

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL LIMONCILLO (*Cymbopogon citratus*) EN EL TOMATE (*Lycopersicon esculentum*) *in vitro*

EVALUATION OF THE FUNGICIDE ACTIVITY OF LEMONGRASS (*Cymbopogon citratus*) IN THE TOMATO (*Lycopersicon esculentum*) *in vitro*

William Andrés Flórez Bermúdez¹ & Hans T. Castro Salazar²

1. Estudiante de Ingeniería Ambiental, Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA, Grupo de Aplicación e Investigación Ambiental-GAIA. waflorez@corhuila.edu.co
2. Químico, Ph. D, Docente, Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA, Grupo de Aplicación e Investigación Ambiental-GAIA. hans.castro@corhuila.edu.co

Recibido: Junio 15 de 2017 Aceptado: Noviembre 19 de 2017

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación consistió en evaluar *in vitro* la efectividad inhibitoria del aceite esencial (AE) de hojas de *Cymbopogon citratus* en el *Fusarium oxysporum* presente en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Química Ambiental ubicado en la Corporación Universitaria del Huila- CORHUILA, en el municipio de Neiva (Huila). Se inició con la extracción de AE de hojas de *C. citratus*, empleando el método de hidrodestilación con arrastre de vapor, luego de la extracción, se envió la muestra de AE al laboratorio de la UIS, en donde se caracterizó su composición química por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, luego se calculó el rendimiento del AE, obteniendo un 0,5 %. Posteriormente, se recolectó las muestras de hojas, fruto y tallo con rasgos de contaminación para ser incubadas durante siete días en cajas de Petri con medio de cultivo, hasta obtener una cepa de hongo pura, aislada la cepa, fueron comparadas de manera microscópicas aplicando el atlas de micología de Saldarriaga y algunas claves taxonómicas, logrando identificar al *F. oxysporum*. La actividad fungicida se analizó mediante la siembra directa en superficie de agar papa dextrosa en concentraciones de 1000, 1500 y 2000 ppm con cinco repeticiones, además de emplear dos muestras de testigo absoluto y dos de testigo comercial, durante siete días. Los resultados fueron favorables puesto que las tres concentraciones observaron un porcentaje fúngico del 100 %, esto puede ser debido al citral (mezcla entre dos estereoisómeros, genaral 48,2 % y neral 34,9 %). Razón por la cual, se puede asegurar que el AE de *C. citratus* podría ser una solución viable ante los problemas de este hongo fitopatógeno

Palabras claves: fúngicida, *Cymbopogon citratus*, *Fusarium oxysporum*, incubar y *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

The objective of the present investigation consisted in evaluating *in vitro* the inhibitory effectiveness of the essential oil (AE) of leaves of *Cymbopogon citratus* in the *Fusarium oxysporum* present in tomato (*Lycopersicon esculentum*). The work was carried out in the Research Laboratory in Environmental Chemistry located in the University Corporation of Huila-CORHUILA, in the municipality of Neiva (Huila). It began with the extraction of AE from leaves of *C. citratus*, using the method of hydrodistillation with steam drag, after the extraction the sample of AE was sent to the laboratory of the UIS, where it was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry, then the performance of the AE was calculated, obtaining 0,5 %.

Subsequently, the leaf samples were collected, fruit and stem with contamination traits were collected to be incubated for seven days in Petri dishes with culture medium, until obtaining a strain of pure fungus, isolated the strain, were compared in a microscopic way by applying the atlas Mycology of Saldarriaga and some taxonomic keys, managing to identify *F. oxysporum*.

The fungicidal activity was analyzed by direct seeding on the surface of potato dextrose agar in concentrations of 1000, 1500 and 2000 ppm with five repetitions, besides using two samples of absolute control and two samples of commercial control, during seven days. The results were favorable since the three concentrations observed a fungicidal percentage of 100 %, this may be due to citral (mixture between two stereoisomers, genaral 48.2 % and neral 34.9 %). Reason why, it can be assured that the AE of *C. citratus* could be a viable solution to the problems of this phytopathogenic fungi.

Keywords: fungicidal, *Cymbopogon citratus*, *Fusarium oxysporum*, incubate y *Lycopersicon esculentum*.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia ocupa el segundo lugar en biodiversidad y se encuentra entre las doce naciones más megadiversas del planeta, debido a estar situados en una zona tropical, tiende a albergar un ambiente óptimo para el desarrollo de diversas especies. Hasta el momento 54.871 registradas (COLCIENCIAS, 2016), compartiendo con Brasil el primer lugar en biodiversidad y el segundo en diversidad de plantas, respecto a este último, el país tiene un estimado de 27.881 especies, más del 10 % de todas las que se conocen a nivel mundial, usadas comúnmente para fines medicinales muy diversos (Bernal, García, & Quevedo, 2011).

Por lo tanto, es importante hacer uso de la gran biodiversidad vegetal que se tiene, fortaleciendo las investigaciones en algunas de estas especies vegetales que poseen aceites esenciales con principios activos interesantes, ya que poseen metabolitos secundarios, los cuales están compuestos por una mezcla compleja de terpenoides, principalmente, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y el color característico de las plantas (Betts, 2001).

La presencia de los monoterpenos volátiles o aceites esenciales en las plantas constituyen una importante estrategia de defensa contra animales herbívoros y sobretodo en plagas de insectos y hongos patógenos (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

De acuerdo con la información del párrafo anterior, los aceites esenciales se destacan por estar al alcance y contener múltiples posibilidades de aplicación en la agricultura, contrarrestando microorganismos que afectan cultivos de gran relevancia económica y de seguridad alimentaria.

Razón por la cual, en la presente investigación, fue preciso analizar la actividad fungicida del aceite esencial del limoncillo (*Cymbopogon citratus*), contra el *Fusarium oxysporum*, patógeno que por ser habitante del suelo, es difícil de controlar y causa pérdidas entre el 21 % y 47 % en cultivos de libre exposición y bajo cubierta (Ramayabharathi, Meena, & Raguchander, 2012) y (Enespa & SK.Dwivedi, 2014), al momento de atacar ocasiona “mal del talluelo”, lo cual consiste en la carencia de lignina en el tallo, haciendo susceptible la planta para el patógeno y así alcanzar rápidamente los vasos del xilema, causando la destrucción y el colapso del tejido en las plantas del cultivo de tomate de mesa (Agrios, 2005).

El tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*), es una de las hortalizas de mayor consumo, comercialización e industrialización a nivel mundial, su producción para el año 2015 fue de 170 millones de toneladas y Colombia tuvo un aporte de 646.904 toneladas (Horto, 2017).

Destacando los anteriores datos, se quiso buscar la manera de remover o inactivar el efecto dañino del *F. oxysporum* presente en el tomate, además de buscar la reducción de pesticidas como Panzer, Glifosato, Manzate, Furadan, matel paration entre otras, que a pesar de estar restringido su uso, se continúan circulando en el país ocasionando graves efectos a la salud de los seres vivos (Varona et al., 2009).

En consecuencia, por esta actividad, la secretaria de salud de Antioquia, ha informado que el contacto con estas sustancias pone en peligro la vida de plantas, animales y personas que deben ser atendidas en un tiempo menor de 24 horas; además de resaltar que las intoxicaciones se dan de manera paulatina y éstas desencadenan graves enfermedades genéticas y degenerativas, principalmente por estar en ciertas proporciones en los alimentos (Morales, 2016).

Tal como lo demostró la investigación de (García, Rodríguez, Restrepo, & Sánchez, 2017), donde se recolectaron muestras de tomate en depósitos de granos y la mayoría presentaron trazas de 4,4'-DDT, endosulfán y metoxicloro, plaguicidas que a pesar de estar restringidos y/o prohibidos en Colombia se continúan aplicando.

Por tal motivo, se estructuró el trabajo de investigación estableciendo como objetivo general, evaluar la efectividad del limoncillo *Cymbopogon citratus* contra el *Fusarium oxysporum* presente en el tomate *Lycopersicon esculentum*. Por medio de tres objetivos específicos que consistieron en: caracterizar la composición química del aceite esencial obtenido del limoncillo *Cymbopogon citratus*, cultivar cepas puras del hongo *Fusarium oxysporum* aisladas en el tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*), por último, analizar las pruebas de inhibición del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* contra el *Fusarium oxysporum* presente el tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Con base en los resultados obtenidos durante la investigación, se pudo evaluar la actividad fungici que tienen los compuestos inmersos en el *Cymbopogon citratus* contra el *Fusarium oxysporum*, contribuyendo a la posibilidad de obtener una nueva estrategia agrícola para atacar este patógeno y así aportar en el desarrollo de una agricultura sostenible, no solo durante la cosecha sino también en la pos-cosecha.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron las hojas de limoncillo (*Cymbopogon citratus*), en el barrio La Gaitana del municipio de Neiva (Huila), el material vegetal fue cortado para luego ser introducido en un recipiente de poliestireno expandido y preservarse a 25 °C (Granados, Yáñez, & Santafé, 2012).

2.2. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

En una báscula calibrada se pesaron 200 g de material vegetal que posteriormente se lavaron con agua y seguida de esta limpieza el material se trozó con unas tijeras de tal manera que puedan ingresar en el orificio del balón.

2.3. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

La obtención se llevó a cabo por medio del método de hidrodestilación por arrastre de vapor, donde se emplearon los siguientes materiales: un balón con capacidad de 2000

mL, un condensador, una trampa Clevenger, una motobomba, unas pinzas de agarre, una plancha, el material vegetal procesado y 800 mL de agua destilada.

En el balón se introdujeron los 200 g del material vegetal procesado y los 800 mL de agua destilada, de esta manera se unieron las demás piezas formando el recipiente Dean-Stark (Figura 1) y así se inició el proceso de hidrodestilación por arrastre de vapor, durante 3 horas.

La obtención del aceite esencial se observó en la trampa de Clevenger por densidad y su extracción se realizó por medio de una pipeta. Luego el AE extraído fue conservado en un tubo de ensayo previamente esterilizado, como se ilustra en la Figura 2. Finalmente se adicionó 5 mg de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) por cada mililitro de aceite esencial, almacenándolo a una temperatura de 10 °C.



Figura 1 Equipo Dean-Stark



Figura 2 Aceite extraído de *Cymbopogon citratus*

2.3.1. CALCULAR EL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL

Para determinar el rendimiento del aceite esencial se aplicó la siguiente fórmula:

$$R = \frac{V}{M} * 100 = \%$$

Donde R: rendimiento %, V: volumen del aceite esencial en mL y M: masa del material vegetal (g), de acuerdo a esta operación matemática se realizó el cálculo del rendimiento del AE del *C. citratus* (Pino, Sánchez, Rojas, Abreu, & Correa, 2012).

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE DE *C. CITRATUS*

Extraído el aceite esencial del limoncillo, se procedió a alistar una muestra de 1 mL, en un tubo de ensayo sellado con cinta dentro de una cava de poliestireno expandido,

agregándole dos bolsas de gel térmico para preservar la muestra durante el recorrido al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales-CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander en la ciudad de Bucaramanga.

De este modo se logró determinar la composición química, en este laboratorio se empleó la metodología de Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), (corriente iónica total reconstruida, normalización simple, identificación presuntiva en columna APOLAR, DB-5MS (60 m); (EI, 70eV) usando las bases de datos de Adams, Wiley y NITS, de las muestras que posteriormente se analizaron por GM-MS operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) (Universidad Industrial de Santander, 2018).

2.5. COLECTA Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se seleccionó una planta de tomate de mesa del municipio de Campoalegre (Huila), la cual presentaba síntomas de pudrición en sus hojas, tallo y fruto. Como se observa en la Figura 3, su aparente estado fitosanitario no era el mejor, además, la planta no tenía ningún tipo de aplicación de productos sintéticos.



3A



3B



3C



3D

Figura 3 Planta de tomate con aparente estado de afectación

3A. Tallo afectado, **3B.** Planta marchitada, **3C.** Fruto afectado, **3D.** Hojas afectadas

Fuente: Autores

El material recolectado se guardó en bolsas de plástico debidamente selladas para ser ingresadas al Laboratorio de Química de la Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA del bloque B, donde se lavaron con agua potable y se ingresaron en tres recipientes de plástico, se rotularon y se aseguraron para que las estructuras no se dañaran.

La técnica utilizada se denomina cámara húmeda, la cual sirvió para estimular el crecimiento del hongo presente en los signos de afectación (hojas, tallo o fruto) por un período de 24 horas, según la metodología del laboratorio del grupo de investigación establecido por Castro & Figueroa (2015).

2.6. PREPARACIÓN DEL PDA

El medio de cultivo se preparó con agua destilada esterilizada y de acuerdo con las recomendaciones establecidas por el fabricante, 39 g de PDA OXOID equivalen a 1 L de agar. El proceso se efectuó en 20 cajas de Petri. De acuerdo con la regla de tres, se empleó 15.6 g de agar con 400 mL de agua, para llenar la totalidad de las cajas requeridas.

Se calentaron los 400 mL de agua en un erlenmeyer, por medio de la plancha hasta alcanzar los 60 °C que registró el termómetro. Luego se logró agregar los 15.6 g del medio de cultivo PDA OXOID. Después se añadió por medio de una jeringa, seis gotas de antibiótico Amoxicilina con el propósito de evitar el crecimiento de bacterias o microorganismos indeseados. El procedimiento se describe en la Figura 4.

Finalmente, se añadió el medio de cultivo a las 20 cajas de Petri, ingresándolas a la autoclave hasta alcanzar los 120 °C y 15 libras de presión durante 25 minutos. Dejándolas enfriar durante 30 minutos para facilitar su manipulación.



4A



4B



4C



4D



4A



4B



4C



4D

Figura 4 Preparación del medio de cultivo

4A. Toma de temperatura, **4B.** Medio de cultivo agregado, **4C.** Agitación, **4D.** Medio de cultivo listo

Fuente: autores.

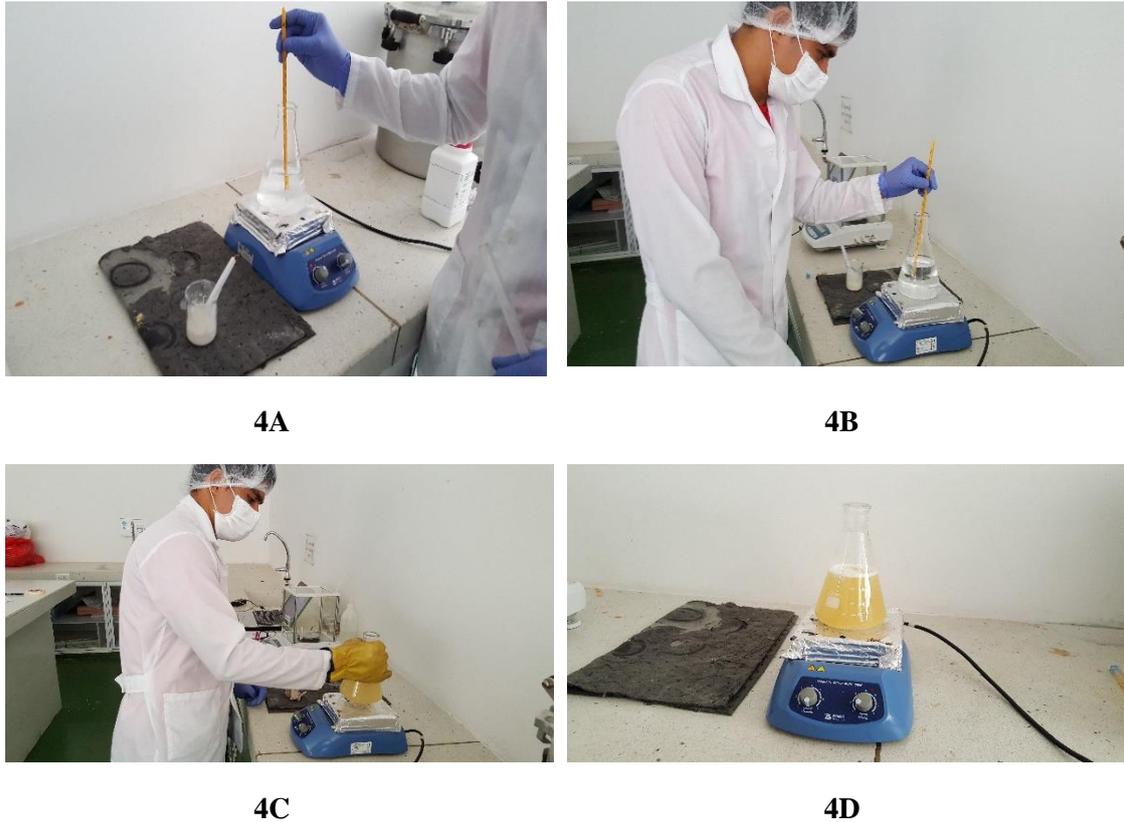


Figura 5 Preparación del medio de cultivo

4A. Toma de temperatura, **4B.** Medio de cultivo agregado, **4C.** Agitación, **4D.** Medio de cultivo listo

Fuente: autores.

2.7. CULTIVO DEL HONGO *FUSARIUM OXYSPORUM*

Se realizó el cultivo de los hongos fitopatógenos presente en la planta de tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*) del municipio de Campoalegre, de una manera aséptica en la cámara de flujo laminar del Laboratorio de Investigación en Química situado en la Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA. La cámara se limpió con hipoclorito al 5 %, utilizando elementos de protección como guantes de nitrilo, tapabocas, gorro quirúrgico y bata.

Con las concentraciones adecuadas de nutrientes se lleva a cabo el cultivo, implementando cortes redondos de 5 mm de diámetro aproximadamente, desinfectado cada uno con hipoclorito de sodio al 3 % por dos minutos y enjuagado con agua por un minuto, de acuerdo a la metodología del protocolo de laboratorio establecido por Castro & Figueroa (2015).

Posteriormente, la muestra previamente cortada, se puso en contacto con el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA OXOID) en el centro de una caja de Petri, éstas cajas se sellaron con papel película y se etiquetaron para ser incubadas a 26 °C y 90 % de

humedad relativa de acuerdo con la metodología de Pérez, Sánchez, Rojas, Abreu, & Correa (2011).

2.8. ASILAMIENTO DEL PATÓGENO

La purificación de los organismos fúngicos presentes en la planta de tomate seleccionada, se realizó después de ocho días de crecimiento micelial en el Laboratorio de Investigación en Química de la Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA, con los hongos se realizaron transferencias continuas a nuevas cajas de Petri con medio de cultivo, hasta obtener una colonia pura.

2.9. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL *F. OXYSPORUM*

Las características correspondientes al microorganismo aislado, se determinaron mediante comparaciones visuales y microscópicas de las principales características morfológicas (pigmentación del cultivo, tamaño, forma y número de septos de micro y macroconidias) revisando el atlas de micología de Saldarriaga (2010), con el objetivo de tener el género identificado y luego identificar la especie que se aisló.

Por consiguiente, fue necesario revisar las claves taxonómicas de Booth (1977), Singh (1991), López (2003) y Leslie & Summerell (2006), hasta tener la mayor certeza de la especie. Como se realizó en la investigación de Lezcano, Martínez, & Alonso (2012) con este género.

Por otro lado, se aplicó la tasa de crecimiento micelial (cm/día); se evaluó por medio del logaritmo matemático descrito en la metodología de Meed, Hudson, & Hinton (1993).

$$TC = \frac{(Cf - Ci)}{(Tf - Ti)}$$

Donde, TC: tasa de crecimiento, Cf, crecimiento final, Ci, crecimiento inicial, Tf, tiempo final y Ti, tiempo inicial.

La metodología propuesta por Castaño (1998) se implementó para la medición y caracterización de las micro y macroconidias, realizando montajes en láminas portaobjetos con dos gotas de lactofenol al 0,05 % y aceite de inmersión, observando en el microscopio previamente calibrado y compuesto de luz, con el objetivo 40X las dimensiones de las estructuras fúngicas.

2.10. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un diseño irrestrictamente al azar (D.I.A.) con arreglo factorial, en este caso, dos factores. El factor A, corresponde al tratamiento con Silvacur aplicado con la mayor concentración y dos de testigo absoluto. El factor B, hace relación a tres concentraciones evaluadas de 1000, 1500 y 2000 ppm. La unidad experimental consistió en una caja de Petri con cinco repeticiones para un total de 19 muestras incubadas.

2.11. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL *C. CITRATUS*

La a prueba de actividad inhibitoria del aceite esencial de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) se llevó a cabo contra el *Fusarium oxysporum* presente en el tomate (*Lycopersicon esculentum*) previamente identificado por medio de algunas claves taxonómicas y el atlas de micología de Saldarriaga.

Se inició la evaluación con la preparación de los dos factores, adicionándole en cada caja de Petri, tres gotas de tenso activo, con el objetivo de lograr homogeneidad en la disolución. Como se observa en la Figura 5.

Adicionados los valores correspondientes de cada concentración del aceite esencial en la superficie sembrada del hongo aislado disuelto con el medio de cultivo y el tenso activo. Se llevaron a incubación con una temperatura de 30 °C durante siete días. Como se muestra en la Figura 6. Los tratamientos no tuvieron intervalos de luz y manipulaciones externas considerables, simplemente cuando fueron tomadas las medidas.



5A



5B



5C



5D

Figura 6 Proceso de inhibición

5A. Concentración calibrada de 1000 ppm, 5B. Adición del medio de cultivo a los 1000 ppm, 5C. Los tratamientos esterilizados, 5D. Siembra con tratamientos

Fuente: autores.



Figura 7 Tratamientos de esterilización de las muestras en la incubadora

Finalmente, la actividad fungicida del aceite esencial se evaluó midiendo el crecimiento radial en los días 3, 5 y 7 en cada caja de Petri con el hongo aislado. Aplicando la siguiente ecuación matemática que define el porcentaje de índice antifúngico de la investigación realizada por Guo *et al.* (2008).

$$I. A. \% = \left(1 - \frac{D_a}{D_b} * 100 \right)$$

Donde, I.A, índice antifúngico, D_a corresponde al crecimiento de cada tratamiento y D_b al crecimiento del testigo absoluto.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del porcentaje de rendimiento del AE de *C. citratus*, obtenidos durante el proceso de extracción fueron de 0,5 %, indicando según el estudio de Joulain (1996) una posible explotación comercial, debido a que el porcentaje es superior a 0,1 % que es el valor mínimo de rendimiento.

Las variaciones en el porcentaje de rendimiento de Saleem, Afza, Anwar, Hai, & Ali (2003) quienes obtuvieron 0,58 %, principalmente se debe a la toma hojas frescas, siendo esta investigación resaltada, ya que se trabajó con tres especies del género *citrus*, las cuales tuvieron distintos rendimientos: 0.58 % (*C. citratus*), 0.35 % (*C. paradisi*), 0.2 8% (*C. reticulata*) y 0.21 % (*C. aurantifolia*).

Otro resultado comparativo fue el de Linares, Gonzalez, Usubillaga, & Darghan (2005) quienes mostraron un rendimiento de 0,82 %, dato similar al obtenido por Cuéllar & Yunus (2009), realizado en Uganda con el *Cymbopogon citratus*, obteniendo un rendimiento del 0.64 % de aceite esencial ambos en hojas frescas.

De igual manera se compararon los resultados de la investigación realizada por Ríos (2010), el cual tuvo un rendimiento de 1,06 % de AE del limoncillo; además del trabajo investigativo de Mendoza & Tabora (2010), los cuales obtuvieron un 1,22 % de rendimiento de aceite esencial de *C. citratus*.

Según estos resultados similares en la mayoría de los trabajos investigativos, se concuerda con lo dicho por Weiss (1997); Maiti, Raju, Geetha & Mandal (2006)

quienes informaron que el contenido de aceite de un corte normal debería promediar entre 0.25 y 0.50 %, pero con un buen manejo y cepas seleccionadas se podrían producir hasta 0.66 a 0.90 %.

Con respecto al análisis de la composición química del AE *Cymbopogon citratus* realizado por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, resultados expuestos en la Figura 7 del perfil cromatográfico, se logró identificar dieciocho componentes que representan el 99.9 % de los componentes presentes en el aceite esencial. Los constituyentes del AE se presentan en la tabla 1, los componentes se enumeran en un tiempo de retención por minutos.

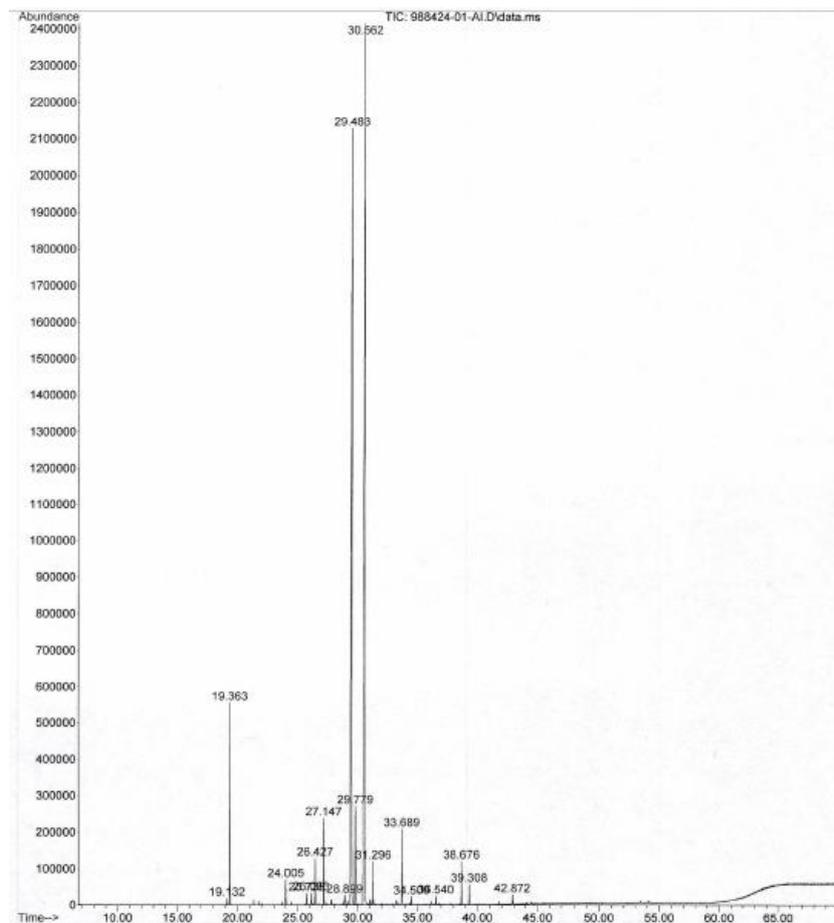


Figura 7 perfil cromatográfico de AE *Cymbopogon citratus*

Los componentes mayoritarios identificados fueron los monoterpenos genarinal 48,2 % y neral con 34,9 %. Siendo estos datos similares con los reportes de la literatura científica de Saleem *et al.* (2003) en el que obtuvieron en citral *a* 40,8 % y citral *b* 32 % los constituyentes más comunes en las especies analizadas del género *Citrus* (*aurantifolia*, *paradise* y *reticulate*).

En relación con la anterior información, también se tuvo en cuenta las similitudes del estudio científico realizado por Linares *et al.* (2005) quienes obtuvieron en la identificación por cromatografía y espectros de masas del AE de *C. citratus*, los monoterpenos de genarinal 43,16 % y neral 34,35 %, en su aplicación para la fertilización de tierras agrícolas. De igual modo se tomó en cuenta la descripción de los compuestos químicos presentes en el AE de *C. citratus* realizado por Negrelle &

Carnerio (2006), en el cual los constituyentes del aceite esencial fueron el citral (aldehídos geranial con 40,2 % + neral 32,3 %) y terpenos (myrcene -monoterpene y geranial, terpenic alcohol).

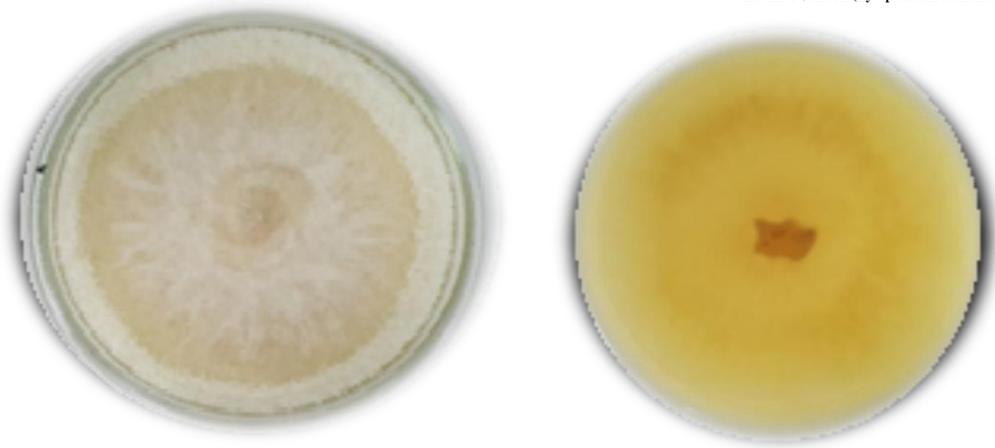
Tabla 1Resultado de la composición química del *Cymbopogon citratus*

t _R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa %
19,13	Metil heptano	0,1
19,36	β-mirceno	4,5
24,01	Compuesto NI	0,6
25,74	Compuesto NI	0,3
26,09	Compuesto NI	0,3
26,43	<i>Cis</i> -Isotral	1,0
27,15	<i>trans</i> -Isocitral	1,9
28,90	Compuesto NI	0,3
29,48	Neral	34,9
29,78	Genariol	2,8
30,56	Genarial	48,2
31,30	Undecanona	1,0
33,69	Eugenol	2,0
34,51	Acetato de genarilo	0,2
36,54	<i>Trans</i> -β-Cariofileno	0,2
38,64	Tridecanona	1,0
39,31	Acetate de eugenol	0,4
42,87	Compuesto NI	0,2

Los compuestos con mayor porcentaje son conocidos en el mercado por su capacidad de inhibir ante patógenos por su fuerte aroma a limón, cuya mezcla es conocida como citral, la cual se compone de dos estereoisómeros, el citral *a* (*trans*) o geranial y el citral *b* (*cis*) o neral (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2013).

En lo referente al patógeno *Fusarium oxysporum*, hallado inicialmente por medio de observaciones macroscópicas del aislamiento, se obtuvo un crecimiento algodonoso, inicialmente con tonalidad blanca que al pasar los días se tornaba más crema en la zona con mayor esporulación (Figura 8).

Las características microscópicas del patógeno aislado (Figura 9), por medio de las comparaciones microscópicas de su morfología (pigmentación, tamaño, forma y número de septos de micro y macroconidias), los resultados que en primera instancia se resaltaron fueron los del crecimiento acelerado de 3 cm cada tres días, las microconidias cilíndricas, en su mayoría con curvas que poseen un tamaño oscilado en 6,2 x 2,1 μm y de 2 a 3 septos, por tal motivo se pudo establecer que la especie con mayor similitud es el *F. oxysporum*.



8A

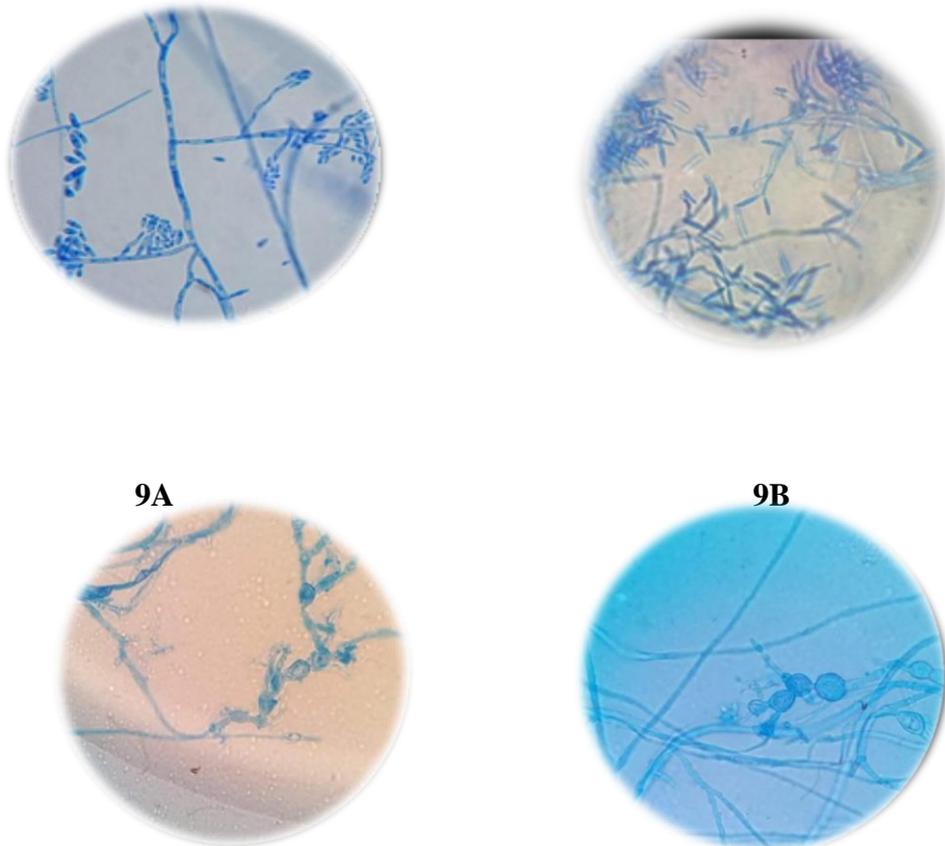
8B

Figura 8 Cepa de hongo aislado

8A. Hongo en el anverso, **8B.** Hongo en el reverso

Fuente: autores.

Estos resultados coinciden con Vásquez & Castaño (2017), quienes responsabilizaban las anomalías físicas de marchitez, manchas, añublos foliares, pudrición de la raíz tallo y fruto en la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*) eran inducidos por el *Fusarium oxysporum*. Cabe destacar que esta especie no solamente se encuentra presente en la planta de tomate, también se tienen datos de su incidencia en la leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala*, como lo resalta la investigación de Lezcano *et al.* (2012) en Perú.



9A

9B

9C

9D

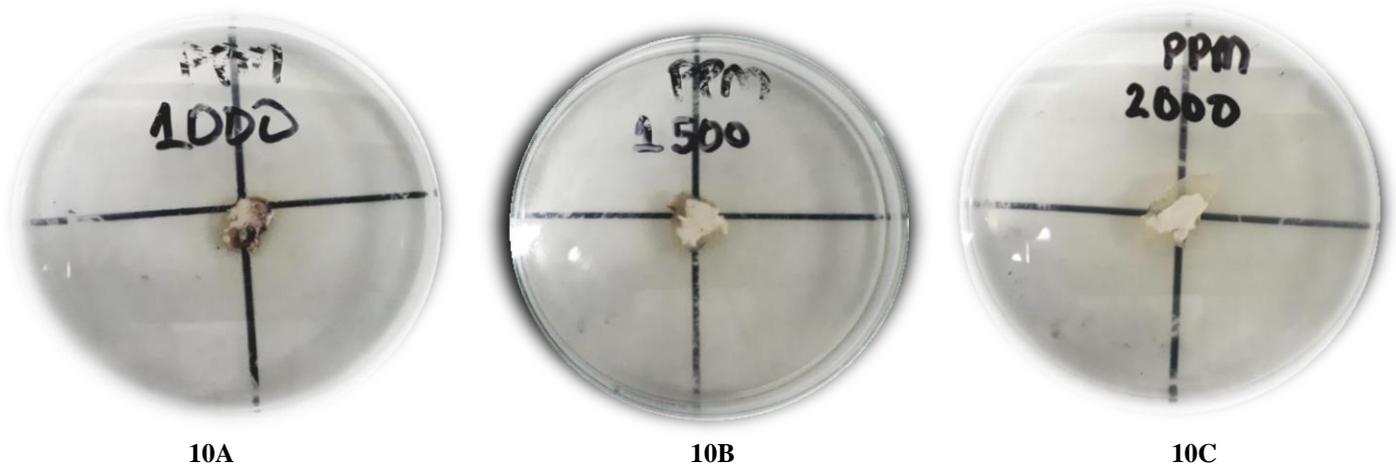
Figura 9 Vista microscópica del *F. oxysporum*

9A. Vista de microconidias cilíndricas a 10x, **9B.** Vista microscópica de macroconidias con septos a 100x, **9C.** Vista de clamidosporas globosas a 40x, **9D.** Vista de clamidosporas globosas intercalares a 100x.

Fuente: autores

Otra hortaliza afectada por la presencia del *F. oxysporum*, es la arveja *pisum sativum*, la cual tiene una investigación realizada por Osorio & Castaño (2011), bajo el título de “Caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*pisum sativum linneo*), enfermedad endémica en el municipio de Manizales Caldas (Colombia)”, cuyo estudio pudo demostrar bajo algunas claves taxonómicas la presencia de este patógeno con rasgos físicos similares, como marchitez, manchas, añublos foliares y aparente pudrición en su fruto, hojas y tallo.

Los resultados de inhibición obtenidos mediante la aplicación de la fórmula matemática fueron del 100 % (Tabla 2), es decir, el aceite esencial de *C. citratus*, presenta una buena efectividad inhibitoria en las tres concentraciones (1000, 1500 y 2000 ppm), ya que no se produjo ningún crecimiento micelial durante los 7 días de incubación. Como se ilustra en la Figura 10.

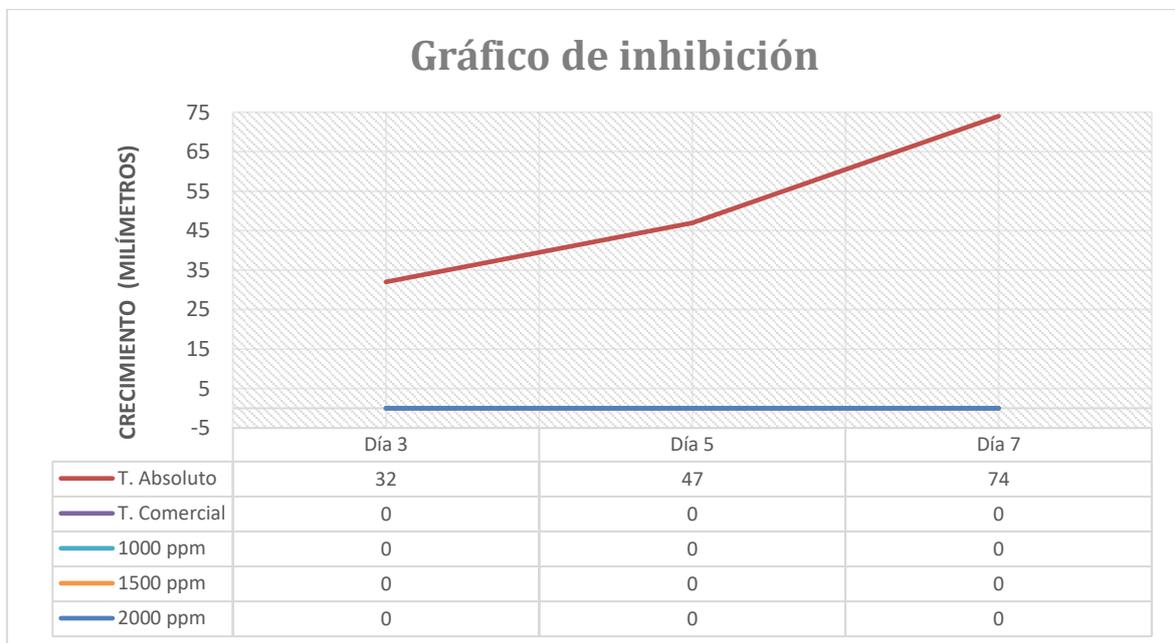
**Figura 10** Tratamientos de AE *Cymbopogon citratus* en el día 7

10A. A los 7 días con 1000 ppm, **10B.** A los 7 días con 1500 ppm, **10C.** A los 7 días con 2000 ppm.
Fuente: autores.

En la gráfica 1 se observa de manera sintetizada los resultados obtenidos, sirviendo para corroborar la efectividad inhibitoria del *C. citratus*, como se había plasmado en el artículo publicado por Velluti, Marín, Gonzalez, Ramos, & Sanchis (2004), en el cual el AE del *C. citratus*, tuvo un porcentaje de reducción de los diámetros de las colonias procedentes de tres especies de *Fusarium*, con un aproximado de 45–60 % en concentración de 0.995 aw y 75–95 % con 0.95 aw, cuando la concentración se incrementó de 0 a 1000 mg/1 mL para todas las especies de estudio.

Tabla 2
 Resultado del crecimiento del crecimiento micelial

Evaluación del crecimiento micelial (mm) de <i>Fusarium oxysporum</i> en pruebas antifúngicas con el aceite esencial del limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>)										
Tratamiento	Concentración	N°	6/10/2018	8/10/2018	8/10/2018	Promedio Total	Índice antifúngico %			
			Día 3	Día 5	Día 7		DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	TOTAL %
			Ø mm	Ømm	Ø mm					
PDA	Testigo absoluto	1	32	47	62	0	100%	100%	100%	100%
		2	32	47	62					
SILVACUR	Testigo comercial	1	5	5	5	0	100%	100%	100%	100%
		2	5	5	5					
Limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>)	1000 ppm	1	0	0	0	0	100%	100%	100%	100%
		2	0	0	0					
		3	0	0	0					
		4	0	0	0					
		5	0	0	0					
	1500 ppm	1	0	0	0	0	100%	100%	100%	100%
		2	0	0	0					
		3	0	0	0					
		4	0	0	0					
		5	0	0	0					
	2000 ppm	1	0	0	0	0	100%	100%	100%	100%
		2	0	0	0					
		3	0	0	0					
		4	0	0	0					
		5	0	0	0					



Gráfica 1 Crecimiento micelial (mm) según los días de incubación

Es preciso señalar que no solo funciona contra el género *Fusarium*, también en otros patógenos como el *Colletotrichum gloeosporioides*, así lo demostró la investigación realizada por Souza, Pereira, & Ronie (2009) la cual tuvo un porcentaje de inhibición contra este patógeno del 100 %, empleando los aceites esenciales de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Psidium guayava* va y *Cymbopogon citratus*,

estos AE no permitieron la germinación de las esporas del hongo en un periodo de siete días.

Por otra parte, se tuvo en cuenta la investigación de Pawar & Thaker (2007), en el que emplearon 75 aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas para combatir el *Fusarium oxysporum sp cicer* y *Alternaria porri*, siendo el limoncillo la especie que mayor inhibición tuvo contra el *F. oxysporum*, con 77 mm; sin embargo, no fue tan efectivo contra la *A. porri* tan solo inhibió en 13.4 mm; siendo solamente destacado por contener el mayor grado de inhibición contra el *F. oxysporum*.

La alta efectividad fungicida en el AE de *C. citratus* coincide con los resultados de Pérez, Chamorro, Vitola, & Hernández (2017), quienes aplicaron AE de *C. citratus* contra el *Colletotrichum gloeosporioides* presente en el ñame, en concentraciones de 5000, 8000 y 10000 ppm, las cuales tuvieron un porcentaje de inhibición contra el patógeno del 97.77 %.

Los resultados obtenidos, confirman lo dicho por otros autores como Paranagama, Abeysekera, Abeywickrama, & Nugaliyadde (2003), sobre el citral *a* y *b*, principales compuestos de la planta presente en la investigación, siendo estos, componentes fungicidas que hacen especial al *C. citratus*, sirviendo para una posible aplicación en inferiores concentraciones a las que se tuvieron en cuenta en esta investigación (1000, 1500 y 2000).

Finalmente, se puede argumentar que esta investigación abre una línea base para continuar en la incursión de nuevas alternativas amigables con el medio ambiente, promoviendo la sostenibilidad y ayudando a evitar la intoxicación por plaguicidas de síntesis química, ya que éstos productos se expanden cada vez más en el mercado y son difíciles de competir, por no encontrar sustitutos con la misma efectividad. Cabe destacar, que la investigación indica que es viable continuar evaluando el uso del *Cymbopogon Citratus* en estas concentraciones e incluso menores a las aplicadas para atacar el *fusarium oxysporum* y demás patógenos causantes del deterioro en los cultivos colombianos.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los directivos de la corporación universitaria del Huila-CORHUILA por el apoyo brindado para lograr el desarrollo del proyecto, además se resaltan algunos funcionarios que contribuyeron en este proceso experimental para validar la información y así obtener los resultados esperados. Los compañeros de semillero quienes estuvieron retroalimentado la información que se recolectaba, algunos docentes externos que estuvieron en algunas asesorías y la Universidad Industrial de Santander quien realizó la cromatografía y espectros de masas.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press. New York, USA: 5 ed. Academic Press.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.09.106>
- Bernal, H. Y., García, H., & Quevedo, G. F. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso*

- sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Ed.). Bogotá. Recuperado de: <http://www.humboldt.org.co/es/component/k2/item/393-pautas-para-el-conocimiento-conservacion-y-uso-sostenible-de-las-plantas-medicinales-nativas-en-colombia-estrategia-nacional-para-la-conservacion-de-plantas?highlight=ytoxontpoja7czo3oijwbgfudgfzjt9>
- Betts, T. J. (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography*, 936(2), 33–46. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11761004>
- Booth, C. (1977). *Fusarium oxysporum*. In: *Descriptions*. Kew, Inglaterra: Commonwealth Mycological Institute (CAB).
- Castro, H., & Figueroa, A. (2015). *Protocolo para el cultivo de fitopatógenos in vitro*. Neiva, Colombia: Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA.
- Castaño, J. (1998). *Prácticas de laboratorio de fitopatología*. Caldas, Colombia: Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal.
- COLCIENCIAS. (2016). Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo | COLCIENCIAS. Retrieved October 17, 2018, from http://www.colciencias.gov.co/sala_de_prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo.
- Cuéllar, A., & Yunus, R. (2009). Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in mbarara district (Uganda). *Colombiana de Ciencia Animal*, 1(2), 240–249. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01046>
- Enespa, & SK.Dwivedi. (2014). Effectiveness of some Antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting brinjal and tomato plants. *Plant Pathology*, 8(18), 18–25.
- García, A., Rodríguez, C., Restrepo, E., & Sánchez, A. (2017). Residuos de plaguicidas en tomate (*solanum lycopersicum*) comercializado en Armenia, Colombia. *Facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 2(2), 68–79.
- Granados, C., Yáñez, X., & Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 10, 12–23.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., & Li, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 694–697. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2007.06.027>
- Horto. (2017). Superficie mundial de tomate. Octubre 17, 2018. Recuperado de: <http://www.hortoinfo.es/index.php/3775-superf-mundo-tomate-101014>
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2013). *Citral*. Recuperado de: http://intranet.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/LEP%20_VALORES%20LIMITE/Doc_Toxicologica/Capitulos%2072_82/Ficheros/DLEP%2073.%20citral.pdf
- Joulain, D. (1996). Investigating new essential oils: rationale, results and limitations. *Perfumer and flavorist*, 21, 1–10. Recuperado de: <http://plateforme-documentaire.ctifl.fr/Record.htm?idlist=1&record=19400381124912285639>
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The fusarium laboratory manual*. Blackwell Pub. Recuperado de: <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- Lezcano, J., Martínez, B., & Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Peru almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2), 187–196.
- Linares, S., Gonzalez, N., Usubillaga, A., & Darghan, E. (2005). Efecto de la fertilización, densidad de siembra y tiempo de corte sobre el rendimiento y calidad del aceite esencial extraído de *Cymbopogon citratus* Stapf. *Facultad Agronomía*, 22, 250–263.
- López, D. (2003). *Contribución al diagnóstico de las especies del género Fusarium Link. México DF, México*.
- Maiti, S., Raju, S., Geetha, K., Mandal, K. (2006). Good Agricultural Practices for Patchouli, Geranium and Lemongrass. *National Research Centre for Medicinal and Aromatic Plants, Boriavi, Anand-38, Gujarat, India*. pp. 16–17.
- Meed, G., Hudson, M., & Hinton, M. (1993). *Microbiological survey of fi ve poultry processing plants in the UK*. *Br Poult Sci*.
- Mendoza, L. D., & Taborda, M. (2010). Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari:

- Pyroglyphidae). *Biosalud*, 9(2), 21–31. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502010000200004
- Morales, P. (2016). Alertan por mal uso de plaguicidas en el campo en la ciudad. Febrero 5, 2019. Recuperado de: <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16611594>
- Negrelle, R., & Carneiro, E. (2006). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 9, 34–45.
- Osorio, L., & Castaño, J. (2011). Caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* LINNEO), Enfermedad endémica en el municipio de Manizales, 19(2), 33–43.
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007). Evaluation of the anti-Fusarium oxysporum f. sp. cicer and anti-Alternaria porri effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1099–1106. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9339-6>
- Paranagama, P., Abeysekera, K., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 86–90. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12803563>
- Pérez, A., Rojas, J., Chamorro, L., & Pérez, K. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica*, 60(2), 158–164. Recuperado de: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/27838/28109
- Pérez, A., Chamorro, L., Vitola, D., & Hernández, J. (2017). Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 465. Recuperado de: <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.23647>
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M., Abreu, Y., & Correa, T. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Protección vegetal*, 172–181.
- Ramyabharathi, S., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and β -1,3- glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal of Today's Biological Sciences*, 1(1), 51–60.
- Ríos, E. (2010). Evaluación del aceite y estudio de conservación en frío del *Cymbopogon citratus* cultivado en la región del Quindío. *Investigación Universidad Del Quindío*, 20(3), 24–28.
- Saleem, M., Afza, N., Anwar, M., Hai, S., & Ali, M. (2003). A Comparative Study of Essential Oils of *Cymbopogon Citratus* and Some Members of the Genus. *Natural Product Research*, 17(5), 369–373. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/14786410310001605823>
- Saldarriaga, L. (2010). Micología. Febrero 22, 2019. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/24276689/Atlas-micologia>
- Singh, K. (1991). *An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins*. Dinamarca: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries: Department of Bio-technology the Technical University of Denmark.
- Souza, J., Pereira, N., & Ronie, E. (2009). *Gloeosporioides*, aislado do maracujazeiro amarelo Material e Métodos Isolamento do patógeno. *Biotemas*, 22(3), 77–83.
- Vásquez, L., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363–374. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n2/v20n2a14.pdf>
- Varona, M., Henao, G., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., Álvarez, V. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*, 29(3), 456. Recuperado de: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i3.16>
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2004). Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*, 21(6), 649–656. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.009>
- Weiss, E.A. (1997). *Essential Oil Crops*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 86–103.