

## EFFECTIVIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES Y MICROORGANISMOS EFICIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE *Sclerotium rolfii*\*

### Effectiveness of plant extracts and effective microorganisms on growth in vitro of *Sclerotium rolfii*

Yadira Flores<sup>1</sup>, Antonio Romero<sup>1</sup> y Yinny Mujica<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Se evaluaron dieciocho extractos vegetales y microorganismos eficientes (EM) sobre el crecimiento micelial *in vitro* y formación de esclerocios de *Sclerotium rolfii*. Los extractos se prepararon con 50 g de hojas jóvenes de tuatúa (*Jatropha gossypifolia*), merey (*Anacardium occidentale*), orégano (*Origanum vulgare*), nim (*Azadirachta indica*), corocillo (*Cyperus rotundus*), cundeamor (*Memordica charantia*), lecherito (*Chamaesyce irta*), cariaquito (*Lantan camara*), mango (*Mangifera indica*), matarratón (*Gliricidia sepium*), culantro (*Coriandrum sativum*), onoto (*Bixa orellana*), yuquilla (*Digitaria sanguinalis*), sábila (*Aloe vera*), bulbos de ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*), hojas y fruto de noni (*Morinda citrifolia*), mas 180 ml de agua destilada estéril. Se tomaron 3 ml de cada uno de los extractos y se mezclaron con 15 ml de agar-malta y se dispensaron en cápsulas de Petri. Para los microorganismos eficientes se midieron 3 ml del producto comercial y se disolvieron en 15 ml de agar malta. Una vez solidificado el medio se sembró la colonia del hongo. Durante 5 días se midió el crecimiento micelial. A los 8 días se cuantificó la formación de estructuras de reproducción. Los resultados indican que los extractos de ajo, yuquilla, nim, orégano, cundeamor y matarratón inhibieron el crecimiento micelial de *S. rolfii*, durante los primeros 3 días. El testigo y el resto de los tratamientos permitieron el crecimiento del micelio del patógeno durante los 5 días de observación. Referente a la formación de estructuras de reproducción, los extractos de yuquilla y matarratón, fueron más efectivos en el control de *S. rolfii*. El efecto inhibitorio de EM sobre el crecimiento del patógeno fue constante en el tiempo ya que inhibió completamente el crecimiento micelial y la formación de estructuras de reproducción.

**Palabras clave:** patógeno, estructuras de reproducción, inhibición, crecimiento.

#### ABSTRACT

Eighteen plant extracts and effective microorganisms (EM) were evaluated on mycelial growth In Vitro and formation of sclerotia of *Sclerotium rolfii*. Extracts were prepared with 50 g of young leaves of *Jatropha gossypifolia*, *Anacardium occidentale*, *Origanum vulgare*, *Azadirachta indica*, *Cyperus rotundus*, *Memordica charantia*, *Chamaesyce irta*, *Lantan camara*, *Mangifera indica*, *Gliricidia sepium*, *Coriandrum sativum*, *Bixa orellana*, *Digitaria sanguinalis*, *Aloe vera*, *Allium sativum* bulbs, *Allium cepa* bulbs, and leaves and fruit of *Morinda citrifolia*, more 180 ml of sterile distilled water, 3 ml of each extracts and 15 ml of agar - malt mixed, dispensed in capsules Petri, equal was done for EM . Once the middle of the fungus was solidified the colony planted. Mycelia growth was measured for 5 days. At 8 days the formation of reproductive structures was determined. The results indicate that extracts of *Allium cepa*, *Digitaria sanguinalis*, *Azadirachta indica*, *Origanum vulgare*, *Memordica charantia* and *Gliricidia sepium* inhibited the mycelia growth of *S. rolfii*, during the first 3 days. The control and other treatments allowed mycelia growth of the pathogen during the 5 days. Regarding the formation of reproductive structures, *Digitaria sanguinalis*, *Gliricidia sepium* extracts allowed a minimum formation of sclerotic being the most effective in the control of *S. rolfii*. The inhibitory effect of EM on the growth of the pathogen was constant over time, and that completely inhibited the mycelia growth and the formation of reproductive structures.

**Key words:** pathogen, reproductive structure, inhibition, growth.

(\*) Recibido: 06-04-2014

Aceptado: 08-09-2014

<sup>1</sup> Fundacion La Salle de Ciencias Naturales Campus Cojedes. E-mail: yaflo62@gmail.com, romerof.antonio@gmail.com.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Sanidad Agropecuaria Integral. E-mail: Yinny7140@hotmail.com.

## INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas, son causadas por hongos habitantes del suelo. Dentro de estos patógenos se encuentra *Sclerotium rolfsii*, el cual es una especie de hongo causante de más de un centenar de enfermedades en especies vegetales, coloniza los conductos xilemáticos de la planta, bloquea los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y eventualmente necrosis y muerte total de la planta (Smith *et al.* 1986).

*S. rolfsii* es un patógeno del suelo de difícil control, su diseminación en el campo se efectúa a través de material de propagación infectado, fragmentos de plantas enfermas y movimiento de suelo infestado con esclerocios, los cuales pueden sobrevivir hasta por más de 20 años (Haglund y Kraft, citados por Rodríguez *et al.* 2010). Debido a que posee estructuras de reproducción y resistencia llamadas esclerocios, este patógeno tiene la capacidad de penetrar en los haces vasculares del centro de la raíz produce oclusión y se difunde sin activar los mecanismos de detección y defensa del huésped (Agrios 2005).

La incidencia de este patógeno, trae consigo una baja densidad de población, disminución de la producción y por consiguiente pérdidas económicas en los cultivos. Por tanto se deben tomar medidas preventivas que eviten la aparición de esta enfermedad. Su control se ha basado tradicionalmente en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y el surgimiento de poblaciones de plagas más agresivas y resistentes a ellos (FAO 2002).

Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control de plagas que se inserten en el desarrollo de agro sistemas sostenibles, basados en un manejo integrado de cultivos sin alterar el equilibrio del sistema (Bunch 1997). Una de estas alternativas es el uso de extractos de plantas que actúan como pesticidas o simplemente como reguladores del desarrollo de los patógenos (Cuttler y Schmutters 1999). El efecto fungistático o fungicida de extractos de plantas cultivadas o

silvestres ha quedado demostrado en diversos pato sistemas (Debey y Kishore 1987; Roa *et al.* 1992; Awuah 1994; Bianchi *et al.* 1997; Rodríguez y Montilla 2002; Zapata *et al.* 2003; De Marcano *et al.* 2005; Flores *et al.* 2011).

Actualmente se están utilizando EM, producto comercial conformando por tres tipos de organismos: levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas, las cuales desarrollan sinergia metabólica que permite su aplicación en diferentes campos de la ingeniería (Najar y Thomas 2001).

Eco tecnologías (2014) indicó que EM es un cultivo mixto de microorganismos benéficos naturales, sin manipulación genética, presentes en ecosistemas naturales, fisiológicamente compatibles entre sí, usado como una opción viable y sostenible para la producción agrícola y animal dentro de parámetros orgánicos y biológicos, que no afectan el medio ambiente, para lograr productos de alta calidad con bajo costo.

En este producto, según lo expuesto por Edens *et al.* (1997), un grupo de microorganismos eficientes alcanza una copropiedad por medio de la cooperación y la coexistencia en un medio líquido natural y al momento en que se introduce al ambiente, los efectos sinérgicos son beneficiosos.

Por lo antes expuesto, es necesario evaluar alternativas de control menos peligrosas y efectivas para el manejo de las plagas y enfermedades, como los extractos vegetales y microorganismos eficaces. El objetivo del trabajo fue evaluar la efectividad de 18 extractos vegetales y microorganismos eficientes sobre el crecimiento micelial *in vitro* y formación de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Estación de Investigaciones Agropecuarias y de Extensión (EDIAGRO) de Fundación La Salle Campus Cojedes, ubicada en el municipio San Carlos del Edo. Cojedes, durante el segundo semestre del año 2013.

Para ello, se seleccionaron 18 extractos vegetales, un producto biológico llamado

comercialmente Microorganismos eficientes (EM) y un testigo (Tabla 1).

La colonia del hongo se aisló de una siembra de pimentón ubicada en terrenos de Fundación La Salle Campus Cojedes.

Elaboración de los extractos: se utilizó la metodología propuesta por Bianchi *et al.* (1997) modificada, se seleccionaron hojas terminales de plantas adultas de tuatúa, merey, orégano, nim, corocillo, cundeamor, lecherito, cariaquito, mango, matarratón, yuquilla, sábila, culantro y onoto, también se seleccionaron bulbos de ajo y cebolla y hojas y fruto de noni, se lavaron con agua corriente y una solución de hipoclorito de sodio al 2%, luego con agua destilada estéril. Se tomaron 50 g de cada una de las partes seleccionadas, más 180 ml de agua destilada estéril, se licuaron durante 5 minutos, fueron coladas y pasadas por una gasa para eliminar los restos de partes vegetales. En la cámara de flujo laminar, se colocaron 3 ml de cada uno de los extractos y 15 ml de agar malta, se agitó ligeramente hasta que se formó una mezcla homogénea y se dispensó en cápsulas de petri previamente esterilizadas. Una vez solidificado el medio se procedió a sembrar la colonia del hongo. Al testigo absoluto se le colocaron 3 ml de agua destilada estéril y luego se sembró la colonia.

Los datos se tomaron a las 72 y 120 horas midiendo el crecimiento del micelio del hongo con una regla graduada (cm). A los 8 días se cuantificó manualmente el número total de esclerocios formados.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 20 tratamientos y 5 repeticiones

por cada tratamiento. Los datos fueron analizados estadísticamente, aplicando un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Duncan. Se utilizó el paquete estadístico stadgrafic.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de extractos vegetales y EM sobre el crecimiento micelial de *S. rolfsii*

El efecto inhibitorio de los extractos vegetales y EM sobre *Sclerotium rolfsii* fue variable y se observaron diferencias ( $P < 0,05$ ) entre extractos vegetales, EM y el testigo.

La prueba de Duncan (Tabla 2) muestra 6 grupos de medias. En el grupo 1 los extractos de ajo, nim y EM inhibieron el crecimiento micelial y en menor cuantía yuquilla, matarratón, cundeamor y orégano, con valores desde 0,04 hasta 0,06 cm. El resto de los extractos, no inhibieron el desarrollo del micelio. De igual modo, el testigo no inhibió el crecimiento del patógeno. En el grupo 6 se encuentran los extractos que generaron mayor crecimiento (1,274 en extracto de sábila y 1,3080 cm en extracto de tuatúa).

El extracto de ajo ha sido utilizado en investigación sobre propiedades anti fúngicas de extractos vegetales, la mayoría de las veces ha generado resultados positivos. Chávez y Aquino (2012) demostraron que el extracto de ajo inhibió el crecimiento micelial de tres hongos; así como la esporulación de *Fusarium* sp. y la producción de esclerocios de *Sclerotium* sp. Chávez (2012) observó que el extracto de ajo presentó la menor área de crecimiento micelial ( $0,34 \text{ cm}^2$ ) *in vitro* del hongo *Rhizoctonia* sp.

**Tabla 1. Extractos vegetales empleados en el control de crecimiento de *Sclerotium rolfsii*.**

Extracto	Extracto
T1. Sábila ( <i>Aloe vera</i> )	T11. Fruto de Noni ( <i>Morinda citrifolia</i> )
T2. Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	T12. Yuquilla ( <i>Digitaria sanguinalis</i> )
T3. Corocillo ( <i>Cyperus rotundus</i> )	T13. Tuatua ( <i>Jatropha gossypifolia</i> )
T4. Cundeamor ( <i>Momordica charantia</i> )	T14. Matarratón ( <i>Gliricidia sepium</i> )
T5. Hojas de Noni ( <i>Morinda citrifolia</i> )	T15. Culantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )
T6. Nim ( <i>Azadirachta indica</i> )	T16. Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )
T7. Lecherito ( <i>Chamaesyce irta</i> )	T17. Merey ( <i>Anacardium occidentale</i> )
T8. Onoto ( <i>Bixa orellana</i> )	T18. Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )
T9. Cariaquito ( <i>Lantanacamara</i> )	T19. E.M.
T10. Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	T20. Testigo

Tabla 2. Crecimiento micelial para el día 3 de *Sclerotium rolfisii* sometido 20 tratamientos.

Tratamientos	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
Ajo	0,00			-cm-		
Nim	0,00					
EM	0,00					
Yuquilla	0,04					
Matarratòn	0,06					
Cundeamor	0,06					
Orégano	0,06					
Culantro		0,76				
Fruto Noni		0,86	0,86			
Onoto		0,92	0,92	0,92		
Cariaquito			1,05	1,05	1,05	
Hojas Noni			1,06	1,06	1,06	
Merey			1,06	1,06	1,06	
Cebolla			1,16	1,16	1,16	
Mango			1,16	1,16	1,16	
Lecherito				1,19	1,19	
Corocillo				1,20	1,20	
Sábila					1,27	1,27
Tuatúa					1,31	1,31
Testigo						1,53
<b>Sig.</b>	<b>0,70</b>	<b>0,25</b>	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>	<b>0,10</b>	<b>0,06</b>

A pesar de que en el presente trabajo se utilizó una concentración de 277,00 g/L, estos resultados coinciden con los obtenidos por Barros *et al.* (1995) y Gasparin *et al.* (1998), quienes señalaron el efecto inhibitor del extracto de ajo sobre el crecimiento de diferentes hongos como: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria spp.* y *Curvularia spp.*, cuando utilizaron concentraciones entre 8 y 50 g/L.

Así mismo, los resultados concuerdan con los obtenidos por Chávez y Aquino (2012) quienes reportan que el extracto de ajo inhibió el crecimiento micelial de los hongos *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Sclerotium sp.*; así como la esporulación de *Fusarium sp.* y la producción de esclerocios de *Sclerotium sp.*

Sarubbi (2002) observó una inhibición de 100% del crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* con extracto de ajo a 30.000 ppm. López *et al.* (2005) obtuvieron inhibición del crecimiento del hongo en 98 y 100% utilizando

extracto de ajo en concentraciones de 5 y 10%, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Niño *et al.* (2007), quienes informaron actividad inhibitoria de extractos de *Syzygium aromaticum*, *Lippia alba*, *Allium cepa*, *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia sp.*, *Plenax sp* contra *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium sp.* En estos estudios se ha demostrado que algunos agentes protectores o inductores de resistencia por su actividad como anti fúngicos son cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas.

Alvarado *et al.* (2012) evaluaron extractos etanólicos de orégano silvestre (*Lippia origanoides*) y nim en el control de *S. rolfisii* y *S. cepivorum*, este patógeno no se desarrolló cuando se combinaron ambos extractos, se obtuvo inhibición de 71,4 % con respecto al testigo. En contraste, *S. rolfisii* creció 100% en aquellos tratamientos con *A. indica*, pero

no creció en extracto de *L. organoides*. Para el quinto día del crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* hubo diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos.

En la Tabla 3 se aprecian 8 grupos de medias para crecimiento de micelio al quinto día. El grupo 1 formado por el tratamiento con EM inhibió el crecimiento del micelio; mientras que en el grupo 2 los extractos de yuquilla y ajo permitieron un ligero crecimiento del patógeno. Los extractos de cundeamor y orégano pertenecientes también a este grupo, igualmente causaron un efecto inhibitorio; pero menor que el extracto de ajo (0,7120 cm) y yuquilla (0,9 cm). El resto de los extractos no produjo efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio, permitieron desarrollo desde 0,96 hasta 1,56 cm, este último mayor que el testigo (1,02 cm).

Al comparar el crecimiento micelial de *S. rolfsii* sometido a 18 extractos vegetales y EM, se evidencia que para el día 5 EM continúa con su

acción inhibitoria sobre el patógeno, seguida por los extractos de ajo y yuquilla.

Con respecto al modo de acción de EM, Higa y Parr (1994) aseguran que es una solución que contiene varios microorganismos benéficos tanto aeróbicos como anaeróbicos, los cuales ejercen acción antagonista contra patógenos.

La acción anti fúngica del EM se debe según FUNDASES (2005), a los microorganismos que lo constituyen (bacterias fotosintéticas *Rhodospseudomonas* spp, ácido lácticas *Lactobacillus* spp. y levaduras *Sacharomyces* spp), que toman sustancias generadas por otros organismos y basan en ello su funcionamiento y desarrollo. Cuando los microorganismos eficaces incrementan su población, como una comunidad en el medio en que se encuentran, se incrementa la actividad de los microorganismos naturales, lo cual suprime microorganismos patógenos. APNAN (1995) afirmó que las bacterias ácido lácticas

**Tabla 3. Crecimiento micelial para el día 5 de *Sclerotium rolfsii* sometido a 20 tratamientos.**

Tratamientos	Grupos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
EM	0,00							
Yuquilla		0,58						
Ajo		0,60						
Cundeamor		0,71	0,71					
Orégano		0,90	0,90	0,90				
Matarratòn			0,96	0,96	0,96			
Testigo			1,02	1,02	1,02			
Mango				1,10	1,10	1,10		
Nim				1,12	1,12	1,12		
Onoto				1,16	1,16	1,16	1,16	
Culantro				1,20	1,20	1,20	1,20	
Cebolla				1,22	1,22	1,22	1,22	1,22
Hojas noni				1,24	1,24	1,24	1,24	1,24
Fruto noni					1,26	1,26	1,26	1,26
Merey					1,26	1,26	1,26	1,26
Cariaquito					1,30	1,30	1,30	1,30
Tuatúa					1,30	1,30	1,30	1,30
Corocillo						1,38	1,38	1,38
Lecherito							1,48	1,48
Sábila								1,56
<b>Sig.</b>	<b>1,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,064</b>	<b>0,13</b>	<b>0,08</b>	<b>0,06</b>

producen ácido láctico a partir de azúcares y carbohidratos elaborados por bacterias fotosintéticas y levaduras, se cree que la presencia de ácido láctico, origina sustancias antibacteriales (antibióticas) inhibitoras de patógenos.

**Efecto de extractos vegetales y EM sobre la formación de esclerocios de *S. rolfii***

Referente a la formación de esclerocios hubo diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos. La prueba de comparación de medias de Duncan (Tabla 4) muestra 6 grupos, el grupo 1 conformado por los extractos de ajo, orégano, cundeamor y EM inhibieron totalmente la formación de esclerocios. En este grupo los extractos de nim, yuquilla y matarratón permitieron que se formaran menos de 50 esclerocios. En el resto de los extractos el patógeno produjo más de 90 esclerocios, estas estructuras de reproducción y diseminación son indispensables para que el hongo pueda causar la enfermedad. Una reducción de su crecimiento vegetativo, por efecto de los extractos, ocasionaría una disminución del número de esclerocios

producidos y en consecuencia de la diseminación de la enfermedad.

Resultados similares fueron encontrados por De Marcano *et al.* (2005) quienes evaluaron el efecto antifúngico de extractos de tártago (*Ricinus communis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), mastuerzo (*Lepidium virginicum*), ajo y nim sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfii* y *Thielaviopsis basicola*. El número de esclerocios fue menor en los extractos de ajo y nim.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los obtenidos por Chirinos y Rodríguez (2005), quienes evaluaron los extractos de nim, ajo y cebolla en el control de *Fusarium sp.* y otros patógenos, los cuales resultaron promisorios en la inhibición del crecimiento y formación de estructuras de reproducción.

Referente a EM, se mantuvo la acción anti fuñica durante los 5 días de evaluación del crecimiento micelial y la formación de esclerocios, estos resultados coinciden con los obtenidos por Moya (2001) y Flores *et al.* (2013), quienes

**Tabla 4. Número de esclerocios para el día 8 de *Sclerotium rolfii* sometido a 20 tratamientos.**

Tratamiento	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
Ajo	0,00					
Cundeamor	0,00					
Orégano	0,00					
EM	0,00					
Nim	3,80					
Matarratón	4,00					
Yuquilla	5,40					
Hojas Noni		92,20				
Frutos noni		99,20				
Merey		104,20				
Corocillo		107,60	107,60			
Lecherito		110,00	110,00			
Tuatúa		114,00	114,00			
Culantro		119,60	119,60			
Cebolla		128,40	128,40	128,40		
Mango		129,60	129,60	129,60		
Sábila			152,40	152,40	152,40	
Testigo				171,40	171,40	
Onoto					179,00	
Cariaquito						243,20
<b>Sig.</b>	<b>0,83</b>	<b>0,13</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,23</b>	<b>1,00</b>

realizaron trabajos sobre aplicación de EM en el manejo de *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium* y *Sclerotium*, los resultados indicaron que EM ejerció control absoluto sobre el crecimiento e incidencia de los patógenos en los cultivos de pimentón y musáceas estudiados.

## CONCLUSIONES

Los extractos de ajo, yuquilla, nim, orégano, cundeamor y matarratón inhibieron el crecimiento micelial de *S. rolfsii* durante los primeros 3 días ( $P < 0,05$ ). Por tanto, se podrían aprovechar en mezclas, para aumentar su efecto inhibitorio sobre el hongo.

El resto de los extractos no causaron efecto en el crecimiento del patógeno durante 5 días de observación.

El efecto inhibitorio de EM sobre el crecimiento del patógeno fue constante en el tiempo, inhibió completamente el crecimiento micelial y formación de estructuras de reproducción.

Los extractos ajo, yuquilla, nim, orégano, cundeamor, matarratón y microorganismos eficientes pueden constituir alternativas dentro del manejo integrado de plagas de *Sclerotium rolfsii*.

## REFERENCIAS

Agrios, G. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. México DF. 838p.

Alvarado, S., Ulacio, D., Sanabria, C. y Jiménez, T. 2012. Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* sacc. y *Sclerotium cepivorum* Berk. [On línea]: En: [http://www.lareferencia.info/vufind/Record/VE\\_c127c530806fd99603915a09900b6aea/Details](http://www.lareferencia.info/vufind/Record/VE_c127c530806fd99603915a09900b6aea/Details). [julio 2014].

APNAN (Asia Pacific Natural Agriculture Network). 1995. EM Application Manual for APNAN countries. [On línea]: En: <http://www.agriton.nl/apnanman.html>. [enero 2014].

Awuah, R. 1994. In vivo use of extracts from *Occinum gratissimum* and *Cymbopogon citrates* against *Phytophthora palmivora* causing blackpod disease of cocoa. Ann. Appl. Biol. 124: 173-178.

Barros, S., De Oliveira, N. e Maia, L. 1995. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinacao de conidios de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. Summa Phytopathologica 21: 168-170.

Bianchi, A., Zanbonelli, A. Zenechi, A. and Bellesia, A. 1997. Ultrastructural studies of the effect of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. Plan Dis. 81:1241-1246.

Bunch, R. 1997. Principios de la Agricultura Orgánica. Hoja a Hoja (Costa Rica) 20, 2-6.

Chávez, A. 2012. Control alternativo con extractos vegetales de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, Departamento de Protección Vegetal. Carrera de Ingeniería Agronómica, FCA, UNA. Paraguay, 51 p.

Chávez, A., y Aquino, S. 2012. Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. con extractos vegetales. Investig. Agrar. 14(1):17-23.

Chirinos, J. y Rodríguez, I. 2005. Control in vitro de *Fusarium* sp. mediante el uso de extractos vegetales. Resúmenes. XIX Congreso Venezolano de fitopatología. Fitopatología Venezolana 18 (2): 50.

Cuttler, P. and Schmitterer, H. 1999. Natural pesticides from the Neem seed and other plants. J. Ethnopharmacology 333, 11-19.

Debey, N. and Kishore, N. 1987. Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils. Tropic Sci. 27: 23-27.

- De Marcano, D., Vargas, N. y Pire, A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Rev. Fac. Agron.* 22 (4): 315-324. [On line]: En: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182005000400001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000400001&lng=es&nrm=iso). [enero 2014].
- Edens, F., Parkhuist, C., Casas, I. and Dobrogosz, W. 1997. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. Poultry Science Association: 179-196. [On line]: En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9037704>. [julio 2014].
- FAO. 2002. Hacia la Agricultura Sostenible. Foro de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [On line]: En: <http://www.fao.org/inicio.htm>. [Enero 2014].
- Flores, Y., Pacheco, M. y Cáceres, L. 2011. Efecto in vitro de 5 extractos acuosos vegetales y EM (Microorganismos Eficaces) sobre el crecimiento micelial y formación de esclerocios de *Rhizoctonia solani* aislado de maíz. Memorias de las XIX Jornadas Técnicas de investigación y II de posgrado. UNELLEZ. Pp.285-291.
- Flores, Y., López, F. y Villanueva, J. 2013. Efecto del EM y *Trichoderma* sp. sobre la incidencia de *Fusarium* y *Sclerotium rolfsii* en una siembra experimental de pimentón. *Agrollanía* 10:38-43.
- FUNDASES (Fundación de Asesorías para el Sector Rural, Co) 2005. EM. Microorganismos eficaces. Bogotá, Co. [On line]: En: <http://www.fundases.com/userfiles/file/Cartilla%20EM%20Manejo%20Residuos%20Solidos.pdf>. [Febrero 2014].
- Gasparin, M., Morales, L., Schwan, G., Estrada, N. e Stangarlin, J. 1998. Efeito do oleo essencial e do extrato bruto de alho (*Allium sativum*) no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Alternaria stenii*. *Summa Phytopathologica* 24(1): 74.
- Higa, T. and Parr, J. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center Atami, Japan. [On line]: En: <http://emproducts.co.uk/downloads/EM.pdf>. [abril 2014].
- López, A., López, S., Vásquez, M., Rodríguez, S., Mendoza, M., y Padrón, E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología* [On line]: En: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>. [febrero 2014].
- Moya, F. 2001. Evaluación de la aplicación de microorganismos eficaces (EM) y derivados de este, en el manejo del hongo Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo de banano bajo un sistema agroforestal. [On line]. En: [http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base\\_datos/sigatoka\\_negra\\_en\\_sistema\\_agroforestal.pdf](http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/sigatoka_negra_en_sistema_agroforestal.pdf). [enero 2014].
- Najar, T. y Thomas, S. 2001. El efecto de los microorganismos eficaces en la supresión del hongo *Moniliophthora roreri* bajo condición de laboratorio y campo con inoculación artificial. Trabajo de Graduación. Mercedes de Guácimo, Universidad EARTH. Costa Rica [On line]. En: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/pdf/98095.pdf>. [julio 2014].
- Niño, J., Ospina, J., Mosquera, O. y Correa, Y. 2007. Determinación de la actividad anti fúngica de extractos vegetales sobre los hongos *Fusarium* sp y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica* XIII. (33): 425. [On line]. En: [http://www.researchgate.net/publication/26544132\\_Determinacin\\_de\\_la\\_actividad\\_antifngica\\_de\\_extractos\\_vegetales\\_sobre\\_el\\_hong](http://www.researchgate.net/publication/26544132_Determinacin_de_la_actividad_antifngica_de_extractos_vegetales_sobre_el_hong)



o\_Mycosphaerella\_fijiensis\_Morelet [enero 2014].

Roa, G., Singh, M. and Singh, H. 1992. Fungitoxi evaluation of essential oils extracted from higher plants against some sugarcane pathogens in vitro. *Tropic Sci.* 32: 377-382.

Rodríguez, D. y Montilla, J. 2002. Disminución de la marchitez causada por fusarium en tomate con extracto de *Citris paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 63: 46-50.

Rodríguez, J., Velandia, J. y Viteri, S. 2010. Evaluación de Microorganismos aislados de gallinaza por su potencial para el biocontrol de *Fusarium (F. oxysporum)* en plántulas de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín.* 63(2): 5499-5509 [On line]. En: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179918602004>. [diciembre 2013]

Sarubbi, H. 2002. Control alternativo de *Rhizoctonia solani* Kuhn en petunia (*Petunia x hybrida*). Tesis Maestría. San Lorenzo, FCA. UNA. Paraguay, 37 p.

Smith, V., Punja Z. and Jenkins, S. 1986. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 76: 755-759.

Zapata, R., Sanabria, M. y Rodríguez, D. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaría (*Cereusdeficiens* Otto &Diert.) *Interciencia* 28: 302 – 306.