

ANÁLISIS IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO Y TOMILLO EN HONGOS FITOPATÓGENOS DEL ARROZ (*Oryza sativa L.*)

ANALYSIS IN VITRO OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OREGAN OILS AND THYME IN FITOPATHOGEN FUNGUS OF RICE (*Oryza sativa L.*)

María Alejandra Caballero Carrera¹ & Hans Thielin Castro Salazar²

1. Ingeniera Ambiental, Corporación Universitaria del Huila-CORHUILA, Grupo de Aplicación e Investigación Ambiental-GAIA. macaballero@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: Agosto 15 de 2017 Aceptado: Enero 20 de 2018

RESUMEN

El Arroz es uno de los productos agrícolas con mayor demanda en el país, debido a que constituye la base de la alimentación colombiana y, por lo tanto, su producción y necesidad de consumo aumenta de manera proporcional a la población. El rendimiento del cultivo se ve afectado por enfermedades fúngicas. En este trabajo de investigación se analizó el efecto fungicida que tienen los aceites esenciales (AE) de orégano y tomillo en concentraciones de 500 y 1000ppm, obtenidos por hidrodestilación en un equipo Clevenger, sobre cepas del hongo fitopatógeno *Fusarium spp.* encontrados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*). Las pruebas se dividieron en tres grupos experimentales, el primero fue con los AE, el segundo fue el control y el tercer o último grupo fue el testigo comercial; estos tres usando como medio de cultivo el PDA e incubando a 26°C y 90%HR durante siete días después de su inoculación; la variable de control fue el crecimiento radial (mm) de la colonia. Los AE evaluados mostraron una inhibición del crecimiento micelial por encima del 90%. Por este motivo, se demuestra que los AE se pueden convertir en una opción viable para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

Palabras clave: Plaguicidas botánicos, cultivo de arroz, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The rice is one of agricultural products with greater demand in the country, because it is the basis of the Colombian diet and, therefore, its production and consumption need increases proportionally to the population. The yield of the crop is affected by fungal diseases. In this research work the fungicidal effect of the essential oils (AE) of oregano and thyme in concentrations of 500 and 1000ppm, obtained by hydrodistillation in a Clevenger equipment, on strains of the phytopathogenic fungus *Fusarium spp.* found in the cultivation of rice (*Oryza sativa L.*). The tests were divided into three experimental groups, the first was with the AE, the second was the control and the third or last group was the commercial witness; these three using the PDA as a culture medium and incubating at 26°C and 90%HR for seven days after inoculation; the control variable was the radial growth (mm) of the colony. The AE evaluated showed an inhibition of mycelial growth above 90%. For this reason, it is demonstrated that AE can become a viable option for the control of diseases caused by phytopathogenic fungi.

Key words: Botanical pesticides, rice cultivation, phytopathogenic fungi.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es considerado el cultivo más importante del mundo, además de ser un producto básico como el maíz, posee la mayor extensión de tierra cultivada y el mayor número de personas dedicadas a su producción. Casi el 50% de la población mundial, depende del arroz como parte importante de su dieta, el consumo per cápita mundial para 2011, estuvo entre los 65 kilogramos. La producción de arroz en Colombia, genera alrededor de 500 mil empleos directos e indirectos, en más de 215 municipios, los cuales dependen en un 90% de ésta actividad (Chica L., Tirado O., & Barreto O., 2016).

El Huila, ha sido pionero en el sector arrocerero con la cifra histórica de 570.802 hectáreas sembradas en el 2016 y un rendimiento promedio de 7,5 toneladas por hectárea (DIARIO DEL HUILA, 2017). seguido de Tolima con 7,2 toneladas/hectárea y Valle del Cauca con 7,1 toneladas/hectárea.

La siembra mecanizada del cultivo permitió el crecimiento de la producción nacional en un 14 por ciento (%) durante el segundo semestre de 2016, es decir, 178.155 hectáreas, frente al mismo periodo de 2015 siendo el departamento del Huila el aportante del 44,3 por ciento (%) con 6.063 hectáreas más con relación al mismo periodo del 2015 (FINAGRO, 2017).

La incidencia y extensión de este cultivo permite el desarrollo de microorganismos fúngicos; los cuales afectan significativamente la producción de éste cereal; los hongos fitopatógenos más comunes en éste pueden ser *Curvularia sp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium spp*, *Cercospora Oryzae*, *Gerlachia Oryzae*, *Gaeumannomyces graminis (Sacc.)* y *Pyricularia grisea (Sacc.)*, este último provocando grandes pérdidas en las cosechas a nivel mundial (Tejera, Heydrich, & Rojas, 2012).

Por ende, su control se torna una necesidad para sostener la producción; una de las vías más utilizadas es el uso de plaguicidas sintéticos causando problemas de salud pública y ambiental; debido a que, durante su aplicación en la planta, el 40 % del plaguicida termina en el aire, agua y suelo.

Fusarium spp. es un hongo filamentoso aislado de plantas y suelo (Tangarife C., 2016). Éste agente patógeno causa una de las enfermedades comunes de las raíces, puede causar una gran cantidad de síntomas, desde manchas foliares hasta marchites y pudrición de la copa, el bulbo y hasta de la raíz; las esporas de *Fusarium spp.* se mueven fácilmente y pueden ser arrastrados de una planta a otra. *Fusarium spp.* puede causar una gran variedad de síntomas. Se pueden formar lesiones hundidas de color negro o marrón en la base de los tallos; pueden haber manchas rojizas cercanos a la copa de la planta y, a veces, masas de micelios algo rosadas o blancas que crecen en la base de los esquejes o en la copa de una planta (Buechel, 2018).

Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Los agares PDA y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio,

mientras que el agar CLA, permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios (Tapia & Amaro, 2014).

En consecuencia, tanto los arroceros como los investigadores han implementado alternativas sostenibles para evitar los efectos negativos y manejar las plagas de este cultivo de una manera sostenible, mediante los plaguicidas botánicos los cuales son adquiridos de plantas aromáticas para controlar naturalmente las plagas fúngicas que se presenten, contribuyendo al cuidado de los suelos, aire, calidad del agua y organismos vivos.

Finalmente, las investigaciones acerca del control con bioplaguicidas están iniciando a nivel regional y están siendo poco referenciados en la literatura, por ende, ofrece la posibilidad de adentrarse en este tema, debido a que, las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos generan pérdidas económicas en la producción de los cultivos, no solo en el departamento del Huila sino del país en general. El objetivo de la investigación fue analizar la actividad antifúngica *in vitro* de los Aceites Esenciales (AE) de orégano y tomillo sobre *Fusarium spp* como una alternativa para el impulso de la agricultura sostenible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue de tipo experimental. La unidad de muestreo fueron las colonias de *Fusarium spp* con repeticiones por quintuplicado para cada grupo experimental.

2.1. Recolección del material vegetal:

Las plantas de Orégano (*Origanum vulgare*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), fueron recolectadas en el municipio de Neiva – Huila con coordenadas 2°55'55.54"N 75°15'53.46"W.

2.2 Extracción del aceite esencial:

Los aceites esenciales se obtuvieron por arrastre con vapor de agua implementando un equipo Clevenger, para este proceso se adicionaron 700 mL de agua destilada en todos los casos y una cantidad determinada del material vegetal (Tabla 1) en un balón redondo de fondo plano de una capacidad de 2000 mL, consecutivamente, se sometieron a temperatura constante de 80°C durante 60 min; una vez alcanzado el punto de ebullición el vapor de agua es condensado en una trampa Dean Stark y por diferencia de densidad queda separada la fase acuosa y oleosa. Posteriormente, se retiró el aceite y por cada mililitro se adicionaron 5 mg de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) para evitar la oxidación y finalmente se conservó a 4 °C.

Tabla 1. Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE)*

Material Vegetal	Peso Material Vegetal -W _{MV} (g)	Cantidad AE extraído (mL _{AE})	%RAE = (mL _{AE} /W _{MV}) *100
Orégano	285	0.4	0.1
Tomillo	215	0.6	0.3

*%RAE: Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial. Fuente: Autores.

2.3. Composición química de los aceites esenciales:

La composición química volátil (cantidad relativa, % e identificación presuntiva) de los aceites esenciales de orégano y tomillo, fue analizada por El Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales – CENIVAM (Universidad Industrial de Santander), empleando cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*). Los rendimientos de extracción obtenidos de los aceites esenciales de hojas de orégano y tomillo fueron 0.3 y 0.5, respectivamente.

2.4. Identificación y cultivo *in vitro*:

Se aisló el hongo *Fusarium spp.* de plantas de arroz que presentaron síntomas de enfermedad ubicadas en el Corregimiento de Guacirco del Municipio de Neiva – Huila con coordenadas 3°06'03.19"N 75°16'20.85"W, se realizó el aislamiento de forma directa y se sembró en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), se incubaron a 26 °C durante siete días en ausencia de luz. Para la identificación de estructuras fungosas se utilizó las claves taxonómicas de la morfología del micelio y sus estructuras fructificantes, somáticas y reproductivas tomada de Tangarife C. Verónica (2016).

Pasados los siete días de crecimiento de la colonia pura, se efectuaron los respectivos repiques en cajas Petri que contenían PDA más los Tratamientos (AE) con concentraciones de 500 y 1000 ppm. El proceso se realizó por quintuplicado para cada una de las concentraciones; adicionalmente se tuvo un grupo como testigo absoluto o grupo control (sin tratamiento) y uno como testigo comercial (Silvacur®). Para el análisis del crecimiento del hongo fitopatógeno se midió el diámetro de crecimiento (mm) de la colonia a los dos, cinco y siete días después de la inoculación en el medio de cultivo con los tratamientos.

2.5. Variantes de estudio

VARIABLES EMPLEADAS PARA VALIDAR LOS RESULTADOS:

- **Porcentaje (%) de Inhibición del crecimiento:** se estableció por medio de la medición del diámetro del crecimiento de la colonia a los dos, cinco y siete días, para cada uno de las pruebas mediante la ecuación (1) propuesta por Sztejnberg *et al.* (1987) y tomada de Alzate *et al.* (2009).

$$(Ec. 1) \text{ Porcentaje \% de Inhibición del crecimiento} =$$

$$[1 - \{ \text{crecimiento en el tratamiento (mm)} / \text{crecimiento en el testigo (mm)} \}] \times 100$$

- **Actividad fungicida:** se ejecutó teniendo en cuenta los valores del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento; para este procedimiento se tomó el inóculo en el que se inhibió aproximadamente por completo el crecimiento micelial (>90%), se llevó a cajas petri con medio de cultivo PDA sin tratamiento y se incubó durante 7 días más con el fin de analizar si en las concentraciones manejadas los tratamientos presentan efecto fungicida (cuando provoca la

muerte del fitopatógeno) o fungistático (cuando frena el crecimiento micelial del fitopatógeno).

3. RESULTADOS

3.1. Composición química de los aceites esenciales:

La identificación presuntiva de los compuestos registrados en los AE, se realizó con base en sus espectros de masas (EI, 70eV); usando las bases de datos Adams, Wiley y NIST. En la tabla 2 y 3, aparece la identificación presuntiva y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en ellos y analizados por GC-MS operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*) con sus respectivos cromatogramas, en la Gráfica 1 se visualiza el perfil cromatográfico del aceite esencial de orégano y en la Gráfica 2 el perfil cromatográfico del AE de tomillo.

Tabla 2. Identificación presuntiva y cantidad relativa (%) de los componentes presentes el aceite esencial de orégano.

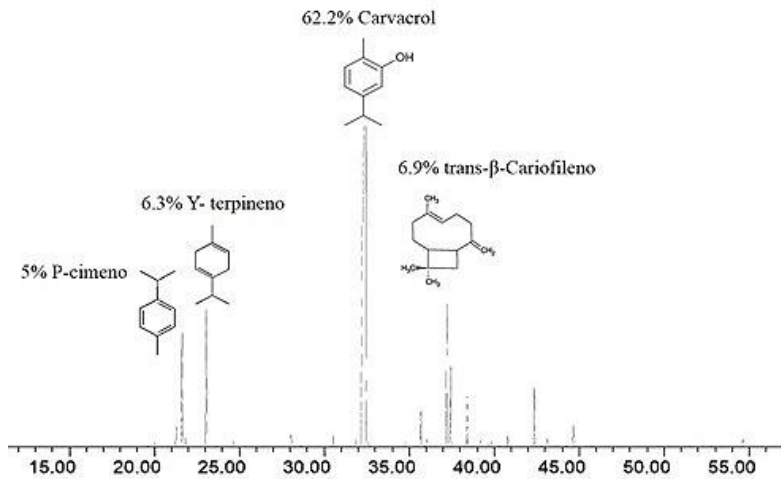
tr, min	Compuesto Identificado
21.64	<i>p</i> -Cimeno
23.06	γ -Terpineno
32.42	Carvacrol
38.68	<i>trans</i> -Cinnamato de metilo
37.22	<i>trans</i> - β -Cariofileno
37.44	<i>trans</i> - α -Bergamoteno
38.41	α -Humuleno
42.36	Óxido de Cariofileno
---	Otros

Fuente: Autores con base en resultados del CENIVAM –UIS.

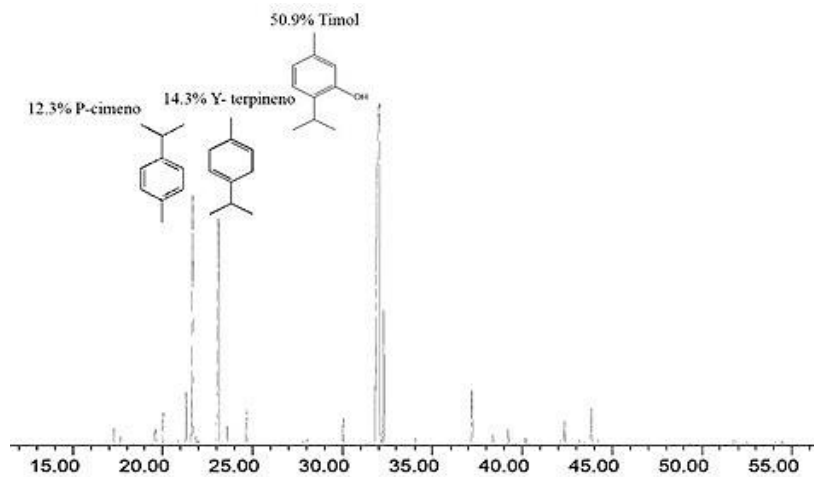
Tabla 3. Identificación presuntiva y cantidad relativa (%) de los componentes presentes el aceite esencial de tomillo.

tr, min	Compuesto Identificado
21.31	α -Terpineno
21.68	<i>p</i> -Cimeno
23.11	γ -Terpineno
31.56	Timol
32.30	Carvacrol
37.20	<i>trans</i> - β -Cariofileno
---	Fracción correspondiente a hidrocarburos isoméricos en el rango de C ₆ – C ₂₅
---	Otros

Fuente: Autores con base en resultados del CENIVAM –UIS.



Gráfica 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de orégano por GC-MS en el modo *full scan*. **Fuente:** Autores con base en resultados del CENIVAM – UIS.



Gráfica 2. Perfil cromatográfico del aceite esencial de tomillo por GC-MS en el modo *full scan*. **Fuente:** Autores con base en resultados del CENIVAM – UIS.

3.2. Identificación y cultivo *in vitro*:

Pasados los siete días de crecimiento de la colonia pura, se realizó la observación y descripción macroscópica del hongo e identificación microscópica de las estructuras fungosas mediante las claves taxonómica tomadas por Tangarife C. Verónica (2016). La descripción macroscópica de la colonia se identifica por tener un color blanco-rosa, algodonoso (Figura 1). La identificación microscópica del *Fusarium spp.* está constituido por un conjunto de hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidias fusiformes y septadas (Figura 2).



Figura 1. Colonia de *Fusarium spp.*
Fuente: Autores.

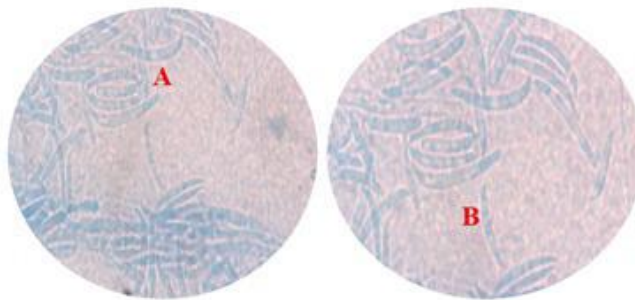


Figura 2. Estructuras fungosas *Fusarium spp.* 2A Hifas hialinas septadas - 2B Macroconidias fusiformes (Vista 100x).
Fuente: Autores.

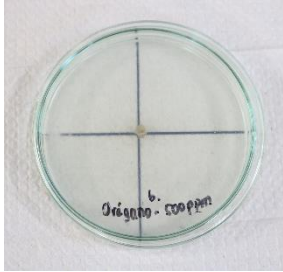


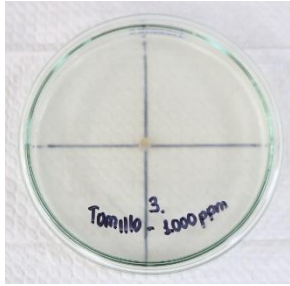
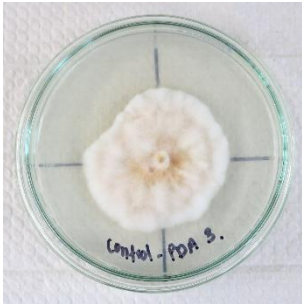

3.3. Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento:

En la Tabla 4 se muestra la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium spp.* en las dos concentraciones de cada tratamiento, T. absoluto y T. comercial al finalizar las mediciones (séptimo día).

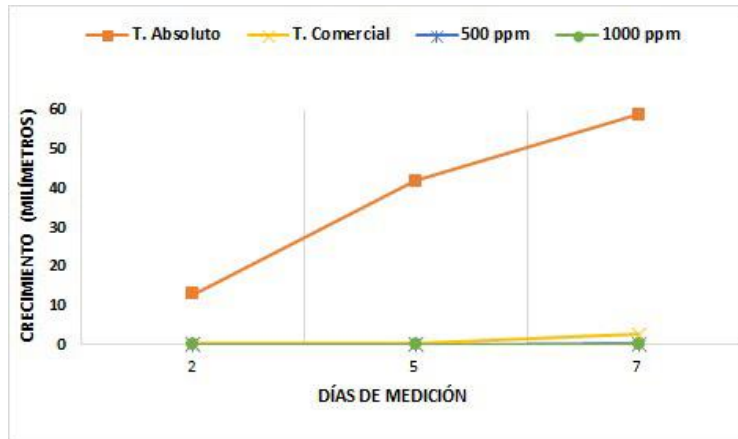
Se efectuaron mediciones de las pruebas por quintuplicado en sus diferentes concentraciones, 500 y 1000 ppm, a los dos, cinco y siete días para determinar el crecimiento de la colonia; en cada una de las mediciones se encontró un promedio para establecer la comparación con el testigo absoluto y el testigo comercial Silvacur®. Seguidamente, se muestran las gráficas de crecimiento de *Fusarium spp.* para cada uno de los tratamientos usados frente al testigo absoluto y el testigo comercial.

En la Grafica 3, se observa el crecimiento micelial en el tratamiento con orégano en concentraciones de 500 y 1000 ppm y se contrasta con el testigo absoluto y el testigo comercial. La concentración 1000 ppm al finalizar las mediciones (séptimo día), mostró una diferencia en el crecimiento de 58.66 con el testigo absoluto y 2.66 mm con el testigo comercial, mientras que, para 500 ppm fue de 58.5 y 2.5 mm de diferencia frente al testigo absoluto y testigo comercial, respectivamente.

Tabla 4. Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium spp* en las dos concentraciones de cada tratamiento, T. absoluto y T. comercial al finalizar las mediciones (séptimo día).

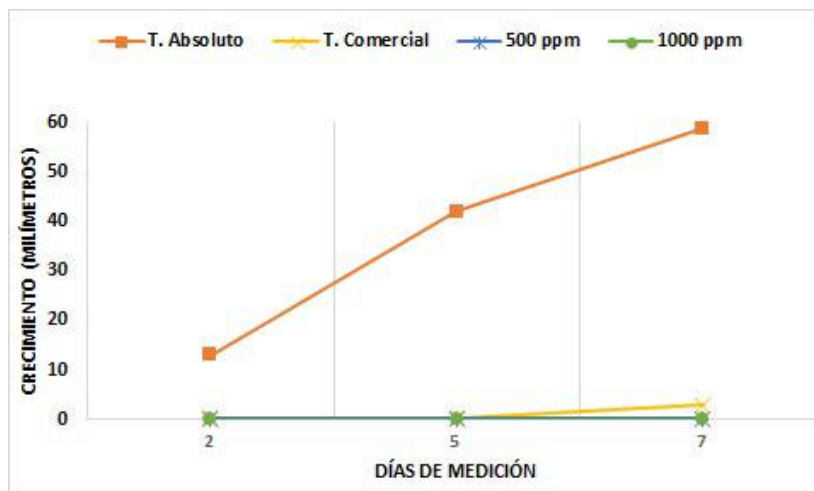
Tratamiento (AE)	Concentración (ppm)	
	500	1000
Orégano		
Tomillo		
T. Absoluto		
T. Comercial Silvacur®		

Fuente: Autores.



Gráfica 3. Comparación del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium spp.* con AE de orégano a diferentes concentraciones frente al testigo absoluto y testigo comercial.
Fuente: Autores.

El tratamiento con AE tomillo en concentraciones de 500 y 1000 ppm reveló una diferencia importante en el crecimiento con 58.66 y 2.66 mm; 58.78 y 2.78 mm frente al testigo absoluto y testigo comercial, respectivamente (Gráfica 4) al finalizar las mediciones.



Gráfica 4. Comparación del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium spp.* con AE de tomillo a diferentes concentraciones frente al testigo absoluto y testigo comercial.
Fuente: Autores.

De igual manera, se calculó el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento para el tratamiento AE Orégano en las concentraciones de 500 y 1000 ppm mediante la ecuación (1), hallando valores de 99.49, y 99.76% respectivamente, en comparación con el testigo comercial Silvacur® con un valor de 95.24%.

También, se calculó el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento para el tratamiento AE Tomillo en las concentraciones de 500 y 1000 ppm mediante la ecuación (1), hallando valores de 99.76, y 99.76% respectivamente, en comparación con el testigo comercial Silvacur® con un valor de 95.24%. Cuando el medio de cultivo fue combinado con AE orégano y tomillo a una concentración ≥ 500 ppm, se inhibió

completamente el crecimiento micelial del patógeno, entonces el inóculo de cada prueba en las concentraciones de 500 y 1000 ppm de los dos AE se trasladó a cajas petri con medio sin tratamiento y se incubó durante 7 días más, con el fin de evaluar el efecto fungicida o fungistático. Dado que al finalizar los siete días no se observó ningún cambio en el crecimiento, se deduce que los tratamientos en las concentraciones señaladas tienen actividad fungicida sobre *Fusarium spp.*

DISCUSIÓN

Mediante la identificación presuntiva de la fracción líquida volátil de los aceites esenciales de orégano y tomillo se obtuvieron como componentes mayoritarios terpenos: γ -terpineno 14.3%, timol 50.9% y fenoles: globulol 11% y carvacrol 62.6%, de acuerdo con Rovetto *et al.* (2010), estos componentes han mostrado efectos en la inhibición de hongos fitopatógenos; también, presenta propiedades antitusígenos, antisépticas y antibacterianas. Característicamente, el AE de orégano presenta un 62,6% de carvacrol el cual tiene capacidad anti-fungicida contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*, *Fusarium*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*; Arcila Lozano *et al.* (2004).

El AE de orégano presentó un porcentaje de inhibición del 99,49 % a 500 ppm y 99,76% a 1000 ppm, mientras que (Villa Martínez, y otros, 2014), obtuvieron el 50% de inhibición al utilizar una concentración igual de 2 mg/mL, el cual equivale a 2000 ppm. Por otra parte, la composición química volátil de los aceites esenciales por medio de GC-MS, permitió identificar la presencia de fenoles, éteres e hidrocarburos, los cuales presentan propiedades antisépticas, antimicrobianas, antifúngicas, irritantes, entre otras. Los plaguicidas botánicos por ser procedentes de materiales naturales (plantas), habitualmente presentan poco o ningún riesgo para el ser humano o el ambiente; además, otras investigaciones han justificado que son eficaces en el control de enfermedades agrícolas, sin causar daños graves o aumentar la contaminación del medio ambiente.

Finalmente, se observó que *Fusarium spp.* presentó una inhibición mayor en los aceites esenciales de orégano y tomillo con mejores resultados en la concentración de 1000 ppm con un 99,76% en ambos AE; también, el fungicida sintético Silvacur® presenta una menor inhibición con un 95,24% en estas pruebas.

REFERENCIAS

- Alzate, O., A., D., Mier, M., L., G., Afanador, K., Lucía, . . . M., C. (2009). EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD Y LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Colletotrichum acutatum* DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*), LIMONCILLO (*Cymbopogon citratus*), Y SUS COMPONENTES MAYORITARIOS. *Vitae*, 116-125.
- Arcila Lozano, C., Loarca Piña, G., Lecona Uribe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ResearchGate*.
- Buechel, T. (5 de octubre de 2018). *PRO-MIX*. Obtenido de Perfil de las enfermedades radiculares: *Fusarium*: <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/perfil-de-las-enfermedades-radiculares-fusarium/>

- Chica L., J., Tirado O., Y., & Barreto O., J. (2016). Indicadores de competitividad del cultivo del arroz en Colombia y Estados Unidos. *REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS*, 16-31.
- DIARIO DEL HUILA. (27 de Mayo de 2017). *FONDO LATINOAMERICANO PARA ARROZ DE RIEGO*. Obtenido de COLOMBIA- EN ARROZ, EL HUILA ES UN DEPARTAMENTO ESTABLE EN PRODUCCIÓN: FEDEARROZ: <http://flar.org/colombia-en-arroz-el-huila-es-un-departamento-estable-en-produccion-fedearroz/>
- FINAGRO. (2017). *Fondo para el financiamiento del sector agropecuario* . Obtenido de Huila en camino a potencia arroceras nacional : <https://www.finagro.com.co/noticias/huila-en-camino-potencia-arroceras-nacional>
- Google Earth. (2018). *Coordenadas de la recolección del material vegetal*.
- Rovetto , G., Moreno, N., Bolívar , V., Calvo, S., Suárez, G., Justiniano, C., . . . Caballero , O. (2010). APLICACIONES MEDICINALES DEL TOMILLO. *UCEBOL*, 16-20.
- Sztejnborg, A., Freeman, S., Chet, I., & Katan, J. (1987). Control of *Rosellinia necatrix* in Soil and in Apple Orchard by Solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 365-369.
- Tangarife C., V. (30 de Abril de 2016). *Escuela de Microbiología - Universidad de Antioquia*. Obtenido de *Fusarium spp.*: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100813>
- Tapia , C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena Infectol*, 85-86.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. M. (2012). Antagonismo de *Bacillus spp.* frente a hongos fitopatógenos del cultivo. *Protección Veg.*, 27(2), 117-122.
- Villa Martínez, A., Pérez Leal, R., Morales Morales, H. A., Basurto Sotelo, M., Soto Parra, J. M., & Martínez Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales . *Acta Agronómica*, 194-205.