces de plantas en la solución de Citrex más la aplicación semanal al suelo logró reducir la marchitez en un 85%, seguido por la aplicación combinada al suelo y al follaje con un 64% de reducción. La aplicación de Citrex al follaje o al suelo ocasionó una reducción del 42%. Los resultados indican la posibilidad de controlar patógenos del suelo con el uso del extracto de semilla de *C. paradisi*.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Extracto vegetal, Patógeno del suelo, Citrex, Tomate

ABSTRACT. Decrease in wilt caused by *Fusarium* on tomato by means of extract of *Citrus paradisi*. *Citrus paradisi* seed extract (Citrex) was evaluated on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* and on tomato wilt caused by the same pathogen. In the first instance, concentrations of 0,10,25,50,75,100 and 1000 mg/L a.i. of Citrex were tested to determine the effective dose (ED₅₀). A reducing effect of Citrex on the mycelial growth of the fungus was found (P<0.01), with an ED₅₀ of 63 mg/L. In order to determine the effect of the extract on wilting of tomato plants, five treatments were evaluated: immersion of plant roots in a solution of Citrex before transplant, weekly application to the foliage, weekly application to the soil; weekly application to the foliage and to the soil; and immersion of plant roots at transplant plus weekly application to the soil. The control was infested soil without application of the product. The immersion of roots in the Citrex solution plus weekly application to the soil reduced wilting by 85%, followed by the combined application to the soil and foliage with a 64% reduction. The application of Citrex to the foliage or the soil caused a reduction of 42%. The results indicate that it is possible to control soilborne pathogens with the *C. paradisi* seed extract.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Plant extract, Soilborne pathogen, Citrex, Tomatoes.

Introducción

La marchitez en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H. N. Hans. tiene amplia distribución en Venezuela (Urriaga 1986, Diaz-Polanco y Diaz 1973, Reyes y Sanabria 1997) y el mundo (Jones 1991). El patógeno es un ha-

bitante del suelo que también puede diseminarse por semilla (Abdalla *et al.* 1998).

Los *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.* 1994). Sin embargo, la colonización, se restringe tanto en cultivares resistentes como suscep-

¹ Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Postgrado de Fitopatología. Apartado 400. Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. rdorian7@yahoo.com

tibles a la región de entrada inicial del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas (Beckman 1990, Mueller *et al.* 1993, Tessier *et al.* 1990). En los cultivares susceptibles, la colonización continúa (distribución secundaria) cuando los geles y las calosas son degradados por efecto de enzimas pectolíticas del patógeno (Deese y Stahmann 1962) y el crecimiento de las tilosas inhibido (Beckman 1990). En los cultivares resistentes, flavonoides del tipo de las catequinas y sus productos de oxidación inactivan las enzimas (Deese y Stahmann 1962), y la distribución secundaria es confinada a los puntos de infección inicial (Elgersma *et al.* 1972, Tessier *et al.* 1990).

No obstante, a que la generación de cultivares resistentes constituye el avance más importante en el control de esta enfermedad, especialmente contra las razas 1 y 2 del hongo, se continúan presentando focos de infección en los cultivos. Por otra parte, la eficacia de los fungicidas en el control de la marchitez no está comprobada, aunque a nivel *in vitro* se han obtenido algunos resultados positivos, así como con control biológico (Jiménez y Sanabria 1997a y b).

La búsqueda de nuevas alternativas de control que complementen la resistencia genética constituye una de las prioridades actuales en el manejo de la enfermedad. En ese sentido, el uso de productos naturales es una de las medidas en las que se está haciendo énfasis porque permite un control de la plaga con daños mínimos al ambiente. Entre los productos naturales, los extractos de plantas han demostrado tener efectos positivos en el control de patógenos foliares y del suelo (Awuah 1994, Lawson *et al.* 1998, Bower y Locke 2000, Bravo *et al.* 2000, Guevara *et al.* 2000).

Citrex es elaborado a partir del extracto de semilla y pulpa de *Citrus paradisi* Macf. y ha mostrado tener efecto bactericida y fungicida (<http://w.w.w.nutriteam.com/MIC.html>; Chávez y Gómez 1995, Park *et al.* 1995). Citrex es un compuesto orgánico complejo del cual no todos los componentes han sido identificados. Sin embargo, se sabe que algunos de los componentes activos son glucósidos (y glicósidos), entre los cuales se encuentran saponinas, fenólicos, bioflavonoides y limonoides cítricos. Entre los bioflavonoides más conocidos están: quercitina, hesperidina, citrina, catequina, rutina, rutinosa, flavonol y flavononas (Ecological Resource 2000). El extracto de semilla de *C. paradisi* también ha tenido efecto sobre *Penicillium* sp. *in vitro* (Park *et al.* 1995), lo cual indica que Citrex puede ser útil en el control de varios hongos fitopatógenos.

Se han realizado algunas evaluaciones preliminares de Citrex (Rodríguez y Montilla 2000) con buenos resultados. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue la evaluación del efecto de Citrex (CitruPar 80^{MR}) en el desarrollo *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y de la marchitez en plantas de tomate.

Materiales y métodos

Evaluación *in vitro*

El hongo se obtuvo de plantas de tomate con síntomas de marchitez. El hongo se aisló, purificó y conservó en papa-dextrosa-agar (PDA) a 25-28 °C. El Citrex (CitruPar 80^{MR}) fue agregado al PDA en las concentraciones de 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 1000 mg/L de i.a., después de la esterilización del medio y se colocaron 10-15 ml por caja de Petri. Se colocó un disco de micelio de 4 mm de diámetro de un cultivo de FOL de 7 días de edad, en el centro de cada caja de Petri; se hicieron cuatro repeticiones por tratamiento y se incubaron a ca. 25 °C y 12 h de luz por 10 días. Se midió el diámetro del crecimiento de la colonia cada 2 días. Con los datos recolectados el último día, se determinó gráficamente la Dosis Media Efectiva (DE₅₀), definida como la dosis del producto a la cual el diámetro de la colonia se redujo a la mitad, y se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por el método de Tukey, utilizando el programa Systat versión 5.0 (Systat, Inc. 1800 Sherman Av. Evaston, IL, 60201 USA)

Evaluación *in vivo*

Se realizó en plantas sembradas en bolsas de polietileno de 2 kg de capacidad, conteniendo una mezcla de sustrato 2:1 preparado con suelo franco-arcillo-limoso y cáscara de arroz, esterilizado con vapor e inoculado con una suspensión de 7 x 10⁵ microconidios del hongo/ml en una dosis de 100 ml/bolsa. Los tratamientos con Citrex se realizaron al momento del trasplante, 25 días después de la siembra, de la manera siguiente:

- T1: Inmersión de las raíces de las plantas en la solución de Citrex antes del trasplante
- T2: Aplicación semanal al suelo
- T3: Aplicación semanal al follaje
- T4: Aplicación al suelo + aplicación foliar semanalmente
- T5: Inmersión de de las raíces en la solución de Citrex + aplicación semanal al suelo
- T6: Testigo: suelo infestado sin aplicación de producto

El Citrex se utilizó en dosis de 1,5 L de producto comercial en 800 L de agua /ha. En los tratamientos de inmersión de raíces, éstas se dejaron 3 min en la solución del producto. En los tratamientos de aplicación

foliar y al suelo, se usaron 10 ml por planta de la misma solución. Las plantas estuvieron a exposición solar normal (condiciones de campo) y se regaron cada 3 ó 4 días según se requirió. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones. Las evaluaciones se llevaron a cabo semanalmente hasta 56 días después del trasplante, basándose en el grado de marchitez y de acuerdo a la siguiente escala: 0=Sin síntomas visibles de enfermedad, 1=Marchitez leve, similar a la falta de agua, 2=Similar a grado 1 + hojas amarillas o secas, en menos del 50% del follaje, 3=Similar a grado 1 + hojas amarillas o secas en 50% o más del follaje y 4=Plantas completamente marchitas.

Los valores de las clases se usaron para calcular el Índice de Marchitez (IM) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Marchitez (IM)} = \frac{\sum n_i s_i}{NS} \times 100$$

Donde:

n = planta individual

s = severidad de la marchitez (clase)

N = Número total de plantas

S = Valor máximo de severidad posible de marchitez

Con los valores de IM se construyeron las curvas de progreso de la enfermedad, se determinó el Area Bajo la Curva (ABC) (Shaner y Finney 1977) y con éste se realizó el análisis de varianzas y la comparación de medias por el método explicado antes. Al término del experimento (56 días después del trasplante), se evaluó la cosecha y se realizó el análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos utilizando el mismo programa.

Resultados

Evaluación *in vitro*

Se determinó un efecto reductor significativo ($P < 0,01$) de Citrex en el crecimiento micelial del hongo con todas las concentraciones del producto (Fig. 1). No hubo crecimiento del hongo con la dosis de 1000 mg/L y en los otros tratamientos la reducción varió desde 24% con 10 mg/L hasta 67% con 100 mg/L. Se realizó la linearización de la curva de respuesta a las dosis de Citrex y se determinó gráficamente la DE_{50} , la cual fue de 63 mg/L (Fig. 2); es decir, que a 63 mg/L se produjo una reducción del 50% en el avance del crecimiento diametral del micelio del hongo, en comparación con el testigo.

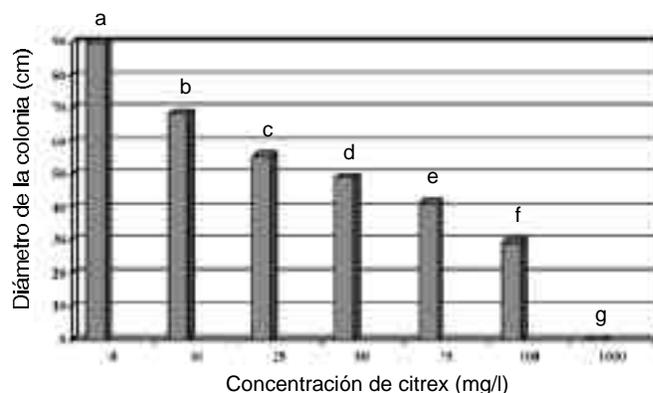


Figura 1. Desarrollo micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* expuesto a Citrex. Barras con diferente letra fueron estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

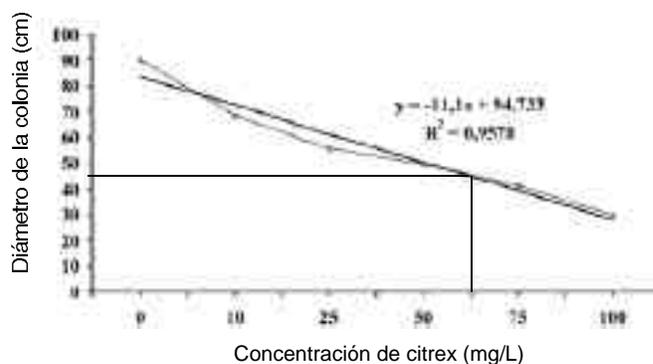


Figura 2. Dosis media efectiva de Citrex (DE_{50}) sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro*.

Evaluación *in vivo*

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos en cuanto al ABC (Fig. 3). Se observó que con la inmersión de las plantas en la solución de Citrex, más la aplicación semanal al suelo (T5) se obtuvieron los valores más bajos de ABC, con una reducción del 85% en la marchitez. La aplicación al suelo (T2) o la aplicación al follaje (T3) fueron estadísticamente similares y causaron una reducción del 42%; pero cuando estos dos tratamientos se combinaron (T4), la disminución de la enfermedad se incrementó al 64% (Fig. 3), considerándose el segundo mejor tratamiento.

Además de la reducción en los valores totales del ABC, se observó un retardo en la aparición de los síntomas en todos los tratamientos (Fig. 4). En el caso del tratamiento T5 se observó un retardo de seis semanas, mientras que en los tratamientos T2 y T4 fue de cuatro semanas.

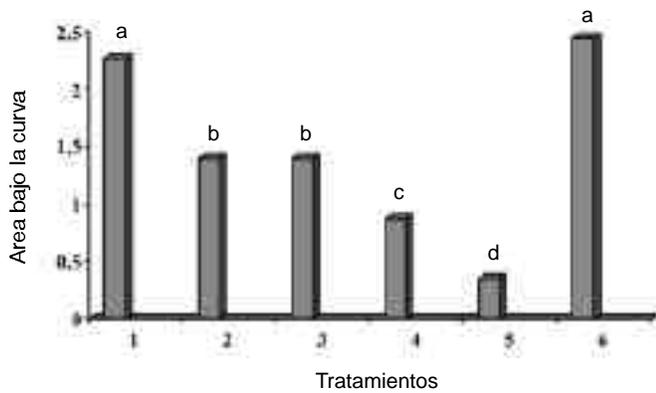


Figura 3. Area bajo la curva de progreso de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate cultivado en bolsas de polietileno y tratado con Citrex. Tratamientos: 1=Inmersión de raíces de plantas en la solución de Citrex antes del trasplante; 2= aplicación semanal de Citrex al suelo; 3= aplicación semanal de Citrex al follaje; 4= aplicación semanal al suelo y al follaje; 5= inmersión de raíces de plantas en solución de Citrex y aplicación semanal al suelo; 6= sin aplicación de Citrex. Barras con diferente letra fueron estadísticamente significativas ($P<0,01$).

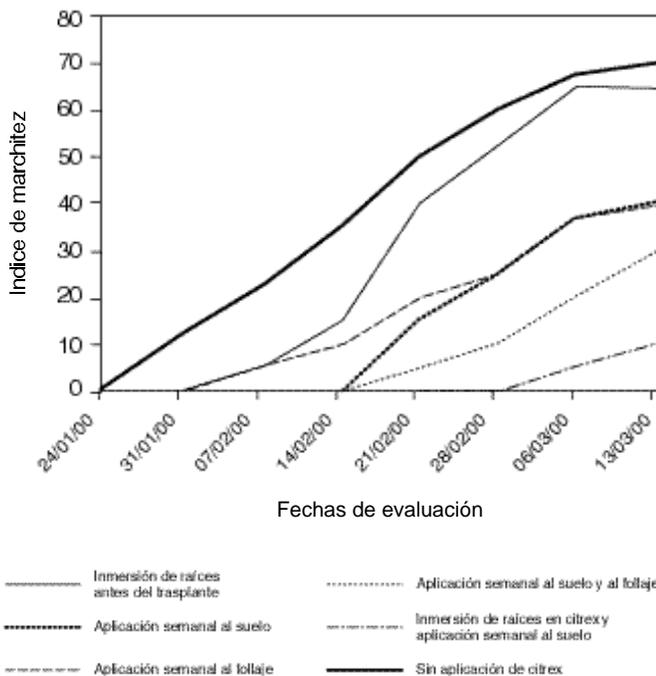


Figura 4. Curvas de progreso de la marchitez en tomate bajo diferentes tratamientos con Citrex.

En cuanto al rendimiento (Cuadro 1), el tratamiento T5 presentó la mayor producción de tomate (1,4 kg/planta) en el período del experimento, seguido por T4 (0,515 kg/planta). Se observa una relación directa entre la producción y la reducción de la marchitez.

Cuadro 1. Rendimiento de tomate por planta después del tratamiento con Citrex para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tratamientos	Rendimiento (g/planta)
Inmersión de raíces plantas en Citrex antes del trasplante	197 a
Aplicación semanal de Citrex al suelo	389 b
Aplicación semanal de Citrex al follaje	284 ab
Aplicación semanal de Citrex al suelo y al follaje	515 c
Inmersión de raíces plantas en Citrex antes del trasplante y aplicación semanal al suelo	1428 d
Sin aplicación de Citrex (testigo)	196 a

Discusión

El Citrex ocasionó una reducción del crecimiento micelial del hongo y de la marchitez del tomate. La prueba *in vitro* demostró un efecto directo del producto sobre el hongo y aunque en este trabajo no se determinó la naturaleza de ese efecto, otros consideran que pudo ser la ruptura de la membrana celular (Ecological Resources 2000).

Se observó, además, que el efecto deletéreo del producto sobre el hongo fue proporcional a la dosis aplicada; la concentración más alta evaluada (1000 mg/L) detuvo totalmente el crecimiento del hongo, lo cual equivale a 0,8 kg/ha del ingrediente activo o 1 kg/ha de producto comercial (sobre la base de una aplicación de 800 L/ha de agua).

El extracto de *C. paradisi* también tiene efecto sobre el control de la marchitez. La inmersión de las plantas en la solución del producto antes del trasplante tuvo un efecto protector al inicio, pero fue necesario realizar aplicaciones semanales al suelo para mantener la enfermedad bajo control. Aunque no se demostró en este trabajo, de acuerdo a los resultados, se supone que el producto es absorbido por las raíces y conducido a través de los vasos del xilema. Por otra parte, un 42% de reducción de la marchitez con la aplicación foliar sugiere, igualmente, una posible conducción hacia abajo por los vasos del floema. Sin embargo, estas translocaciones en ambos sentidos deben ser demostradas y actualmente se realizan trabajos en este sentido.

La aplicación del producto al suelo puede tener dos efectos: ser absorbido por las raíces y entrar en la corriente xilemática, o tener efecto sobre los propágulos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presentes en el suelo. Esto último fue observado por Bower y Locke (2000) al reducir la densidad poblacional de *F. oxysporum* f. sp. *chrysantemi* en el suelo en un 97,5; 96,1

y 99,9% con extractos de *Trifolium pratense*, *Cassia* sp. y *Piper* sp., respectivamente.

En un estudio histológico (Guédez *et al.* 2001), se observaron deposiciones de calosa en las células del xilema de las raíces de tomate inoculadas con *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* y sin tratamiento con fungicida, mientras que las plantas inoculadas y tratadas con Citrex no la presentaban. La calosa se forma como respuesta de la planta al ataque de *Fusarium* (Mueller *et al.* 1993, Beckman 1990). La ausencia de la misma en las plantas tratadas con Citrex sugiere la eliminación de *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* por la aplicación del producto, con lo cual se reduce el estímulo para la formación de calosa.

Deese y Stahmann (1962) demostraron la naturaleza enzimática del efecto de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate y señalaron que la reducción de la marchitez en las plantas resistentes podría deberse a la desactivación de las enzimas por efecto de las catequinas presentes en éstas. Se ha indicado que el extracto de *C. paradisi* contiene flavonoides, entre los que se mencionan la catequina (Ecological Resources 2000). Es posible que además del efecto directo sobre *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici*, Citrex tenga una acción neutralizadora sobre las enzimas de éste.

Los resultados de este trabajo abren la posibilidad de disponer de un producto natural para el manejo de enfermedades causadas por patógenos del suelo que es inocuo a los humanos.

Literatura citada

- Abdalla, ME; Elwakil, MA; Mathur, SB. 1998. *Fusarium oxysporum* associated with tomato seeds in Egypt. <http://w.w.bspp.org.uk/icpp98/abstracts/4.8.6.htm> - 07/02/2001.
- Auwah, RT. 1994. *In vivo* use of extract from *Ocimum gratissimum* and *Cymbopogon citrates* against *Phytophthora palmivora* causing blackpod disease of cocoa. *Ann. Appl. Biol.* 124:173-178.
- Beckman, CH. 1990. Host responses to the pathogen. In *Fusarium Wilt of Banana*. Ploetz, RC. Ed. St. Paul, Minnesota, APS. p. 93-105.
- Bower, JH; Locke, JC. 2000. Effect of botanical extract on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84:300-305.
- Bravo-Luna, L; Bermúdez-Torres, K; Montes-Belmont, R. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 57:29-34.
- Chavez, L; Gomez, C. 1995. Comportamiento de la "Sigatoka Negra" (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), con el uso de Lonlife (extracto de cítricos) en plátano (*Musa AAB*) en la Estación Local Chama. *Revista Forestal Venezolana* 1:5 (Resumen)
- Deese, DC; Stahmann, MA. 1962. Pectic enzymes in *Fusarium*-infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathology* 52:255-260.
- Diaz-Polanco, C; Salas de D, G. 1973. Nueva Lista de Patógenos de Plantas Cultivadas en Venezuela. Sociedad Venezolana de Fitopatología, Maracay. Boletín Especial No. 2. 59 p.
- Ecological Resources. 2000. Documentación de Registro. CitrusParTM y OikoSanTM. Ecological Resources, Inc. Miami, FL. 34 p.
- Elgersma, DM; MacHardy, WE; Beckman, CH. 1972. Growth and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in near-isogenic lines of tomato resistant or susceptible to wilt. *Phytopathology* 62:1232-1237.
- Guédez, C; Sanabria, ME; Rodríguez, D; Montilla, J. 2001. Histología de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectadas con *Fusarium oxysporum* y tratadas con citrex. In Congreso Venezolano de Fitopatología (17, 2001, Maracay, Venezuela).
- Guevara, Y; Maselli, A; Sánchez, MC. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 56:38-44.
- Jiménez, C; Sanabria de A, N. 1997a. Evaluaciones *in vitro* de siete fungicidas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitopatología Venezolana* 10:32 (Resumen).
- Jiménez, C; Sanabria de A, N. 1997b. Control biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitopatología Venezolana* 10:33 (Resumen).
- Jones, JP. 1991. *Fusarium* wilt. In *Compendium of Tomato Diseases*. Jones, JB; Jones, JP; Stall, RE; Zitter, TA. Ed. St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Lawson, M; Kennedy, R; Stopes, C. 1998. Evaluation of garlic oil and other chemicals for control of downy mildew (*Peronospora parasitica*) in organic production of brassicas. *Ann. Appl. Biol.* 132 (supplement):14-17.
- Mueller, WC; Morgham, AT; Roberts, EM. 1993. Immunocytochemical localization of callose in the vascular tissue of tomato and cotton plants infected with *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* 72:505-509
- Park, SW; Jeon, JH; Kim, HS; Joung, H. 1995. Effect of grapefruit seed extract on *Penicillium* growth and tuberization in tissue culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). (Abstract). *Journal of the Korean Society for Horticultural Science.* 36:179-184.
- Reyes, J; Sanabria de A, N. 1997. Diagnóstico de enfermedades fúngicas en tomate (*Lycopersicon esculentum*) en algunas zonas productoras de los estados Aragua y Guarico. *Fitopatología Venezolana* 10:36 (Resumen).
- Rodríguez, D; Montilla, JO. 2000. Reducción de la marchitez por *Fusarium* en Tomate con extracto de semilla de *Citrus paradisi* (CitrusPar80^{MR}). In Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. (46, 2000, Miami, FL) (Abstract)
- Shaner, G; Finney, RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056
- Tessier, BJ; Mueller, WC; Morgham, AT. 1990. Histopathology and ultrastructure of vascular responses in peas resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 80:756-764.
- Turlier, MF; Epavier, A; Alabouvette, C. 1994. Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic GUS-marked hyphae. *Can. J. Bot.* 72:1605-1612.
- Urtiaga, R. 1986. Índice de Enfermedades en Plantas de Venezuela y Cuba. Barquisimeto, Lara, Venezuela. 202 p.