

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**Efecto del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) sobre el
crecimiento de patógenos fúngicos de suelo**

Trabajo final de grado presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Luciano Rafael Casacchia Sassone

Tutora: María Cristina Sandoval

Lomas de Zamora, octubre de 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Generalidades de hongos de suelo.....	2
2.1.1. <i>Phytophthora capsici</i> Leonian.....	5
2.1.2. <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn.	14
2.1.3. <i>Fusarium solani</i>	23
2.2. La planta de tomillo.....	28
2.3. Aceites esenciales.....	31
2.4. Normativa acerca de la utilización de agroquímicos. Situación actual del Bromuro de metilo.....	35
2.5. Problema de investigación.....	38
2.6. Antecedentes acerca de la utilización de plantas y sus productos con efecto antifúngico.....	40
2.7. Objetivo.....	44
2.8. Hipótesis.....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1 Aceite esencial (AE) de tomillo.....	45
3.2 Hongos patógenos de suelo.....	45
3.3. Pruebas de inhibición.....	49
3.4. Análisis estadístico.....	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. Composición del aceite.....	50
4.2. Pruebas de inhibición.....	52
4.2.1. <i>Rhizoctonia solani</i>	52
4.2.2. <i>Phytophthora capsici</i>	56
4.2.3. <i>Fusarium solani</i>	59
4.3. Consideraciones finales.....	64
5. CONCLUSIONES.....	67

6. BIBLIOGRAFÍA.....	68
7. ANEXO	99
7.1. Cálculo de las concentraciones a evaluar.....	99
7.2. Mediciones.....	100
7.3. Análisis estadístico.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto de un ejemplar joven de tomillo. Foto: L. R. Casacchia.....	30
Figura 2. Aspecto del cultivo de <i>I. walleriana</i> donde desarrollaron ejemplares con síntomas de podredumbre a nivel de cuello y raíces. Foto: L. R. Casacchia.	46
Figura 3. Ejemplar de <i>I. walleriana</i> con síntomas de podredumbre en cuello y raíces. Foto: L. R. Casacchia.	47
Figura 4. <i>R. solani</i> en medio APG y detalle del micelio (40X). Foto: L. R. Casacchia.....	48
Figura 5. <i>F. solani</i> en medio APG y detalle de macro y microconidios (40X). Foto: L. R. Casacchia.....	49
Figura 6. <i>P. capsici</i> en medio de cultivo APG (40X). Foto: L. R. Casacchia.....	49
Figura 7. <i>R. solani</i> : crecimiento de la colonia testigo (izquierda) y crecimiento de la colonia en APG + 50 ppm de AE de tomillo (derecha).	52
Figura 8. <i>R. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo (izquierda). <i>R. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 150 ppm de AE de tomillo (derecha).	53
Figura 9. Ausencia de crecimiento de la colonia <i>R. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 200 ppm de AE de tomillo.....	54

Figura 10. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de <i>R. solani</i> en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.....	55
Figura 11. Crecimiento de las colonias de <i>R. solani</i> , expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.	55
Figura 12. Colonia de <i>P. capsici</i> el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 50 ppm de AE de tomillo.	56
Figura 13. Nulo crecimiento de la colonia de <i>P. capsici</i> el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo.....	57
Figura 14. Recrecimiento de la colonia de <i>P. capsici</i> observado el día 13 en medio de cultivo APG con una concentración de 50 ppm de AE de tomillo.....	57
Figura 15. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de <i>P. capsici</i> en medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de aceite esencial de tomillo.....	58
Figura 16. Crecimiento de las colonias de <i>P. capsici</i> , expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de aceite esencial de tomillo.	58
Figura 17. Desarrollo de la colonia de <i>F. solani</i> en medio APG (izquierda) y medio APG + 50 ppm del AE (derecha), observados el día 8 de la prueba.....	60
Figura 18. Colonia de <i>F. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG + 100 ppm de AE de tomillo.....	60
Figura 19. Colonia de <i>F. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG + 150 ppm de AE de tomillo.....	61

Figura 20. Colonia de <i>F. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG + 200 ppm de AE de tomillo.....	61
Figura 21. Colonia de <i>F. solani</i> el día 8 en medio de cultivo APG + 250 ppm de AE de tomillo.....	62
Figura 22. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de <i>F. solani</i> en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.....	62
Figura 23. Crecimiento de las colonias de <i>F. solani</i> , expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.	63
Figura 24. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de <i>F. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>R. solani</i> en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.	65
Figura 25. Crecimiento de las colonias de <i>F. solani</i> , expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.	65
Figura 26. Micropipeta. Laboratorio de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias. Foto: L. R. Casacchia.....	100
Figura 27. Aceite esencial (AE) de tomillo puro. Foto: L. R. Casacchia	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición porcentual del AE de tomillo utilizado en las pruebas de inhibición del crecimiento de patógenos fúngicos.	51
---	----

Tabla II. Crecimiento porcentual de la colonia de <i>R. solani</i> en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.....	54
Tabla III. Crecimiento porcentual de la colonia de <i>P. capsici</i> en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.....	57
Tabla IV: Crecimiento porcentual de la colonia de <i>P. capsici</i> en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.....	62
Tabla V. Medición diaria del micelio de cada hongo para 0 ppm de AE de tomillo.	101
Tabla VI. Medición diaria del micelio de cada hongo para 50 ppm de AE de tomillo.	102
Tabla VII. Medición diaria del micelio de cada hongo para 100 ppm de AE de tomillo.....	102
Tabla VIII. Medición diaria del micelio de cada hongo para 150 ppm de AE de tomillo.....	103
Tabla IX. Medición diaria del micelio de cada hongo para 200 ppm de AE de tomillo.....	103
Tabla X. Medición diaria del micelio de cada hongo para 250 ppm de AE de tomillo.....	104
Tabla XI. Medición diaria del micelio de cada hongo para 300 ppm de AE de tomillo.....	104
Tabla XII. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para <i>R. solani</i>	105
Tabla XIII. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para <i>F. solani</i>	106

Tabla XIV. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para <i>Phytophthora capsici</i>	106
---	-----

1. RESUMEN

Las plagas y enfermedades ocasionan grandes pérdidas en la producción agrícola tanto en sistemas extensivos como intensivos. Dentro del segundo grupo se destacan las ocasionadas por patógenos fúngicos habitantes del suelo, cuyo control se realiza principalmente por métodos químicos. En el caso particular de producciones intensivas, hasta hace relativamente poco tiempo la desinfección de suelo y sustratos se realizaba utilizando bromuro de metilo. Ante las regulaciones en contra de este biocida y en el marco de la búsqueda de estrategias de manejo sustentables, el presente trabajo plantea el uso del aceite esencial (AE) de *Thymus vulgaris* (tomillo) para el control de tres patógenos fúngicos de suelo. El objetivo, que hizo las veces de guía del trabajo, consistió en evaluar el efecto del aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento y desarrollo de *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*. Para lo cual se evaluaron, en condiciones *in vitro*, el efecto de distintas concentraciones del AE (50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm) sobre el crecimiento de las colonias de cada patógeno por separado. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento del micelio hasta el día 8, momento en que los testigos crecieron hasta ocupar toda la caja de Petri. Se observó efecto fungistático y fungicida en todos los casos pero a distintas concentraciones. Para *F. solani* la inhibición total se logró con 250 ppm de AE, para *R. solani* con 200 ppm de AE y para *P. capsici* con 100 ppm de AE. Estos resultados indican que el AE de tomillo podría ser una alternativa en el manejo de patógenos fúngicos de suelo. Se plantea, asimismo, la necesidad de

realizarnuevas investigaciones *in vivo* en orden de determinar la eficacia del AE en condiciones a campo.

Palabras clave: Tomillo, aceite esencial, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades de hongos de suelo

El suelo es un sistema complejo constituido por fracciones orgánicas e inorgánicas, agua y organismos vivos (Hawksworth, 1991). Dentro de los organismos vivos los hongos cumplen un rol importante en la descomposición de la materia orgánica, interactúan con bacterias, actinomicetos y pequeños invertebrados. Además, cumplen un rol importante en la cadena alimenticia, principalmente para la mesofauna del suelo (Bonkowski *et al.*, 2000). Por otro lado, en los sistemas agrícolas los fitopatógenos fúngicos de suelo pueden atacar a nivel de la rizósfera, infectar tallos y partes aéreas de la planta provocando pérdidas millonarias a nivel mundial (National Academy of Sciences, 1980).

Si bien los fitopatógenos incluyen virus, bacterias, nemátodos, fitoplasmas y viroides, los hongos constituyen el grupo de microorganismos que produce mayor número de enfermedades. Más de 8.000 especies fúngicas se comportan como fitopatógenos. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie fúngica y un mismo hongo, puede atacar a más de una especie vegetal (National Academy of Sciences, 1980).

Algunos hongos fitopatógenos son específicos y su distribución está restringida, sin embargo, otros tienen gran capacidad de adaptación y se comportan como cosmopolitas (Cook y Baker, 1983). Este hábito depende de la naturaleza parásita del hongo, pudiendo ser parásitos obligados, facultativos o saprófitos facultativos.

Según FAO (2012) las plagas y enfermedades causan importantes pérdidas en la producción agrícola, las que oscilan entre un 20 y 40% del total. En este contexto los fitopatógenos fúngicos habitantes del suelo y sustratos cumplen un rol de gran relevancia (Villa-Martínez *et al.*, 2015). En los suelos agrícolas es común la presencia de fitopatógenos de géneros como *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Phytophthora spp.*, *Colletotrichum spp.*, entre otros, agentes causales de patologías que generan grandes pérdidas económicas (Gohelet *et al.*, 2006). Estos microorganismos son habitantes naturales del suelo por lo que se encuentran ampliamente distribuidos. En ausencia de sus hospedantes algunos son capaces de formar estructuras de resistencia (esclerocios, clamidosporas) que favorecen la supervivencia y otros sobreviven transitoriamente como saprófitos (Monterroso, 2015).

Para manejar la carga de hongos patógenos que se encuentran en el suelo y/o sustratos el control químico es la alternativa más utilizada (Rubio *et al.*, 2008). Frente a esta situación el excesivo empleo de agroquímicos tiene repercusiones negativas en la salud humana (Whalen *et al.*, 2003), resulta contraproducente para los organismos benéficos y puede generar inconvenientes en la exportación de granos, frutas y verduras por la presencia de residuos (Ramírez-Legarreta y

Jacobo-Cuellar, 2002). Sumado a esto, el uso inapropiado induce resistencia de los patógenos a los principios activos de los fungicidas (Bajwa *et al.*, 2003).

En el caso particular de la desinfección de suelo y sustratos para cultivos intensivos históricamente se emplearon métodos físicos o químicos (Yuce *et al.*, 2011), sin embargo las nuevas medidas fitosanitarias y de buenas prácticas agrícolas obligan a que se produzcan cambios en el manejo del sistema productivo. En floricultura y horticultura, la obtención de cultivos sanos requiere de esta desinfección o al menos una reducción de la cantidad de inóculo. Hasta hace relativamente poco tiempo el bromuro de metilo era el principal producto que se utilizaba con este fin, no solo por su capacidad para eliminar fitopatógenos de suelo, sino por su cualidad de biocida (Karavina y Mandumbu, 2012). Debido a la dificultad en el manejo de las enfermedades producidas por patógenos de suelo muchos productores a nivel mundial han optado por otro tipo de producción como el cultivo sin suelo (Resh, 1992).

Actualmente los sistemas de cultivo exigen no solo elevada producción, sino también elevada calidad y sustentabilidad, por ello las alternativas para desinfectar suelo y sustratos deben ser estudiadas y practicadas en detalle. Frente a esta situación las alternativas naturales surgen como una posible solución al problema. Además de su capacidad antimicrobiana es destacable su carácter biodegradable, el bajo impacto negativo en el ambiente y la mínima toxicidad que puede producir en la salud humana (Bravo *et al.*, 2000). Sea cual fuere la estrategia de manejo, es importante que su aplicación sea sencilla, eficiente y de nula toxicidad en la salud (Naeiniet *al.*, 2010).

Con estos antecedentes, en la presente investigación se planteó el estudio de una alternativa de bajo impacto ambiental para el manejo de hongos de suelo patógenos de cultivos hortícolas y florícolas a través de la aplicación del aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris* L.).

2.1.1. *Phytophthora capsici* Leonian

Taxonomía (Encyclopedia of Life):

Reino: Chromista.

Filo: Oomycota.

Clase: Oomycetes.

Orden: Peronosporales.

Familia: Peronosporaceae.

Género: *Phytophthora*.

El nombre del género deriva del griego *phyto*: planta y *phthora*: destrucción (Erwin y Ribeiro, 1996).

El género tiene carácter acuófilo, las zoosporas no tienen pared celular, son uninucleadas, reniformes, móviles en medio líquido por 2 flagelos que parten del lado cóncavo de la espora (Palazón y Palazón, 1989). El flagelo anterior es más corto y el posterior más largo, esto permite el movimiento en líquidos por desplazamiento helicoidales y cambios de dirección continuos. Cuando las esporas chocan con una superficie o fuente de nutrientes se detienen y forman

una pared propia, constituyen así los quistes, estructuras que producen la infección (Erwin y Ribeiro, 1996).

P. capsici, es un patógeno de gran relevancia para distintas especies de las familias solanáceas y cucurbitáceas (Pavon y Babadoost, 2006). La enfermedad de mayor relevancia económica producida por el patógeno es la “tristeza del pimiento” (García Morato, 1996). Si bien puede dañar varias especies hortícolas como calabaza, pepino, sandía, melón, tomate y berenjena (Mendoza y Pinto, 1985) es de suma importancia en este cultivo (García Morato, 1996).

P. capsici fue descrita en 1922 por Leonian como causante principal del “marchitamiento” o “tristeza” del pimiento, en el sur de Estados Unidos. El patógeno fue citado luego en distintos países: en Italia en 1931, también produciendo podredumbre en pimiento (Tucker, 1931); en Estados Unidos en 1932, sobre tallos, hojas y frutos, siendo Weber (1932) quien lo aisló. También en 1932 fue descrito en Argentina causando pérdidas de un 80% de la cosecha (Lindquist, 1932). Posteriormente la enfermedad ha sido citada en Venezuela (Malaguti y Pontis, 1950) y Perú (Bazan, 1958).

El término “tristeza” alude a una sintomatología y no a un agente patógeno concreto (Palazón y Palazón, 1989). Los tejidos pierden turgencia y en consecuencia ocurre un marchitamiento total o parcial, disminuye la intensidad del color verde y hay menor desarrollo global del cultivo. Por consiguiente, la tristeza sea cual fuere la causa, está relacionada a un desequilibrio hídrico en la planta (Palazón y Palazón, 1989).

Estudios realizados por Palazón (1988) han permitido determinar a los patógenos *P. capsici*, *Verticillium dahliae* Kleb., a la salinidad y a la asfixia radicular como agentes responsables de la tristeza. También se asocia a un complejo de hongos que incluye a *Fusarium* y *R. solani* (Rico-Guerrero *et al.*, 2001; Guerrero-Aguilar *et al.*, 2001). La inoculación conjunta de los tres hongos o sólo con *Phytophthora* produce la muerte en diez días. Si sólo se inocula con *Fusarium* y *Rhizoctonia*, la planta tarda más de 30 días en morir (González *et al.*, 2002). Con *R. solani*, la lesión en el cuello no es compacta y la epidermis se desprende, mientras que con *P. capsici*, la pudrición es más bien dura y no se descascara (Mendoza y Pinto, 1985). De esto se desprende que *P. capsici* y *Fusarium* son los principales causantes de esta sintomatología, y *R. solani* se comporta como oportunista que se alimenta de los tejidos muertos. Una hipótesis es que *P. capsici* Leonian ingresa primero a la planta y facilita la entrada de los otros dos patógenos (González-Chavira *et al.*, 2002).

Cuando la enfermedad es causada por *P. capsici*, el ataque puede ocurrir en cualquier etapa fenológica, pero es crítica durante la fructificación (García Morato, 1996). La infección sobre el hospedante comienza con una hifa infectiva que se puede originar de un quiste que se formó a partir de la oospora, o puede surgir directamente de la oospora o de la germinación de un zoosporangio, el ingreso al hospedante es a través de los estomas principalmente y/o mediante la ruptura de la epidermis, proceso que se da por enzimas secretadas por el mismo patógeno (Hausbeck y Lamour, 2004). Bajo condiciones de temperatura óptima, desde el momento que penetra el patógeno hasta que se observan los primeros síntomas

pasan 2 a 3 días (Lamour *et al.*, 2012). La enfermedad ocurre en dos etapas, al principio en la etapa biotrófica no se observan síntomas y posteriormente en la etapa necrotrófica hay colapso y muerte de células. Esto determina que *P. capsici* sea considerado hemibiótrofo, por lo que muchos síntomas se observan en postcosecha (Lamour *et al.*, 2012). Al principio el decaimiento es leve, pero en 3 a 4 días ocurre una marchitez total. Lo típico es que el ataque comience en el cuello de las plantas (García Morato, 1996), se manifiesta una necrosis marcada (ChewMadinaveitia *et al.*, 2008) como una mancha parda y oscura típica en la base del hospedante que rodea el cuello de la planta e interrumpe la circulación de la savia. (García Morato, 1996). Si se hace un corte, se observa una coloración típica color café oscuro (ChewMadinaveitia *et al.*, 2008).

En otras ocasiones, las salpicaduras pueden transportar al hongo a ramas, hojas, frutos inferiores, iniciando la infección por estos órganos (García Morato, 1996). En este caso, las ramas y hojas presentan lesiones de color verde amarillento que evolucionan a color café, los frutos permanecen adheridos a la planta y manifiestan manchas acuosas de color verde cubiertas por el micelio del hongo y al abrirlo se detecta micelio sobre las semillas podridas (Velásquez y Medina, 2003). El patógeno también puede ingresar por el sistema radicular, en este caso cuando afecta las raíces principales la planta muere y no manifiesta la sintomatología típica (García Morato, 1996). *P. capsici* también es capaz de inducir una muerte prematura de la planta asociada a una obstrucción de los haces vasculares (González-Chavira *et al.*, 2002). La aparición de la enfermedad a campo suele ocurrir en áreas bajas, donde se acumula agua en el terreno, muchas

veces los productores atribuyen la disminución en el stand de plantas a la saturación hídrica del suelo, cuando en realidad es producto de las zoosporas que causan la infección y posterior muerte de plántulas (*damping off*) (González-Chavira *et al.*, 2002). Situaciones adversas para el cultivo como anegamiento del suelo e incremento de la salinidad aumentan la susceptibilidad y facilitan la aparición de la enfermedad (Palazón, 1988).

Malaguti y Pontis (1950) señalan como rango de temperaturas más favorables para el desarrollo de *P. capsici* las comprendidas entre 22 y 29 °C. Alfaro y Vegh (1971) concluyen que la temperatura óptima está entre 21 y 31 °C, además indican que a 5 °C el hongo detiene por completo su desarrollo y muere a los 0 °C. Los autores sostienen también que a temperaturas superiores a 38°C hay una paralización en el desarrollo, pero no la muerte del hongo. Schlub (1983) afirma que el mayor número de infecciones se obtiene a 23 °C, siendo muy reducidas a 15 y 31 °C. Por otro lado, García Morato (1996) sostiene que *P. capsici* tiene una temperatura base de desarrollo de 11 °C, una máxima de 35 °C y un rango óptimo de 25 a 28 °C además indica que la velocidad de crecimiento y desarrollo es mayor cuando la humedad es elevada. Bajo condiciones óptimas el patógeno se caracteriza por su gran velocidad de crecimiento y su abundante esporulación, lo que lo convierte en un Oomycete muy agresivo (García Morato, 1996).

En cuanto a formas holomórficas del género *Phytophthora* la supervivencia del micelio y zoosporangios es baja cuando el agua es escasa y la humedad ambiente baja (Schulb, 1983), todas las especies del género son pobres competidores del suelo pero muy agresivos cuando se produce la infección principalmente en

dicotiledóneas (Alexopoulos *et al.*, 1996). Sin embargo, *P. capsici* forma parte de las especies heterotálicas de *Phytophthora*, esto quiere decir que presenta 2 tipos conjugados, A1 y A2 (Savage *et al.*, 1968). Cuando las cepas son compatibles el anteridio fecunda al oogonio y se producen oosporas rodeadas de paredes gruesas con gran capacidad de supervivencia, esto permite que la conservación del hongo aumente notablemente (Martin *et al.*, 2012). Por ejemplo, utilizando cepas compatibles se ha conseguido una persistencia de oosporas en el suelo de 6 a 10 meses (Ramírez y Romero, 1980). En otros estudios se ha observado una supervivencia de 2 años (Ristaino, 2003). Todas las especies del género se ubican predominantemente en las capas superficiales del suelo, sin embargo, pueden ser aislados a cualquier profundidad en la que exista crecimiento de raíces (Weste, 1983).

P. capsici Leonian forma parte de los *Phytophthora* estrechamente relacionados con el grado de saturación hídrico del suelo, de modo tal que responde a la saturación formando zoosporangios (Duniway, 1983) ovoides a obpiriformes, caducos o persistentes (Erwin y Ribeiro, 1996). Estos surgen a partir de los zoosporangióforos (Blackwell, 1943) y contienen zoosporas que desarrollan, crecen y luego se expulsan por un poro apical para iniciar la infección (García Morato, 1996).

El método de diseminación principal es el agua de riego o escorrentía (Schlub, 1983) que transporta los zoosporangios que maduran y desprenden zoosporas (Erwin y Ribeiro, 1996). Se observa más la enfermedad cuando el riego es por surco que por goteo o aspersión, por ello el daño puede generalizarse después de

inundaciones (García Morato, 1996). Se han observado plantas marchitas en cultivos distribuidas en grupos o áreas localizadas donde las plantas estaban alineadas a lo largo del surco (Gaona, 2007). La diseminación también puede ser por semillas, sin embargo es menos frecuente porque los productores que sufren ataques en sus cultivos no utilizan semillas de su producción para implantar nuevamente el cultivo (Leonian, 1922).

Se han indicado referencias de ataques en parcelas regadas con aguas procedentes de zonas infectadas, mientras que parcelas vecinas, regadas con agua de pozo, no presentaban la enfermedad (Palazón y Palazón, 1989). Schlub (1983) señala como posible vía de diseminación la salpicadura de las gotas de agua al chocar con el suelo, que puede producir una dispersión horizontal de hasta 1 metro de radio. En Venezuela, Malaguti y Pontis (1950) indican que con lluvias intensas se generan frecuentes ataques sobre la parte aérea de la planta, pero con reducidas precipitaciones los ataques ocurren en la zona del cuello.

Por otro lado, los exudados radiculares producen la atracción de las zoosporas por quimiotaxis hacia el ápice de las raíces (Hickman, 1970). Otra teoría considera la presencia de quimiorreceptores en la superficie de las zoosporas que incluso orientan el tubo germinativo durante la germinación de las esporas (Carlile, 1966). Ansani y Matsuoka (1983) comprobaron que son necesarias 10.000 zoosporas por planta para causar su muerte y que incorporando al suelo 16.000 zoosporas por gramo de suelo seco se producía la muerte de todas las plantas de pimiento trasplantadas al mismo.

La intensidad de los daños es mayor a medida que aumenta el inóculo (García Morato, 1996), de modo que existe una relación cuantitativa directa entre la concentración del hongo en el suelo y la mortalidad de las plantas (Schlub, 1983), por eso el monocultivo aumenta los daños. El inóculo primario está constituido por micelio que desarrolla sobre restos vegetales y/u oosporas que presentan variabilidad genética y mayor resistencia (Hausbeck y Lamour, 2004).

Otros factores que influyen en la aparición de la enfermedad incluyen el exceso de nitrógeno y calcio, mientras que el potasio reduce la probabilidad de que se manifieste (Elenkov y Bakharieva, 1975). Además, el patógeno es afectado a pH ácidos (Muchovej *et al.*, 1980). En este caso parece ser decisiva la liberación de iones de aluminio cuando baja el pH (Palazón y Palazón, 1989).

En cuanto al manejo de la enfermedad, es posible prevenir, pero no curar. (García Morato, 1996). Los resultados obtenidos en prevención resultan bastante irregulares. Es importante que el tratamiento preventivo se realice antes de iniciada la infección, especialmente del sistema radicular, para que haya buena absorción del producto (García Morato, 1996).

Si las oosporas se forman sobre restos de cosecha, el hecho que sean esparcidos, enterrados o eliminados de algún modo, juega un papel importante en la disminución del inóculo primario (Hausbeck y Lamour, 2004). En el caso particular del pimiento la utilización de variedades con mejor comportamiento frente a la enfermedad, como las de fruto grueso también ayudan a disminuir la incidencia de la patología (García Morato, 1996).

El agua de riego resulta un factor clave para controlar la enfermedad, de ser posible, es recomendable suelos con buen drenaje, nivelar el terreno y formar surcos altos para que no haya exceso de agua. Es preferible que se realicen riegos por goteo o aspersión poco intensos y muy frecuentes (ChewMadinaveitia *et al.*, 2008). Si el riego es por surco, es importante que el agua no llegue al cuello de la planta ni pase de un surco a otro (García Morato, 1996).

No repetir cultivo de pimiento (García Morato, 1996). La rotación de cultivos es muy importante, pese a que se citan numerosos hospedantes, no hay evidencias concretas de que realmente el patógeno infecte otros cultivos. En parcelas con antecedentes de la enfermedad, podrán realizarse tratamientos preventivos fijando épocas de riesgo en función de la evolución de las condiciones climáticas y el estado de desarrollo de la planta (Mármol, 2010).

La desinfección previa del suelo puede realizarse a base de solarización aprovechando el calor natural o aplicando el método mixto de solarización más una pequeña dosis de fumigante (Mármol, 2010).

En cuanto al control biológico, microorganismos autóctonos que se comporten como antagonistas podrían ser una alternativa a los productos químicos (Ezziyani, 2004). Varios antifúngicos activos se han aislado y caracterizado (Aizawa *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; Remsing *et al.*, 2003), lo que apoya perspectivas prometedoras en el uso de por ejemplo bacterias del género *Streptomyces* en el biocontrol de hongos patógenos de plantas. Está demostrado que la confrontación de *S. rochei* variedad o raza Ziyani con el

patógeno *P. capsici* resulta en el control del desarrollo del hongo por antibiosis, micoparasitismo y lisis enzimática (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Por otro lado, especies de *Trichoderma* producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Ezziyyani *et al.*, 2004). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Chet e Ibar 1994; Belanger *et al.*, 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Sid Ahmed *et al.*, 2000) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.*, 1999).

El cuanto al control químico, este debe iniciarse en el tratamiento de las plántulas antes de trasplantar al lugar definitivo. El procedimiento consiste en sumergir las raíces unos minutos en una mezcla de los funguicidas captán y metalaxil (Chew Madinaveitia *et al.*, 2008). También pueden realizarse aplicaciones a través del riego por goteo al cuello de la planta (Mármol, 2010). Los mejores resultados se han obtenido con metalaxil y etridiazol en aplicaciones localizadas al cuello de la planta o previo a la plantación o en el sistema de goteo (García Morato, 1996). La utilización excesiva de metalaxyl provocó la aparición en algunos casos de resistencia del patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.1.2. *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Taxonomía (Encyclopedia of Life):

Reino: Fungi.

Filo: Basidiomycota.

Clase: Agaricomycetes.

Orden: Cantharellales.

Familia: Ceratobasidiaceae.

Género: *Rhizoctonia*.

La primera descripción de una enfermedad causada por *R. solani* fue realizada por Duhamel en 1728 (Duhamel, 1728). Sin embargo, el género *Rhizoctonia* fue definido por Lamarck y De Candolle en 1805 (Saksena y Vaartaja, 1961). Después de que Candolle estableciera el género se describieron numerosas especies de *Rhizoctonia* hasta que en 1858 se reportó por primera vez una descripción puntual de *R. solani* Kuhn causando enfermedad en papa (Kuhn, 1858).

Este hongo está distribuido en todo el mundo, se comporta como patógeno de diversos cultivos (Parmeteret *al.*, 1969), como saprófito bajo determinadas condiciones y algunas cepas conviven en simbiosis con orquídeas (Sneh *et al.*, 1996; Pope y Carter, 2001).

Si bien su morfología es sencilla, su fisiología y características como hongo presentan una complejidad que dificultan la determinación de su taxón. La delimitación taxonómica era aún más complicada porque es poco común que forme esporas sexuales, utilizadas en la determinación taxonómica de otras

especies (Parmeter *et al.*, 1969). Sin embargo, este problema se ha resuelto con la incorporación de caracteres que se obtienen con técnicas moleculares como hibridación de ADN, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y la secuenciación directa de genes, entre otros (González García, 2008).

La diferenciación en grupos se basa en la ocurrencia o ausencia de compatibilidad vegetativa entre los hongos (anastomosis). De este modo, quedan diferenciados grupos anastomóticos considerados entre ellos como poblaciones genéticamente distintas (Ogoshi, 1987; Parmeter *et al.*, 1969). El genotipo único que define cada grupo ha sido comprobado por métodos bioquímicos y moleculares (Snehet *et al.*, 1998), sin embargo, la evaluación de la anastomosis es la metodología de mayor confiabilidad para diferenciar las cepas (Castro *et al.*, 1983). Pese a que la clasificación en un grupo anastomótico u otro depende de la compatibilidad, es posible que especies que pertenecen a una cepa tengan la habilidad de fusionarse con otras cepas distintas (Ogoshi, 1987; Rovira *et al.*, 1986). Tomando como parámetro la anastomosis se ha dividido a *R. solani* en 14 Grupos Anastomóticos (AG), del 1 al 13 y el AG-BI. Además se diferenciaron subgrupos para definir y justificar la diversidad morfológica, capacidad patológica, requerimiento de tiamina y grado de anastomosis dentro de los “tipos” de hongos que se encasillan en el taxón *R. solani* (Ogoshi, 1987). Dentro de los grupos de anastomosis hay gran variedad de comportamientos, si bien la mayoría de las cepas son patógenas, el grupo AG3 no lo es, e inclusive se puede utilizar para control biológico de cepas que causan enfermedades, otros son patógenos débiles como el AG5 y otras

cepas forman asociaciones micorríticas en orquídeas, de este modo queda plasmada la complejidad que presenta la fisiología del hongo (Sneh *et al.*, 1998).

Las distintas cepas poseen células somáticas multinucleadas, desarrollan esclerocios indiferenciados, no forman esporas asexuales (conidios) y las estructuras sexuales rara vez aparecen e inclusive son difíciles de inducir experimentalmente (Ogoshi, 1987; Parmeter y Whitney, 1970). El anamorfo es *R. solani* y el teleomorfo ha sido designado como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk para la mayoría de los grupos anastomósicos del hongo (AG) (González-Hernández, 2002). Se clasifica como basidiomycete porque bajo determinadas condiciones el teleomorfo produce basidiosporas (Tovar Castaño, 2008). Los basidios tienen forma de barril, alojan cuatro esterigmas donde cada uno produce basidiosporas ovoides (Agrios, 2005). La fase perfecta (*Pellicularia filamentosa* o *T. cucumeris*) tiene el aspecto de un mildiu, desarrolla sobre el suelo, hojas y tallos infectados ubicados por encima de la superficie del suelo (Agrios, 2005). A simple vista las colonias del hongo comienzan siendo incoloras, algodonosas y pueden tornarse color crema o amarillento dependiendo del grupo anastomósico (AG). Luego, al madurar la colonia puede adquirir una coloración marrón (Ceresini, 1999). Las hifas tienen más de 5 μm (Tovar Castaño, 2008), son de color café, se estrechan a nivel de los septos y se ramifican muy próximos a estos (Parmeter y Whitney, 1970).

El hongo puede producir ramilletes de células cortas y anchas que funcionan como clamidosporas o pueden desarrollar esclerocios color café negro que consisten en

un conjunto de hifas entretejidas con una superficie dura y resistente (Domsch *et al.*, 1980).

R. solani es un hongo muy flexible en cuanto a comportamiento, tiene elevadas tasas de crecimiento, capacidad para formar estructuras de resistencia, capacidad para colonizar distintos sustratos, flexibilidad en su fisiología y tolerancia a cambios bruscos en el ambiente lo que la convierte en una especie fúngica con gran capacidad para sobrevivir a condiciones adversas (González, 1989). En la naturaleza la reproducción del hongo es del tipo asexual y se presenta como micelio vegetativo (Domsch *et al.*, 1980). La diseminación del hongo se realiza mediante la lluvia, el riego, por órganos infectados y por el movimiento de partículas de tierra. La temperatura óptima para la infección oscila entre 15 a 18 °C (Agrios, 2005). La diseminación es más efectiva cuando el suelo es húmedo y ácido. Frente a condiciones adversas tiene la capacidad de comportarse como saprófito y logra sobrevivir por la formación de esclerocios que a su vez se comportan como fuente de inóculo para iniciar la enfermedad (Prado *et al.*, 2001).

Las enfermedades producidas por *R. solani* son favorecidas por suelos pesados, compactados, con elevados niveles de materia orgánica, con problemas de drenaje, falta de estructura y temperaturas altas en primavera y verano (mayor a 25 °C). Los exudados producidos por el tejido vegetal y por la descomposición de la materia orgánica estimulan a los esclerocios del patógeno. Desde estas estructuras de resistencia se emite micelio que ataca la superficie externa del hospedante, luego mediante la secreción de enzimas extracelulares que degradan la celulosa, la cutina y la pectina comienza el proceso infectivo (Ceresini, 1999).

Después de este primer ataque el hongo forma apresorios que penetran las células del hospedante y absorben sus nutrientes para continuar su crecimiento y desarrollo (Ceresini, 1999). Producto de esto se produce la muerte celular y las hifas comienzan a colonizar el tejido muerto pudiendo formar más esclerocios. Posteriormente se produce el nuevo inóculo dentro o fuera del tejido hospedero y se repiten nuevos ciclos (Ceresini, 1999).

Una vez en el hospedante el hongo coloniza el tejido intra e intercelularmente. Ataca haces vasculares y como consecuencia rompe el abastecimiento de agua y nutrientes. Antiguamente se lo encontraba en áreas donde no se realizaba agricultura, pero luego avanzó sobre regiones cultivadas. Tiene gran relevancia en cultivos intensivos sobre los que puede provocar damping-off o caída de plántulas producto de un estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel del cuello de las plantas. Disminuye el vigor del cultivo y de la producción de tubérculos en el caso puntual de la papa (Cedeño *et al.*, 2001). En clavel induce una reducción del crecimiento y la presencia de tallos y brotes delgados que luego se vuelven cloróticos y la planta termina muriendo. En este caso, al hacer un corte del tallo se observa un micelio de coloración marrón en los haces vasculares (Tovar Castaño, 2008). También produce enfermedades en especies utilizadas para césped, ornamentales perennes, árboles y arbustos (Agrios, 2005).

Si bien la especie *R. solani* tiene un amplio rango de posibles hospedantes y diversidad en su comportamiento, cada cepa en particular es específica para cada hospedante (Carling *et al.*, 2002).

La sintomatología varía de acuerdo con el cultivo, inclusive dentro de un mismo cultivo puede variar con la fase fenológica en que se encuentre y las condiciones ambientales en que se desarrolla la infección (Agrios, 2005). Cuando se comporta como patógeno causa distintos síntomas incluyendo damping-off pre y post-emergente, quema foliar y podredumbre de raíces y coronas (Sneh *et al.*, 1998). En suelos fríos y húmedos se desencadenan procesos infectivos que culminan con la sintomatología más común de las cepas patógenos de *R. solani* que consiste en la manifestación de un ahogamiento de las plántulas provocando la muerte del hospedante antes o después de emerger del suelo o sustrato dependiendo del sistema productivo (Agrios, 2005).

En el caso de la muerte en preemergencia el patógeno invade el hospedante y necrosa el meristema apical induciendo una muerte prematura del vegetal. (Agrios, 2005). Si la planta emergió sin problemas, el hongo puede atacar el tallo y generar una consistencia acuosa del mismo con baja capacidad de sostén y blando al tacto, como consecuencia el hospedante se desploma y muere (Agrios, 2005). Cuando la plántula logra crecer y superar las adversidades de los primeros tiempos aún puede ser infectada, de ser así, el hongo invade tejidos corticales y provoca lesiones necróticas algo alargadas de pigmentación café rojizo. El tamaño aumenta hasta rodear por completo el tallo, adquiere una coloración oscura, se dobla, se retuerce y culmina en la muerte de la planta. Esta sintomatología típica de *R. solani* recibe el nombre de “tallo de alambre” (Agrios, 2005).

El mal del talluelo es otro síntoma que puede provocar la infección por *R. solani*. Consiste en una cancrrosis producida en el tallo de las plántulas en el campo o en

almácigo. Los canchros son profundos y de coloración café algo rojizo limitadas, o de un tamaño mayor que puede rodear el tallo por completo. A medida que avanza la estación de crecimiento la temperatura aumenta y también el crecimiento del cultivo lo que puede provocar una recuperación parcial del hospedante (Agrios, 2005).

Otro síntoma que puede producir el hongo es la formación de canchros oscuros y pudriciones en la base del tallo que crecen hasta invadir tejidos leñosos y médula, puede avanzar por el tallo y llegar a las hojas inferiores. El resultado es la muerte celular y aparición de tejidos necróticos oscuros putrefactos de aspecto seco. Ataca en simultáneo las raíces del hospedante (Agrios, 2005). Cuando la enfermedad se manifiesta durante el estadio adulto de la planta las lesiones rojizas se presentan al principio debajo de la superficie del suelo y se extienden en todas las direcciones aumentando el tamaño cuando la humedad es elevada y la temperatura baja cubriendo toda la base del hospedante y gran parte de las raíces. El producto es el debilitamiento, clorosis y en gran parte de los casos, muerte del hospedante (Agrios, 2005).

En el caso de plantas bajas como la lechuga y repollo, las hojas basales están en contacto con el suelo por lo que el ataque de *Rhizoctonia* se da fácilmente y los síntomas se observan a nivel de las nervaduras y pecíolos como lesiones rojizas y profundas. La hoja adquiere una coloración café oscura y consistencia de mucílago. Si la enfermedad avanza, la mayoría de las hojas terminan siendo invadidas y podridas, con presencia de micelio y esclerocios que se alojan entre las hojas (Agrios, 2005).

En pastos para césped, *Rhizoctonia* produce la enfermedad conocida como mancha café. En tejidos suculentos y carnosos como tubérculos, bulbos y cormos, las pudriciones son color café, pueden presentarse solo en la superficie o ingresar a las raíces y el tallo. Después de la infección y necrosis de los tejidos, comienza la descomposición, los órganos se secan progresivamente y alojan numerosos esclerocios y micelio. Frente a condiciones de elevada humedad el micelio adquiere un color crema, blanco o café que cubre las lesiones, el tejido se va pudriendo y también aloja esclerocios (Agrios, 2005).

El hongo causa también pudriciones en frutos, vainas, órganos que están cerca del suelo como pepinos, tomates, etc. Las condiciones ideales para que se manifieste la enfermedad son alta humedad y frío. Si bien es típica a nivel de campo, pueden observarse pudriciones durante el transporte y almacenamiento de los órganos cosechados e infectados por el hongo. Si bien la sintomatología es una pudrición de aspecto rojizo pardo y seca, con micelio y esclerocios como signos típicos, la herida causada por *Rhizoctonia* puede ser la entrada de bacterias que causan pudriciones blandas produciendo una consistencia pulposa (Agrios, 2005).

Para controlar la enfermedad es recomendable que la densidad de siembra o plantación sea tal que permita la circulación de aire entre plantas y en el suelo. En cultivos hortícolas y florícolas los sustratos deben ser esterilizados con cualquier método físico o químico, tienen que drenar bien y si es posible, las semillas tienen que sembrarse en zonas elevadas (Agrios, 2005).

En cuanto a control biológico especies del género *Trichoderma* funcionan como antagonistas de *R. solani* (Harman *et al.*, 2004). Además, los hongos *Gliocladium*, *Laetisaria*, algunas mixobacterias del suelo y nemátodos micófagos como *Aphelenchus avenae* tienen la capacidad de parasitar al hongo (Agrios, 2005).

También existen cepas de *R. solani* que actúan como controladores biológicos sobre otras cepas de *R. solani* a través del traspaso de ARN infeccioso de la cepa portadora (hipovirulenta) a la cepa patógena, lo cual induce una reducción en la capacidad para sobrevivir como también la muerte en algunos casos (Carling *et al.*, 2002).

El Pentacloronitrobenceno (PCNB) disminuye el ahogamiento de las plántulas en los almácigos. Como fungicidas de contacto se emplean iprodione y clorotalonil, como sistémicos carboxina, tradimefon y tiofanato de metilo (Agrios, 2005).

2.1.3. *Fusarium solani*

Taxonomía (Encyclopedia of Life):

Reino: Fungi.

Filo: Ascomycota.

Clase: Sordariomycetes.

Orden: Hypocreales.

Familia: Nectriaceae.

Género: *Fusarium*.

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetes filamentosos. Se caracterizan por presentar un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos (Sumalanet *al.*, 2013). Según el sistema taxonómico se reconocen entre 9 y 78 especies del género. En todos los casos la taxonomía se basa en características culturales de las colonias y las esporas del hongo. Snyder y Hansen, y Messian y Cassini reconocen nueve especies, Gordon considera 26 especies, Booth 44 especies, Wollenweber y Reinking 65 especies y Gerlach reconoce 78 (citado por Nelson *et al.*, 1990).

Si bien no es común encontrar las especies del género en su fase sexual se han observado los teleomorfos de *F. avenaceum* (*Gibberella avenaceae*), *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*) y *F. solani* (*Nectria haematococca*), por lo que estas especies tienen mayor posibilidad de variación genética (Booth, 1971).

Las especies del género *Fusarium* son de amplia distribución y tienen gran relevancia desde el punto de vista agrícola. Su ocurrencia es cosmopolita y las especies que lo componen son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Algunas especies causan infecciones oportunistas en el hombre y los animales y otras son capaces de sintetizar toxinas que afectan al hombre y los animales (Booth, 1971). También hay benéficas y útiles para el control biológico de determinados hongos y otras se emplean como micoherbidas por su capacidad para destruir malezas (Nelson *et al.*, 1990). Por ejemplo, *F. solani* controla las malezas *Cucurbita texana* e *Hydrilla verticillata* (Charudattan y De Loach, 1988).

Las especies patogénicas del género producen enfermedades destructivas en ornamentales, en cultivos hortícolas bajo cubierta y en explotaciones extensivas (Tjamos y Beckman, 1989), las especies de este grupo son capaces de producir marchitez, tizones, manchas foliares y pudriciones en raíces, tallos, frutos, granos y semillas de cualquiera de estos cultivos (Maet *al.*, 2013; Nelson *et al.*, 1990). En el caso particular de *F. solani* y algunas formas especiales de *F. oxysporum* no se producen marchiteces vasculares, sino solo pudrición de semillas y plántulas, raíces, tallos inferiores, cormos, bulbos, entre otros (Agrios, 2005).

Los ataques del hongo generalmente inician con una colonización de las hifas en el tejido vascular de raíces y tallo, luego los conidios se transportan por la planta a través de la corriente transpiratoria. Inicialmente se manifiesta una clorosis y se distorsionan las hojas bajas. Ocurre una marchitez y se presenta una decoloración vascular y necrosis de los tallos. A medida que el patógeno avanza progresa la enfermedad culminando con la muerte del hospedante. El daño que generan en el huésped por lo común es de carácter irreversible provocando pérdidas económicas de gran relevancia (García *et al.*, 2007).

Para que la infección resulte exitosa se requiere la adhesión del patógeno a la superficie del hospedante, luego debe ocurrir una descomposición enzimática de las barreras físicas que opone la planta, el patógeno tiene que defenderse de los compuestos antifúngicos del hospedante, y por último el hongo debe inducir la muerte de las células del huésped a través de la secreción de micotoxinas (Agrios, 2005).

Fusarium se caracteriza no solo por inactivar las sustancias tóxicas de su hospedante sino también por producir toxinas que aumentan su virulencia. Algunas como eniatinas y ácido fusárico son tóxicas para los vegetales, mientras que las micotoxinas como tricotecenos y fumonisinas son tóxicas para los animales (Agrios, 2005). Los efectos van desde carcinogénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, hasta inmuno-supresores y estrogénicos (Wagacha y Muthomi, 2007).

Las especies del género *Fusarium* tienen la capacidad para sobrevivir como micelio en ausencia del hospedante y puede iniciar la infección en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo o a través del aire o el agua (Maet *al.*, 2013).

F. oxysporum, *F. culmorum* y *F. solani* son algunos de los principales fitopatógenos del género, agentes causales de patologías en cereales, ornamentales y hortalizas (Giraud *et al.*, 2002). *F. oxysporum* y *F. solani* han sido reportadas como principales agentes de marchitez en Chile y México desde 1967 junto a géneros como *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytium* spp., entre otros, formando un grupo fitopatogénico que en condiciones favorables provoca pérdidas económicas devastadoras del 60 al 100% de la superficie cultivada (Rivera, 2009).

F. solani (Mart.) Sacc. (Teleomorfo: *Nectria haematococca* Berk. Y Br.) es un fitopatógeno causante de enfermedades en cultivos de interés como especies del género *Cucurbita*, soja, poroto, papa, entre otros (Luginbuhl, 2010). El patógeno fue descrito en un principio por Von Martius en 1842 como *Fusisporium solani* a

partir de un aislamiento de papa (*Solanum tuberosum*). Posteriormente la especie fue modificada al género *Fusarium* por el micólogo italiano Piers A. Saccardo en 1881. Luego, Snyder y Hansen en 1941 nombraron *F. solani* a un complejo conjunto de hongos compuesto por numerosas subespecies (Desjardines, 2006). Las formas especiales están limitadas a familias específicas, por ejemplo: *F. solani* f.sp.*pisi* afecta a la arveja, *F. solani* f.sp.*fabae* a vicia spp, *F. solani* f.sp.*phaseoli* al poroto, *F. solani* f.sp.*cucurbitae* a las cucurbitáceas (Luginbuhl, 2010). Es de destacar que las especies hospedantes forman parte de familias poco emparentadas incluyendo hortalizas, flores, especies de césped, cultivos mayores y malezas (Agrios, 2005).

Las colonias de *F. solani* son de rápido crecimiento y presentan una coloración crema a durazno con tintes púrpura (Sanabria *et al.*, 2002). En Agar Papa Dextrosa produce abundante micelio color blanco crema (Luginbuhl, 2010). En general solo genera esporas asexuales, aunque bajo ciertas condiciones se produce una fase peritecial identificada como *Nectria haematococca*. El patógeno posee esporodoquio. Los micro y macroconidios se forman en conidióforos largos ramificados o no y están constituidos por 3 a 9 células (Agrios, 2005). Son de fácil diseminación por el viento, maquinaria, agua, etc. (Agrios, 2005). Crece en el suelo, donde se comporta como saprófito sobre residuos de especies hospedantes. También desarrollan de manera saprofítica en la rizósfera del hospedante antes de invadirlo. Se disemina a través de esporas y trozos de micelio (Sanabria *et al.*, 2002). Se caracteriza por formar clamidosporas como estructuras de resistencia con forma redonda a oval de pared gruesa lisa o

levemente rugosa, en pares terminales o intercaladas constituidas por una o dos células (Agrios, 2005). Debido a esto, es una especie que persiste mucho tiempo en el suelo, siendo necesarias rotaciones largas de 5 a 6 años como mínimo para disminuir significativamente el inóculo. Los exudados de la rizósfera estimulan su germinación, sea la especie hospedante o no (Sanabria *et al.*, 2002).

En cuanto al manejo, este incluye la esterilización del suelo en invernáculos por solarización, utilización de vapor de agua caliente, o cualquier otro método junto con la utilización de materiales de propagación sanos. Sin embargo, debido a su fácil diseminación es necesaria una fumigación con Captafol después de realizar la esterilización. La roturación del suelo a 25-30 cm previa siembra, también disminuye la incidencia, así como la rotación con cultivos no hospedantes. Deben utilizarse variedades con buen comportamiento frente a la enfermedad y materiales de propagación sanos tratados o no con fungicidas como por ejemplo Benomyl. Otra práctica de control es la incorporación de residuos de cebada o lechuga que favorecen el desarrollo de numerosos hongos y bacterias antagónicas a *Fusarium*, así como la utilización de micorrizas (Agrios, 2005).

2.2. La planta de tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) es un subarbusto perenne perteneciente a la familia Lamiaceae (Souza Prestes *et al.*, 2015). Es una especie perteneciente al grupo de las plantas aromáticas, de aspecto compacto, con numerosas ramas y altura de 30

cm de alto por 30 cm de ancho, pudiendo alcanzar un máximo de 50 cm en zonas protegidas (Figura 1). El tomillo es una especie aromática rica en aceites esenciales utilizada principalmente en medicina tradicional y como condimento (Rojas Armaset *al.*, 2015). Las plantas poseen tallos algo decumbentes, con aspecto pardo a blanco algo aterciopelado, sus hojas de 4 a 8 mm son lineales a lanceoladas, sentadas, opuestas y algo blanquecinas en el envés (Gil, 2002). Las flores son rosadas a blancas dispuestas en una inflorescencia espiciforme, acabezuelada o con verticilastros más o menos distantes, junto con las hojas son los órganos que acumulan aceites esenciales (Zekaria, 2008).





Figura 1. Aspecto de un ejemplar joven de tomillo. Foto: L. R. Casacchia.

El centro de origen de la especie es la región del mediterráneo occidental, creciendo naturalmente en zonas de clima seco y elevada heliofanía. Favorecen su cultivo los suelos calizos y arcillosos, es una especie rústica que puede desarrollar y crecer sin inconvenientes a altitudes de 0 a 2000 msnm, resiste las heladas, pero disminuye el crecimiento vegetativo cuando las temperaturas son bajas, también resiste temperaturas elevadas y sol directo por las ceras que recubren las hojas. Pese a su sencillo cultivo, no soporta el encharcamiento y el exceso de humedad ambiental (Solís Campoverde, 2011). Puede reproducirse por semillas o multiplicarse por esquejes (Latorre, 1999). Bajo determinadas situaciones puede sufrir el ataque de nemátodos, principalmente *Meloidogyne hapla* (Gutiérrez, 1996).

En esta especie una leve defoliación y el amarilleo después de la floración son fenómenos naturales, que no deben confundirse con enfermedades (Gutiérrez, 1996).

El tomillo posee propiedades terapéuticas y antifúngicas atribuidas a sustancias aisladas de la porción aérea de la planta (Lizcano González, 2007). Actualmente se cultivan 7 quimiotipos, clasificados en función del compuesto presente en mayor proporción (Fonnegra y Jiménez, 2006). Las ramas contienen flavonoides, derivados del apigenol y del luteolol; ácidos fenolitos, caféico, rosmarínico, clorogénico, ácidos tripénicos, ursólico y oleanoico; saponinas y contiene también minerales. El aceite esencial está compuesto por carvacrol y timol en porcentajes del 20 a 70% según razas; también contiene p-cimeno, terpinenos, linalol, borneol y sus ésteres acéticos, ciñel, geraniol, cariofileno.

2.3. Aceites esenciales

A diferencia de otros organismos las plantas tienen la capacidad de sintetizar sustancias orgánicas que no cumplen una función directa en el metabolismo primario, sino que forman parte del metabolismo secundario (García y Pérez Urria-Carril, 2009). Los metabolitos secundarios o también llamados productos naturales se hallan en pequeñas cantidades y pueden ser específicos de determinada familia, especie o variedad vegetal (García y Pérez Urria-Carril, 2009). Algunos funcionan como pigmentos, otros como atrayentes, forman parte del sistema de defensa natural de las plantas, o como intermediarios metabólicos (Soto-Mendívil *et al.*, 2006). Sin embargo, gran parte de ellos cumplen funciones

desconocidas. No obstante, se utilizan en la industria química, alimenticia, cosmética y/o medicinal (García y Perez Urría-Carril, 2009).

Dentro del grupo de metabolitos secundarios se destacan los aceites esenciales (Martínez, 2003). Se ha planteado como hipótesis que actúan como agentes alelopáticos que inhiben la germinación de otras especies, que atraen polinizadores y que a su vez, cumplen funciones de protección de la especie que los sintetiza contra insectos y hongos (Solís Campoverde, 2011). Este grupo de compuestos definidos como aceites esenciales solo se encuentran en las plantas superiores, más específicamente en 1750 especies aromáticas incluidas en 60 familias botánicas (Solís Campoverde, 2011).

El aceite esencial corresponde a la fracción obtenida por destilación o expresión, en el caso de que se utilicen sustancias de extracción el producto se denomina extracto vegetal (Archila Calderón, 2008).

Se clasifican según consistencia, origen y naturaleza química. Para el primer caso hay esencias fluidas (líquidos volátiles a temperatura ambiente), bálsamos (consistencia más espesa, poco volátiles) y oleorresinas (líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas). Según el origen los aceites esenciales son naturales, pero también hay esencias artificiales y sintéticas. Por otra parte, químicamente se clasifican en monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides, dependiendo de la naturaleza de los componentes que predominan (Martínez, 2003).

Los aceites esenciales son una mezcla compleja que puede almacenarse en las vacuolas de la célula, surgen como producto de la hidrólisis de glucósidos, formados por el protoplasma o por descomposición de la capa resinosa de la pared celular (Archila Calderón, 2008). Pueden tener hasta más de 200 componentes, agrupados en 2 fracciones; una volátil (90 a 95% del total) constituida por compuestos alifáticos, hidrocarburos y análogos oxigenados de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos), monoterpenos, monoterpenoides, sesquiterpenos y sesquiterpenoides; y otra fracción no volátil, que constituye el 5-10% del aceite y agrupa ácidos grasos, colorantes, cumarinas, psoralenos, esteroides y flavonoides (Archila Calderón, 2008). Se caracterizan por ser inestables ante la luz, el oxígeno, ante agentes oxidantes y reductores, a pH extremos y a trazas de metales que catalizan la descomposición (Archila Calderón, 2008). Son solubles en solventes no polares aumentando esta propiedad con la cantidad de monoterpenos que lo compongan; además, tienen alta solubilidad en etanol, lo que facilita la manipulación en la industria cosmética y farmacéutica (Archila Calderón, 2008).

Este grupo de compuestos varía cuantitativa y cualitativamente no solo con la genética de la especie vegetal, sino también por la localización geográfica, las condiciones climáticas y el ambiente donde se esté cultivando (Vokou *et al.*, 1993). Además, se han informado fluctuaciones en la composición del aceite de acuerdo a la época del año, siendo mayor en el verano (Soto-Mendívil *et al.*, 2006).

Es importante destacar que si bien intervienen muchos factores en la cantidad y calidad de aceite que se sintetiza, los rendimientos son muy bajos, llegando en casos extremos a 3% de esencia en estado seco (Solís Campoverde, 2011).

El origen natural convierte a los aceites esenciales en productos más seguros para el ser humano, así como también para el medio ambiente (López, 2006). Otro factor que los posiciona como una alternativa de manejo de los cultivos es el bajo riesgo que presentan los microorganismos blanco de su acción para desarrollar resistencia, esto podría atribuirse a la gran cantidad de puntos de acción, producto de la complejidad en la composición del aceite (López, 2006).

En el caso particular del *T. vulgaris*, el aceite esencial está compuesto principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol, linalol (Solís Campoverde, 2011). Es posible atribuir sus propiedades antimicrobianas a los compuestos monoterpénicos fenólicos carvacrol y timol (López, 2006). Sin embargo, en algunos casos la capacidad de inhibir microorganismos del timol puede ser eliminada por la complejidad en la composición de los aceites esenciales (Parish y Davidson, 1993). Además del tomillo, el carvacrol y timol son los monoterpenos que caracterizan especies de familia Lamiaceae, dentro de los cuales también se encuentra el orégano que posee propiedades antifúngicas similares a las del tomillo (Vokou *et al.*, 1993).

De esta manera, los aceites esenciales surgen como una alternativa natural para la protección de los cultivos frente a problemas sanitarios que podrían presentarse, se podrían utilizar de manera preventiva o curativa (Solís

Campoverde, 2011). Así, debido a sus propiedades y principios activos, aumentan su participación en medicina, cosmetología, industria farmacéutica, biotecnología y actualmente con aplicación en la agricultura ecológica (Fonnegra y Jiménez, 2006). Es muy probable que de los aceites esenciales puedan aislarse moléculas novedosas y eficaces para ser usadas como antimicóticos (Lizcano González, 2007).

2.4. Normativa acerca de la utilización de agroquímicos. Situación actual del Bromuro de metilo.

En Argentina, a través de la ley N°3489 promulgada en el año 1958 se estableció que los agroquímicos deben figurar en el Registro de Terapéutica Vegetal antes de ser comercializados en el país (Ministerio de Agricultura, 1958). En la actualidad, para ser comercializado debe ser demostrado que el plaguicida no produce riesgos para la salud.

En relación a la utilización de biocidas, la Convención de Viena para la Protección de la Capa de Ozono diseñó un protocolo (Protocolo de Montreal) en el año 1987, en el cual se estableció la prohibición de la producción y consumo de ciertas sustancias nocivas para la capa de ozono, dentro de las cuales se incluye el bromuro de metilo. El protocolo entró en vigencia en el año 1989, y en 1990 se aprobó en Argentina mediante la ley 23.778. Dos años más tarde mediante la ley 24.418 se incorpora el Bromuro de Metilo como sustancia controlada. Posteriormente en 1996 se crea la oficina OPROZ para eliminar las sustancias que agoten la capa de ozono. Ese mismo año se determina que el SENASA

tendrá competencia para registrar, autorizar o prohibir agroquímicos (SENASA, 1996).

Si bien el Bromuro de Metilo se había inscripto en el Registro de Terapéutica Vegetal, se comprobó que sólo en las cámaras de fumigaciones el riesgo era aceptable. Motivo por el cual se aprobó su utilización en las cámaras para tratamientos cuarentenarios (SENASA, 1996).

En la Convención de Protección Fitosanitaria del año 2003, se dispuso reducir al mínimo el empleo de Bromuro de Metilo e incrementar medidas fitosanitarias alternativas (SENASA, 2003).

En la 10ª Reunión del Protocolo de Montreal se estableció que los países desarrollados reduzcan gradualmente el uso de bromuro de metilo hasta llegar a su eliminación total en el año 2005, mientras que para los países en desarrollo se impuso una eliminación total para el año 2015 (Tierney, 2000).

En el año 2006, en Argentina se prohíbe la utilización de formulaciones que contengan más del 70% de la sustancia activa de Bromuro de metilo. El SENASA “cancela la autorización para el uso al cien por ciento en tratamiento de suelos y sustratos. Aquellos que tengan stock deberán notificarlo al SENASA en carácter de declaración jurada” (SENASA, 2006).

Actualmente el anexo E grupo I del protocolo de Montreal especifica que el Metilbromuro está prohibido (SENASA, 2006).

El bromuro de metilo es un biocida utilizado para esterilizar sustratos y suelos por su amplio espectro de acción. Su naturaleza gaseosa permite una eficiente

circulación por los poros de aire del sustrato además de su excelente penetración en el perfil del suelo y/o sustrato, inclusive cuando la humedad y temperatura del sustrato son elevadas. Sin embargo, más del 50% llegando a valores del 95% en algunos casos, es liberado a la atmósfera, de este modo los átomos de bromo llegan a la estratósfera y reaccionan con el ozono reduciendo su contenido en la atmósfera y generando un agujero que permite el ingreso de rayos ultravioleta a la superficie terrestre, poniendo en riesgo la salud humana y ambiental (Thomas, 1997). En la búsqueda de alternativas se llevan a cabo numerosas investigaciones, teniendo en cuenta que no existe un único sustituto del bromuro de metilo por la diversidad de patógenos, cultivos y zonas (Slooteen, 1997). Las investigaciones persiguen el objetivo de alcanzar alternativas eficaces, que no dañen el ambiente y que sean convenientes económicamente (Mehmet, 2003). Entre las alternativas se incluyen: la utilización de hongos y bacterias antagonistas a los patógenos (Inbar *et al.*, 1994), prácticas físicas como la solarización (Hartzet *al.*, 1993), culturales como la rotación de cultivos, el empleo de otros esterilizantes de menor impacto ambiental como el yoduro de metilo o iodometano (Zheng *et al.*, 2003), propargil bromuro o bromopropino, cloropicrina (Gullinoet *al.*, 2002), 1,3-dicloropropeno, dazomet o metham sodio y bromonitrometano (Schneider *et al.*, 2003), alternativas químicas no convencionales como el empleo de peróxido de hidrógeno (Chapman, 1998; Baldry, 1982) y/o el ácido peracético (Kitis, 2004), así como también el reciclado y sistemas de colecta del bromuro de metilo (Chitwoody Deshusses, 2001).

Por otro lado, la descomposición de residuos orgánicos, conocida como biofumigación, genera sustancias volátiles que tienen efectos fungicida, bactericida e insecticida (Kirkegaard *et al.*, 1993; Bello, 1998). Antiguamente se aplicaba solo a la emisión de isotiocianatos por descomposición de brasicáceas, pero en la actualidad el concepto de biofumigación considera todas las materias orgánicas y los residuos agroindustriales (Kirkegaard *et al.*, 1993; Matthiesen y Kirkegaard, 1993; Angus *et al.*, 1994). La biofumigación no excluye a la solarización, que podrían considerarse en conjunto para incrementar la eficacia del proceso de esterilización del sustrato (Bello *et al.*, 2000).

A pesar de todas las alternativas, ninguna ha sido tan efectiva como el bromuro de metilo (Himelrick y Dozier, 2003; Shaw y Larson, 1999). Los rendimientos de numerosos cultivos han demostrado ser mayores cuando el suelo es tratado previamente al establecimiento de las plantas con bromuro de metilo y cloropicrina, incluso en ausencia de microorganismos letales al momento de aplicación. Esto podría ser atribuido al vacío biológico que genera el biocida, eliminando microorganismos con efectos subletales o restrictivos en el desarrollo y crecimiento del cultivo (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

2.5. Problema de investigación.

La demanda actual de alimentos de origen vegetal y animal se inclina por productos obtenidos en sistemas de producción que privilegian la utilización reducida de agroquímicos, con el propósito de acercarse a los alimentos que los consumidores perciben como “naturales” (Blanco-Padilla *et al.*, 2014). A esta

demanda se suman, además, el alto costo de los agroquímicos y el desarrollo de resistencia por parte de distintos patógenos fúngicos.

La situación descrita ha estimulado el desarrollo de investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos principios activos biodegradables, que tengan un menor impacto ambiental negativo y que sean igual o más eficaces y eficientes que un producto de origen sintético (Quintero *et al.*, 2001). Estas investigaciones se han enfocado en el estudio de principios activos contenidos en aceites esenciales y extractos vegetales.

La utilización empírica de aceites y extractos vegetales para el control de distintos patógenos es una práctica muy antigua (Lizcano González, 2007). En la última década, a raíz de la tendencia mundial hacia los alimentos “naturales” se intensificaron las investigaciones sobre aceites esenciales y otras alternativas poco nocivas para el medio ambiente y salud humana (Archila Calderón, 2008).

En la actualidad se conocen numerosas sustancias extraídas de las plantas que tienen efecto antifúngico contra poblaciones de fitopatógenos sin producir contaminación de los recursos agua y suelo (Lizcano González, 2007). Existen entre 250 a 500.000 especies vegetales de las que al menos un 10% ha sido estudiada en aspectos químicos y propiedades biológicas (Piñol, 2001).

Al igual que sucede con los compuestos antimicrobianos de origen sintético, en el caso de aceites y extractos vegetales es útil la determinación de las Concentraciones Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida o Bactericida (CMF o CMB). La primera detiene el crecimiento y desarrollo del

microorganismo (efecto bacteriostático y/o fungistático) pero se reanuda cuando la sustancia inhibitoria es eliminada del medio, mientras que la segunda elimina al hongo o bacteria sin que se reanude el crecimiento cuando la sustancia inhibitoria es removida (Solís Campoverde, 2011).

2.6. Antecedentes acerca de la utilización de plantas y sus productos con efecto antifúngico.

Muchas plantas han sido aceptadas para uso antifúngico porque en su análisis químico y evaluación farmacológica han demostrado que contienen un principio activo que les confiere esta propiedad (Zapata *et al.*, 2003). Existen, asimismo, numerosos antecedentes acerca del carácter antimicrobiano que tienen los aceites esenciales, de su capacidad para controlar enfermedades en poscosecha, y su inocuidad hacia el ambiente y los consumidores (Wilson *et al.*, 1997; Gogoiet *al.*, 1997; Pitarokiliet *al.*, 1999; Meepagala *et al.*, 2002).

Distintos aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas han mostrado capacidad fungicida *in vitro* contra *Fusarium* spp (Fernández y Vega, 2001). También *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* fueron inhibidos por aceites esenciales con elevado contenido de eugenol, carvacrol y timol (canela, clavo y tomillo respectivamente) (Jayashree y Subramanyam, 1999; Soliman y Badeaa, 2002).

Los aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm y *Piper aduncum* L. también han mostrado actividad antifúngica (Bruni *et al.*, 2004; Guerrini *et al.*, 2009). Para *O. quixos* la concentración de 500 ppm inhibió en un 95% a *F. solani* y a *Phytophthora* sp. (Scalvenziet *al.*, 2016). Para *Phytophthora* sp la inhibición fue de 80% utilizando 50 ppm, y se inhibió 100% para 100, 200 y 500 ppm (Scalvenziet

al., 2016). *P. aduncum* a 500 ppm inhibió a *F. solani* en un 94% y a *Phytophthora* sp en un 91% (Scalvenziet *al.*, 2016).

Por otro lado, ensayos realizados por López (2006) mostraron que el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) inhibe el crecimiento de *F. verticilloides* bajo condiciones *in vitro*. López observó, además, que el comportamiento inhibitorio fue dosis dependiente con respuesta lineal para las concentraciones utilizadas. Daferera *et al.* (2003) mostraron el efecto inhibitorio que tienen los aceites esenciales sobre los microorganismos *Botrytis cinerea*, *F. solani*, *F. sulphurem* y *Clavibacter michiganensis*, y comprobaron, también, que el aceite esencial de *O. vulgare* es rico en timol (60%) y que inhibe el crecimiento y desarrollo de *B. cinerea* cuando se utilizan concentraciones de 200 ppm y a patógenos del género *Fusarium* spp con una concentración de 150 ppm. Estos resultados fueron obtenidos utilizando agar papa dextrosa como medio de cultivo. Por otro lado, utilizando aceite esencial de *O. vulgare* y agar extracto harina de maíz como sustrato, Velluti *et al.* (2003) obtuvieron una CMI de 1000 ppm sobre *F. verticilloides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, en este caso el componente del aceite esencial en mayor proporción (70%) fue el carvacrol. Sobre *F. proliferatum* solo tuvieron capacidad inhibitoria los aceites esenciales con elevada proporción de terpenos fenólicos. La reactividad de los grupos hidroxifenólicos de distintos aceites esenciales se observó a través de la formación de puentes de hidrógeno con sitios activos de determinadas enzimas (Farag *et al.*, 1989). Nychas (1995) demostró que el extracto de *O. vulgare* destruye la capacidad selectiva de las membranas citoplasmáticas. A este sitio de acción se suma la capacidad de inhibir

enzimas fúngicas y microbianas (López, 2006). Dhingra *et al.* (2004) demostraron que el aceite esencial de mostaza tuvo efecto inhibitorio en el control de damping off en poroto causado por *R. solani*.

Por otra parte, en ensayos realizados en condiciones de laboratorio se determinó el efecto fungicida de los extractos vegetales sobre microorganismos fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 1999; Bautista *et al.*, 1998; Mercado y Rosado, 1986; Deans y Svoboda, 1990; Qasem y Abu-Blan, 1996). El efecto fungicida también fue determinado a través de ensayos realizados en invernadero (González y Guevara, 1990; Bergeron *et al.*, 1995; Lomelí y Ochoa, 1999), y a campo (Frayre *et al.*, 1996; Salazar *et al.*, 1990; Montes *et al.*, 1990; Insunza y Valenzuela, 1995; Cruz *et al.*, 1999). En los estudios citados se determinó, además, que el carvacrol y el timol son los principales componentes que causan la inhibición o inactivación de los microorganismos blanco (Eklund, 1989).

En el caso particular del tomillo, numerosos estudios demuestran el efecto fungicida que tienen los componentes del aceite esencial. Pérez-Sánchez *et al.* (2007) obtuvieron resultados fungitóxicos de aceites esenciales obtenidos de 6 poblaciones de *Thymus zygis* sobre cultivos de *R. solani*, *F. oxysporum* y *Colletotrichum acutatum*. Bravo-Luna *et al.* (1998) observaron que el aceite esencial de *T. vulgaris* a dosis de 10.000 y 7.500 ppm inhibió el crecimiento micelial de *F. moniliforme*.

Mientras que en el caso de *Fusarium* aislado de papaya, el aldehído cinámico, carvacrol y timol, inhibieron el crecimiento micelial del hongo en la totalidad de las

dosis evaluadas (100, 150, 200, 250, 300 ppm) (Barrera Necha y García Barrera, 2008).

Soliman y Badeaa (2002) reportaron que los aceites de tomillo y canela, en una concentración de 500 ppm, inhibieron totalmente el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos. Rasooli y Owlia (2005) demostraron que el crecimiento y producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* fueron totalmente inhibidos por el aceite esencial de tomillo.

Sobre *Fusarium sp* el mejor efecto antifúngico fue observado con el aceite de *T. vulgaris*, que inhibió totalmente el crecimiento del hongo cuando se utilizaron concentraciones de 200, 250 y 300 ppm. También sobre *Fusarium*, el efecto antifúngico fue dependiente de la dosis cuando se utilizaron los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Telexys ambrosioides*; y resultó nulo cuando se utilizaron los aceites de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* (Barrera Necha y García Barrera, 2008).

En cuanto a la composición del aceite, estudios realizados con tomillos de diferente origen geográfico mostraron que los componentes mayoritarios carvacrol y timol suman 50 a 90% del total, y como secundarios se destacan p-cimeno y terpineno (Vokou *et al*, 1993; Daferera *et al*, 2003). Las hojas de orégano también son ricas en carvacrol y timol, por lo que esta especie también tiene propiedades antimicrobianas (Kagale *et al.*, 2004). Son estos componentes los que confieren características antimicrobianas al aceite de tomillo, parece ser que actúan sobre la

membrana plasmática del organismo diana induciendo pérdida de la capacidad selectiva (Solís Campoverde, 2011).

Carvacrol y timol evaluados por separado a 40 y 50 ppm inhibieron un 100% el crecimiento de *Penicillium digitatum*. A 40 ppm inhibieron un 95% el crecimiento de *Penicillium italicum* y a 50 ppm la inhibición fue total. Mientras que la esporulación fue inhibida en un 100% para ambos patógenos a 40 y 50 ppm de carvacrol y timol, también evaluados por separado (Velásquez *et al.*, 2014). Sumado a estos monoterpenos el γ -terpineno y p-cimeno contribuyen al efecto antifúngico del AE de tomillo por funcionar como precursores bioquímicos de timol y carvacrol (Lazar *et al.*, 2010; Mehra *et al.*, 2013).

A pesar de las evidencias, la mayoría de los ensayos se han realizado *in vitro*, es por ello que difícilmente son reconocidas las ventajas que los aceites esenciales tienen sobre los productos de síntesis (Lizcano González, 2007). Sin embargo, los AEs no dejan de posicionarse como una alternativa para el control de microorganismos patógenos (Başer y Buchbauer, 2010; Sánchez-León *et al.*, 2015). A su vez, podrían cumplir el rol de ser materia prima para la fabricación de nuevos agroquímicos con la ventaja de ser biodegradables (Cheng *et al.*, 2009).

2.7. Objetivo

General

Evaluar el efecto del aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) sobre el crecimiento y desarrollo de *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* y *R. solani*.

2.8. Hipótesis

El aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) es efectivo en la reducción del crecimiento de las colonias de los hongos fitopatógenos de suelo: *F. solani*, *P. capsici* y *R. solani*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aceite esencial (AE) de tomillo.

El aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*) se obtuvo a partir de plantas sanas cultivadas a campo, sin utilización de agroquímicos, en la provincia de Córdoba. La destilación por arrastre de vapor se realizó en La Plata en la empresa Esencias del Bosque a cargo del Ingeniero Agrónomo Darío Crottogini. El rendimiento en aceite esencial fue 2% del peso seco.

El aceite esencial fue analizado cuantitativa y cualitativamente en el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) a cargo de la Dra. Daiana Retta. Los análisis realizados permitieron determinar el tipo específico de aceite utilizado.

3.2 Hongos patógenos de suelo.

En las pruebas de inhibición se utilizaron tres aislamientos de hongos patógenos de suelo: i) *R. solani*, aislado a partir de un sustrato constituido por tierra negra (60%), residuos animales y vegetales (30%) y corteza de pino compostada (10%) en el que se cultivaban alegrías del hogar (*Impatiens walleriana*) con síntomas de podredumbre a nivel de cuello y raíces (Figura 2 y 3); empleando la técnica “del suelo diluido”.



Figura 2. Aspecto del cultivo de *I. walleriana* donde desarrollaron ejemplares con síntomas de podredumbre a nivel de cuello y raíces. Foto: L. R. Casacchia.



Figura 3. Ejemplar de *I. walleriana* con síntomas de podredumbre en cuello raíces. Foto: L. R. Casacchia.

ii) *F. solani*: aislado a partir de explantos de raíces y tallos de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum*) con síntomas de podredumbre de raíces y: iii) *P. capsici* aislado a partir de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*) son síntomas de marchitamiento. El aislamiento de *P. capsici* fue proporcionado por la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, UBA.

Las diluciones de suelo, en agua destilada estéril, y los explantos procedentes de material vegetal sintomático fueron sembrados en placas de Petri conteniendo medio agar papa glucosado (APG) al 2%. Las placas sembradas fueron incubadas durante 8 días a 24° C. Luego de la identificación se obtuvieron cultivos puros, con los cuales se procedió a la inoculación de plántulas sanas contenidas en macetas. La técnica de inoculación consistió en el riego del sustrato de cultivo con una

suspensión del cultivo de cada uno de los hongos patógenos aislados, de modo de cumplir con los postulados de Koch (Agrios, 2005). En todos los casos las pruebas se efectuaron por triplicado.

Los cultivos puros de los tres patógenos (Figura 4, 5 y 6) fueron mantenidos en medio APG y repicados periódicamente hasta su utilización en las pruebas de inhibición.

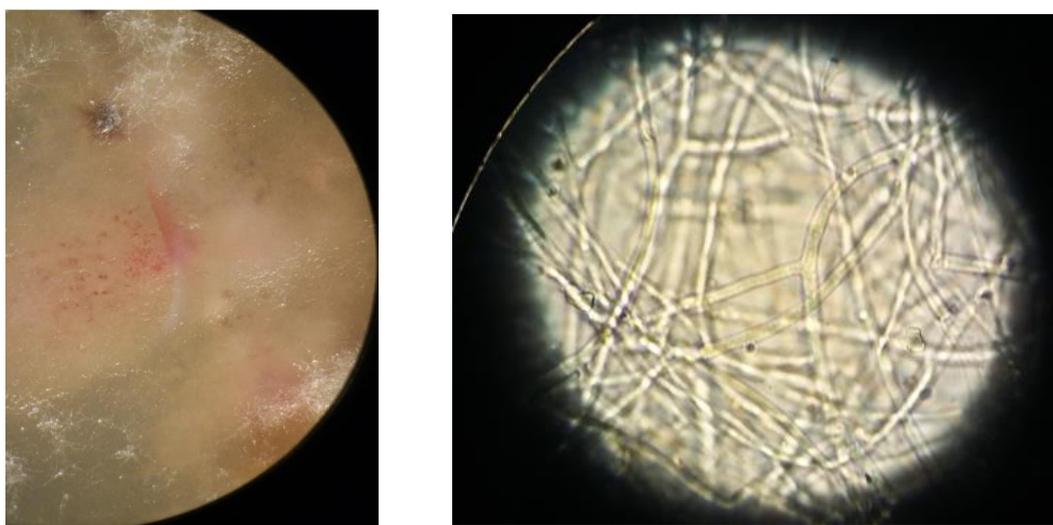


Figura 4. *R. solani* en medio APG y detalle del micelio (40X). Foto: L. R. Casacchia.

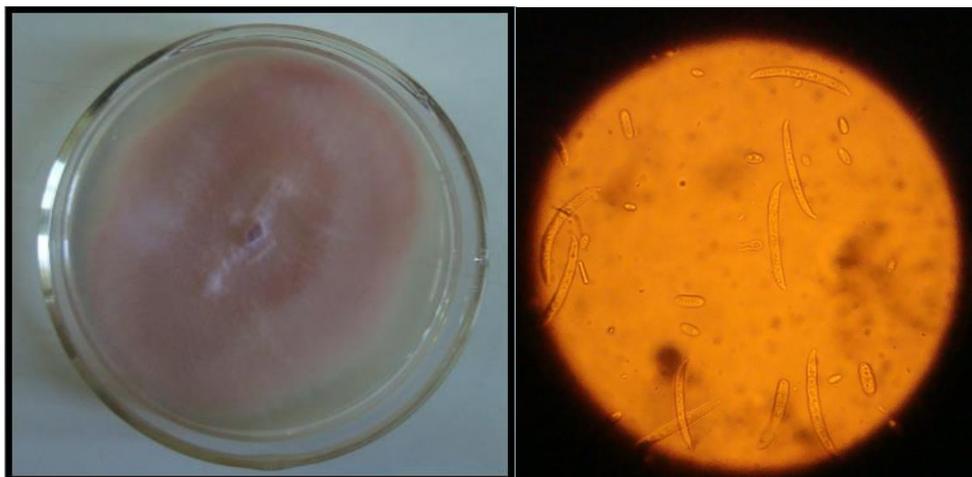


Figura 5. *F. solani* en medio APG y detalle de macro y microconidios (40X). Foto: L. R. Casacchia.



Figura 6. *P. capsici* en medio de cultivo APG (40X). Foto: L. R. Casacchia.

3.3. Pruebas de inhibición.

Se utilizó aceite esencial de tomillo puro, sin aditivos, natural y obtenido por arrastre de vapor. A partir del aceite puro se obtuvieron diluciones del mismo utilizando como diluyente medio APG. Se obtuvieron 6 diluciones con distinta concentración (dosis) del aceite: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm. Para lo cual, una vez determinado el volumen de aceite para cada concentración (Véase Anexo) se vertió, utilizando micropipeta, el aceite en frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 250 mL de APG enfriado a 45° C. A continuación se procedió a verter el medio + el aceite en placas de Petri estériles. Una vez solidificado el medio contenido en las placas se procedió a sembrar en el centro de las mismas el inóculo del patógeno, procedente de un cultivo en APG. Las siembras se efectuaron por separado para cada uno de los tres patógenos y para cada

concentración del aceite. Las placas sembradas fueron incubadas durante 8 días a temperatura ambiente y alternancia de 12 hs de oscuridad y 12 hs de luz. La variable respuesta consistió en la medición del diámetro de las colonias del patógeno, dicha medición se realizó cada 24 h durante 8 días. Las placas sembradas fueron conservadas durante 20 días para permitir la detección de variaciones posteriores en el desarrollo de las colonias. La siembra se realizó por triplicado para cada combinación patógeno-concentración (dosis) del aceite esencial y los testigos consistieron en la siembra del patógeno en medio de cultivo sin el agregado de aceite.

3.4. Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Los resultados (diámetro de colonias) se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con el DSG utilizando el Infostat como software estadístico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los ensayos realizados se alcanzaron los resultados que a continuación se describen:

4.1. Composición del aceite.

El análisis realizado (Retta, 2016) mostró que el AE de tomillo utilizado en las pruebas pertenece al quimiotipo timol, dado que este componente es el que se encontró en mayor proporción relativa (Tabla I).

Tabla I. Composición porcentual del AE de tomillo utilizado en las pruebas de inhibición del crecimiento de patógenos fúngicos.

COMPUESTO	%
<i>Alfa pineno</i>	3,8
<i>Canfeno</i>	0,9
<i>Mirceno</i>	1,4
<i>Beta pineno</i>	0,5
<i>p-cimeno</i>	29,3
<i>Limoneno</i>	1,1
<i>1,8-cineol</i>	trazas
<i>Gama terpineno</i>	6,6
<i>Linalol</i>	4,5
<i>Borneol</i>	0,6
Timol	43,8
Carvacrol	2,4
<i>Alfa felandreno</i>	0,7
<i>Beta cariofileno</i>	0,8
TOTAL	96,4

En relación a la composición de los aceites esenciales, la misma varía dentro de un mismo quimiotipo. El contenido porcentual de timol del AE de tomillo utilizado en el presente trabajo (Tabla I) mostró valores muy similares al indicado por Zambonelli *et al.* (2004), que contenía 50,06% de timol, 24,28% de p-cimeno y 0,17% de carvacrol.

Sokovic *et al.* (2009) identificaron 27 componentes en el aceite esencial de tomillo, dichos componentes representaron el 97,2% del aceite, los mayores niveles de este total correspondieron al timol (48,9%) y p-cimeno (19%).

4.2. Pruebas de inhibición

4.2.1. *Rhizoctonia solani*

El efecto del AE sobre el crecimiento de las colonias de *R. solani* fue dependiente de la concentración utilizada (Tabla II). Transcurridos ocho días de iniciadas las pruebas, la concentración de 50 ppm redujo el crecimiento de las colonias del hongo prácticamente a la mitad (49,46%) en comparación con el testigo (Figura 7).



Figura 7. *R. solani*: crecimiento de la colonia testigo (izquierda) y crecimiento de la colonia en APG + 50 ppm de AE de tomillo (derecha).

Esta reducción es mayor a la obtenida por Zambonelli *et al.* (1996), quienes mostraron que una concentración de 50 ppm de aceite esencial de tomillo quimiotipo timol (50,06% de timol) produjo una disminución del crecimiento de *R. solani* del 31%. Mientras que, El-Zemity y Ahmed (2005) indicaron que se necesitaba una concentración de aceite esencial de tomillo de 90 ppm para reducir en un 50% el crecimiento de *R. solani*. Sin embargo, cuando los mismos autores evaluaron por separado los distintos componentes del aceite esencial lograron determinar que utilizando sólo la fracción correspondiente al timol, se requerían

concentraciones de 4 a 32 ppm para inhibir el crecimiento del hongo en un 50%. Resultados similares fueron reportados por Gehan *et al* (2014), quienes concluyeron que para inhibir el crecimiento de *R. solani* en un 50% era necesaria una concentración de 30 ppm de timol. La capacidad fungistática de este monoterpeno ha sido documentada en trabajos previos (Tsao y Zhou, 2000; Sokovic *et al.*, 2009).

Además del timol, Marei *et al.* (2012) informaron que los monoterpenos (S)-limoneno y 1,8-cineol tienen propiedades antifúngicas efectivas al inhibir el crecimiento micelial no solo de *R. solani* sino también de *F. oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*, bajo condiciones in vitro.

Por otra parte, cuando se utilizaron concentraciones de 100 y 150 ppm se acentuó el efecto sobre la reducción del crecimiento de las colonias (Figura 8) en comparación con el testigo. Esto es, se registró una reducción de 68,02 y 88,65 %, respectivamente.



Figura 8. *R. solani* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo (izquierda). *R. solani* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 150 ppm de AE de tomillo (derecha).

Finalmente, cuando se utilizó una concentración de 200 ppm del aceite esencial no se observó crecimiento de la colonia de *R. solani* (Figura 9 y Tabla II).



Figura 9. Ausencia de crecimiento de la colonia *R. solani* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 200 ppm de AE de tomillo.

Por consiguiente, las concentraciones de 50, 100 y 150 ppm tuvieron en niveles crecientes en función de la concentración, un efecto fungistático sobre *R. solani*. Mientras que, el efecto fungicida se observó cuando se utilizó una concentración de 200 ppm. El efecto fungicida mostrado se alcanzó a una concentración menor a las citadas por Khaledi *et al.* (2015), en un trabajo donde concluyen que son necesarias concentraciones superiores a 850 ppm de aceite esencial de tomillo para inhibir el crecimiento de *R. solani*.

La comparación realizada entre las concentraciones del aceite esencial con efecto fungistático mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre las concentraciones de 50 y 100 ppm en comparación con la concentración de 150 ppm (Tabla II y Figuras 10 y 11).

Tabla II. Crecimiento porcentual de la colonia de *R. solani* en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.

0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200ppm	250 ppm	300 ppm
100	49,46	31,98	11,35	0	0	0
	A	A	B			

* Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones.

** Valores seguidos por igual letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

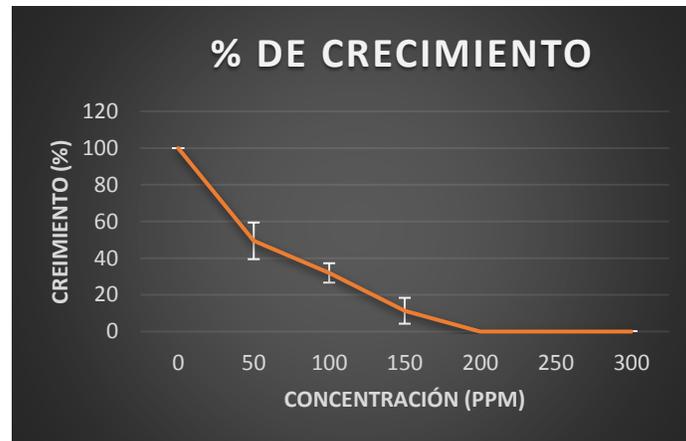


Figura 10. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *R. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.



Figura 11. Crecimiento de las colonias de *R. solani*, expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

4.2.2. *Phytophthora capsici*

El efecto del AE sobre el crecimiento de las colonias de *P. capsici* fue dependiente de la concentración utilizada (Tabla III y Figuras 15 y 16). Transcurridos ocho días del inicio de la prueba, la concentración de 50 ppm redujo el crecimiento de las colonias del hongo en un 28,57% en comparación con el testigo (Figura 12).



Figura 12. Colonia de *P. capsici* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 50 ppm de AE de tomillo.

Por otro lado, la concentración de 100 ppm inhibió de manera total el crecimiento de las colonias de *P. capsici* (Figura 13). Puede indicarse entonces que las concentraciones ensayadas de 50 y 100 ppm tuvieron efecto fungistático y fungicida respectivamente. Sin embargo, luego de transcurridos 13 días posteriores a la siembra pudo observarse que sólo en las tres placas que contenían APG + 50 ppm las colonias de *P. capsici* comenzaron a crecer nuevamente hasta cubrir de manera total la superficie del medio de cultivo (Figura 14). Este recrecimiento, que sólo se observó en las placas APG + 50 ppm del AE,

podría deberse a la evaporación de los componentes del aceite. Esto es, el efecto fungistático habría cesado con el proceso de evaporación.



Figura 13. Nulo crecimiento de la colonia de *P. capsici* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo.



Figura 14. Recrecimiento de la colonia de *P. capsici* observado el día 13 en medio de cultivo APG con una concentración de 50 ppm de AE de tomillo.

Tabla III. Crecimiento porcentual de la colonia de *P. capsici* en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.

0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm	300 ppm
100	71,43	0	0	0	0	0
	A					

* Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones.

** Valores seguidos por igual letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

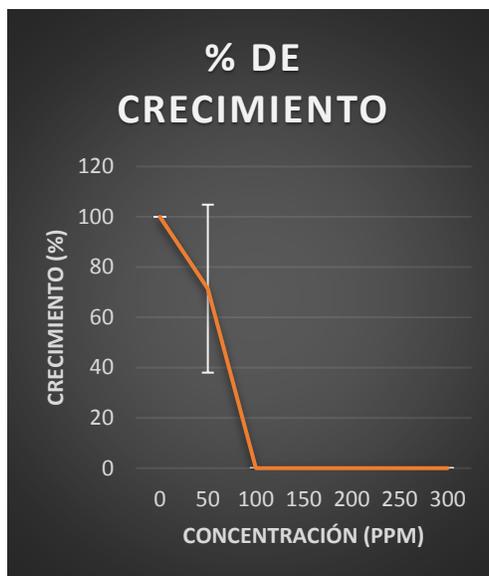


Figura 15. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *P. capsici* en medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de aceite esencial de tomillo.



Figura 16. Crecimiento de las colonias de *P. capsici*, expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de aceite esencial de tomillo.

En relación a los resultados alcanzados puede indicarse que, a pesar de la amplia búsqueda bibliográfica realizada no fue posible detectar trabajos en los cuales se

evaluaran específicamente los efectos del AE de tomillo sobre *P. capsici*. Sí se encontraron reportes acerca del efecto de los componentes del AE por separado, Muller *et al.* (1995) lograron inhibir de manera total el crecimiento de *Phytophthora* sp. utilizando timol y su isómero estructural carvacrol en una concentración de 100 ppm. En otros trabajos también ha sido demostrada la capacidad del carvacrol y timol de inhibir completamente el crecimiento micelial de *P. capsici* (Passardi *et al.*, 2004; Perdones *et al.*, 2012). Por otro lado, Camele *et al.* (2012) registraron la actividad fungistática de carvacrol y timol sobre *P. citrophthora* y *Rhizopus stolonifer*.

Como antecedentes también puede citarse el trabajo de Bajpai y Kang (2012), donde utilizando el aceite esencial de *Magnolia liliflora* lograron inhibir, en condiciones *in vivo*, el crecimiento de *P. capsici* patógeno de pimiento utilizando concentraciones de 500 y 1000 ppm. Por otra parte, López-Báez *et al.* (2009), demostraron el efecto fungicida del extracto de tomillo sobre *P. palmivora*, y Carrillo *et al.* (2010) utilizando AE puro de tomillo demostraron el efecto inhibitorio del mismo, en condiciones *in vitro*, sobre *P. infestans*. Además se han reportado efectos fungistático y fungicida del aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de *P. cactorum* (Kalembe y Thiem, 2004) y *P. drechsleri* (Mohammadi *et al.*, 2015).

4.2.3. *Fusarium solani*

El efecto del AE sobre el crecimiento de las colonias de *F. solani* fue dependiente de la concentración utilizada (Tabla IV y Figuras 22 y 23). Transcurridos ocho días de iniciadas las pruebas (Tabla IV y Figura 17), el crecimiento de *F. solani* se

redujo en un 14,05%, en comparación con el testigo, con la concentración de 50 ppm del AE.

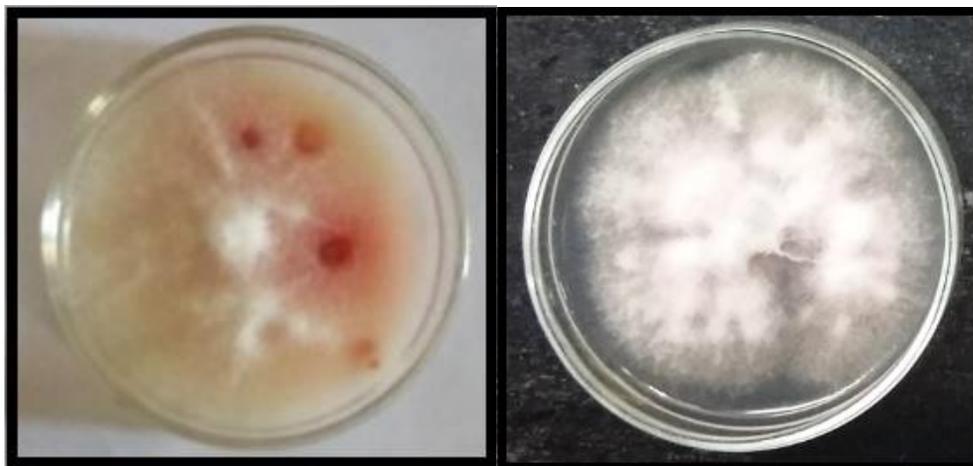


Figura 17. Desarrollo de la colonia de *F. solani* en medio APG (izquierda) y medio APG + 50 ppm del AE (derecha), observados el día 8 de la prueba.

Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones utilizadas de 50 a 200 ppm tuvieron un efecto fungistático (Tabla IV y Figuras 18 a 20). La concentración correspondiente a 100 ppm disminuyó el crecimiento de *F. solani* aproximadamente un 50%. Mientras que, a 150 ppm el crecimiento fue de 30,61% y a 200 ppm de 19,07%.



Figura 18. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 100 ppm de AE de tomillo.



Figura 19. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 150 ppm de AE de tomillo.



Figura 20. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 200 ppm de AE de tomillo.

En tanto, la concentración de 250 ppm mostró efecto fungicida sobre las colonias del patógeno (Figura 21). Existen, asimismo, diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento registrado para las colonias en placas conteniendo una concentración de 50 ppm y las restantes concentraciones crecientes en comparación con la colonia testigo.

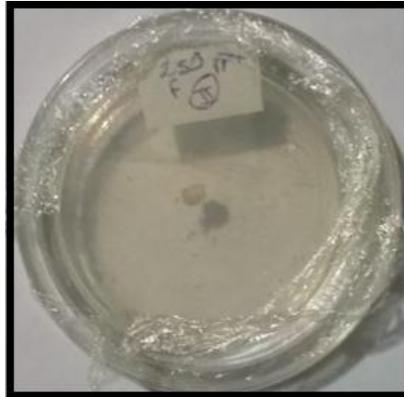


Figura 21. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 250 ppm de AE de tomillo.

Tabla IV: Crecimiento porcentual de la colonia de *P. capsici* en medio de cultivo APG conteniendo AE de tomillo en diferentes concentraciones.

0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200ppm	250 ppm	300 ppm
100	85,95	54,35	30,61	19,07	0	0
	A	B	B	B		

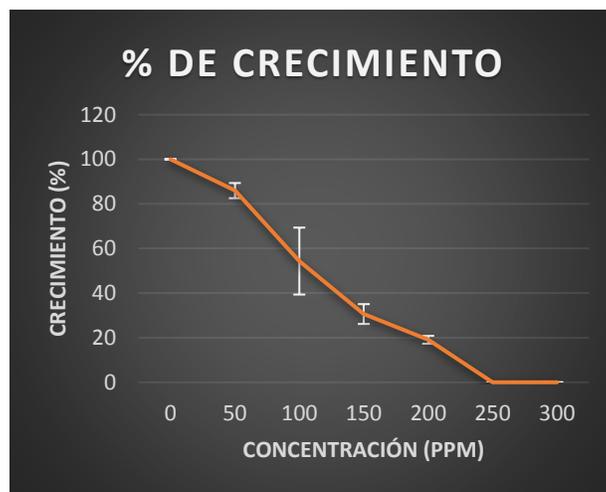


Figura 22. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *F. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

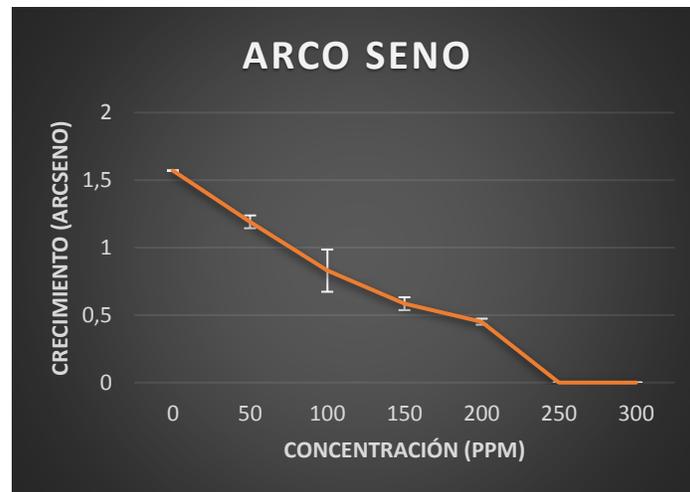


Figura 23. Crecimiento de las colonias de *F. solani*, expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

Utilizando también aceite esencial de tomillo, quimiotipo timol 22-28%, Zambonelli *et al.* (1996) mostraron que se requería una concentración de 800 ppm para lograr efecto fungicida sobre *F. solani*. La mayor concentración utilizada por Zambonelli *et al.* (1996) en comparación a la utilizada en el presente estudio (250 ppm), podría deberse a las diferencias en la composición del timol 22-28% versus 43,8 % correspondiente al AE utilizado en el presente trabajo (Tabla I).

Por otra parte, Barrera Necha y García Barrera (2008) obtuvieron una inhibición total del crecimiento de *Fusarium* spp. utilizando dosis de 200, 250 y 300 ppm de aceite esencial de tomillo. Gehan *et al.* (2014) obtuvieron una inhibición del 50% en el crecimiento de las colonias de *F. oxysporum* utilizando una concentración de 50 ppm de timol.

Scalvenzi *et al.* (2016) obtuvieron una inhibición del 35% del crecimiento micelial de *F. solani* con una concentración de 50 ppm de aceite esencial de tomillo, mientras

que utilizando concentraciones de 100, 200 y 500 ppm logró una reducción total del crecimiento.

Entre otros estudios que también utilizaron aceite esencial de distinta procedencia puede citarse el estudio realizado por Guédez *et al.* (2014) que lograron una inhibición del 80% utilizando una concentración de 100 ppm del aceite esencial de naranja, mientras que a una concentración de 250 y 500 ppm la inhibición fue del 100%. Estos resultados se obtuvieron para *F. solani* aislado de frutos de *Carica papaya* con pudrición en postcosecha. Los resultados fueron similares tanto *in vitro* como en ensayos *in vivo*.

4.3. Consideraciones finales

Los resultados mostrados permiten inferir que el efecto del aceite esencial de tomillo varía en función del tipo de hongo y la concentración de AE utilizada (Figuras 24 y 25).

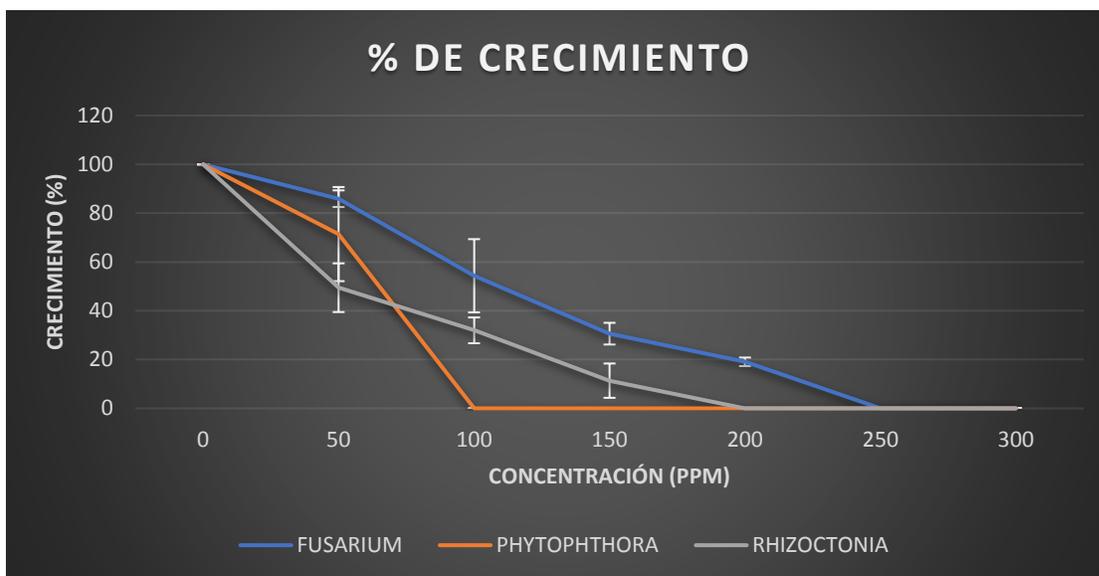


Figura 24. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *F. solani*, *P. capsici* y *R. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

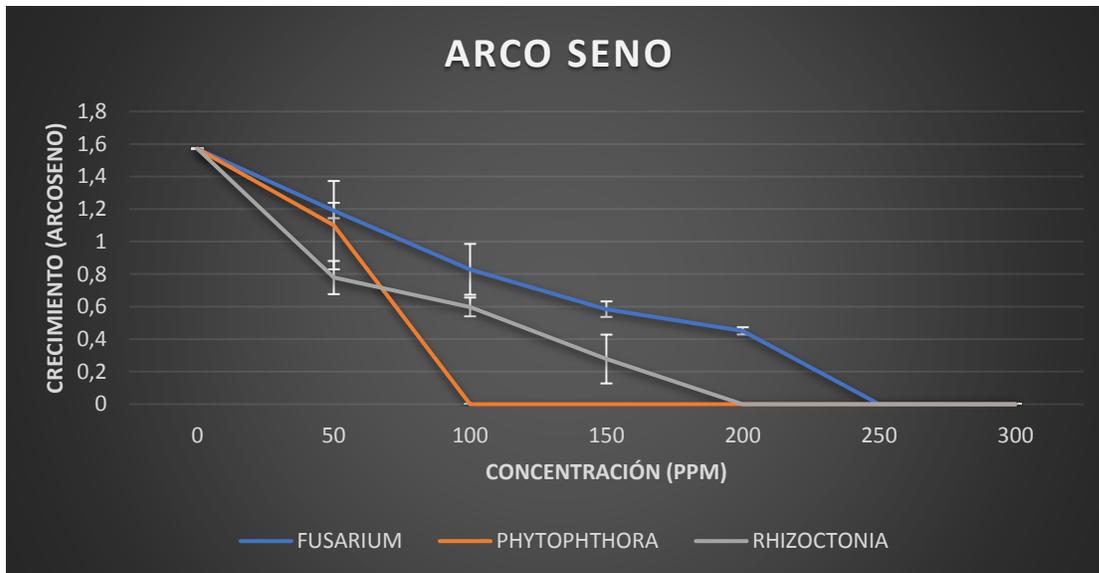


Figura 25. Crecimiento de las colonias de *F. solani*, expresado en valores transformados según la función arco seno, en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

Los resultados muestran que, en condiciones *in vitro*, la menor concentración con efecto fungicida fue requerida para el tratamiento de *P. capsici*. Mientras que fue necesaria una concentración cuatro veces superior para alcanzar el mismo efecto en el caso de *F. solani*. El motivo de las diferencias observadas, en las concentraciones con efecto fungicida y/o fungistático, en el presente estudio requiere de la realización de nuevos estudios.

Los mecanismos de acción antifúngica de los monoterpenos no son entendidos completamente. Sin embargo, varios estudios concluyeron que dada su naturaleza lipófila ejercen su acción a nivel de la membrana (Uribe *et al.*, 1985). En tal sentido, otros autores afirman que sucede un cambio en la composición de ácidos

grasos de la membrana celular (Prashare *et al.*, 2003). Los cambios que producen a nivel de la membrana pueden producir inhibición de la respiración y alteración de la permeabilidad (Cox *et al.*, 2000). Por otro lado, Zambonelli *et al.* (1996) sostienen “que el efecto fungicida se debe a la penetración de la quitina de la pared de la hifa por los daños de la membrana citoplasmática, provocando el escape de contenido citoplasmático, como consecuencia las hifas se vacían y se aplastan”. A idéntica conclusión llegaron también Caccioni y Guizzardi (1994). También Romagnoli *et al.* (2005) plantearon esta hipótesis, haciendo responsables al carvacrol y timol de este “vaciado” citoplásmico.

Mientras que, Busquet *et al.* (2005) afirman que “la actividad antimicrobial del timol es debida a la presencia de un grupo hidroxilo en la estructura fenólica. El carvacrol (que es un isómero del timol) actúa como un transportador transmembranal de cationes monovalentes por intercambio de los protones hidroxil (procedentes del grupo fenólico) por otros como el ión potasio similar al modo de acción de ionóforos. Estos eventos podrían resultar en la falta de fuerza móvil de un protón, consecuentemente un detrimento en la síntesis de ATP y finalmente la célula muere, siendo esta la posible forma como actúen los extractos obtenidos del tomillo sobre *P. palmivora*”.

Gehan *et al.* (2014) realizaron un estudio para evaluar el modo de acción del timol. Para lo cual aislaron las enzimas Pectina Metil Esterasa (PME), Celulasa y Polifenol Oxidasa (PPO) de *F. oxysporum* y *R. solani* por separado y observaron el comportamiento al colocarlas en contacto con el monoterpeno timol. Los resultados indicaron una inhibición de la actividad de las Pectina Metil Esterasa

(PME) y Celulasa, pero no de la Polifenol Oxidasa (PPO). También observaron que el grado de inhibición varía no solo con la enzima sino también con el patógeno del que fue aislada. Goodman *et al.* (1967) sostiene que el timol y el (S)-limoneno inhiben las celulasas del hongo que son de suma importancia para degradar las paredes del hospedante durante la patogénesis. Al igual que Gehan *et al.* (2014) concluyó que estos compuestos inhiben además a la Pectina Metil Esterasa, enzima encargada de modificar el grado de metilesterificación de las pectinas de la pared celular de los hongos. Como consecuencia sostiene que se destruye la integridad de las células, se modifica el pH, los contenidos iónicos y permeabilidad de la membrana. Entonces la Pectil Metil Esterasa y la celulasa son blanco de los monoterpenos (Gehan *et al.*, 2014).

Sumado a estos resultados, Montes *et al.* (2000) sostienen que los aceites esenciales afectan no solo al desarrollo y crecimiento del micelio, sino también la germinación de esporas, la formación de estructuras de penetración y la esporulación.

5. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten enunciar las siguientes conclusiones:

- El aceite esencial de *T. vulgaris* (tomillo) posee efecto fungistático y fungicida para los 3 patógenos fúngicos evaluados en condiciones *in vitro*.
- El efecto del aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de las colonias fúngicas fue dependiente de la concentración y del patógeno evaluado.

- El patógeno fúngico *P. capsici* requirió menor concentración de aceite esencial para ser inhibido (100 ppm), seguido de *Rhizoctonia solani* (200 ppm) y por último *Fusarium solani* (250 ppm).
- El empleo de aceites esenciales podría ser una alternativa viable en el control de fitopatógenos fúngicos de suelo. Sin embargo, es necesario realizar ensayos *in vivo* evaluando estos y otros fitopatógenos.
- La capacidad antifúngica se atribuye principalmente al Timol, por lo que este monoterpeno podría ser utilizado en la elaboración de nuevos principios activos con actividad fungistática y/o fungicida.
- El modo de acción es poco conocido. Sin embargo, estudios previos señalan una alteración de la permeabilidad de la membrana e inhibición de enzimas como principales causas de la capacidad antifúngica del aceite esencial.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Quinta Edición. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 922.

Aizawa, S., Seto, H., y Otaka, N. (1982). Capsimycin, an antibiotic active against phytopathogenic fungi. Kyoto: First International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC).

Alexopoulos, C. J., Mins, C. W. y Blackwell M. (1996). Introductory mycology. John Wiley y Sons, Inc. USA. 869 pp.

- Angus, J. F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. y Desmarchelier, J.M. (1994). Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassicaroots inhibit growth of the take - all fungus. *Plant and Soil*, 162, 107-112.
- Ansani, C.V. y Matsuoka, K. (1983). Sobrevivencia de *Phytophthora capsici* no soo. *Fitopatología Brasileira*, 8 (2): 269-279.
- Archila Calderón, J. A. (2008). Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores, hojas y tallos de Ylang-Ylang, y determinación de los ácidos grasos en sus semillas. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química. Bucaramanga.
- Bajpai, V.K., y Kang, S.C. (2012). In vitro and in vivo inhibition of lant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia lilifloradesr*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(4), 845-856.
- Bajwa, R., Kjalidy, A. y Cheema, T.S. (2003). Antifungal activity of allelopathic plant extracts. III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 2: 145-156.
- Baldry, M. G. C. (1982). The bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology* 54:417-423.
- Barrera Necha, L.L. y García Barrera, L.J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp*. Aislado de papaya (*Carica papaya*). Centro de desarrollo de Productos

- Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla Km. 8.5. San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62731 Y Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac Tepetitla Km 1,5 Tepetitla, Tlaxcala, México CP 90700.
- Başer, K. y Buchbauer, G. (2010). Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. CRC Press. Boca Raton, FL. 118 p.
- Bautista, B.S., Montes, B.R. y Evangelista, L.S. (1998). Inhibición del desarrollo micelial y esporulación de *Pestalotiasp.* Mediante el uso de extractos vegetales. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Guanajuato, Guanajuato, México. Pp. 23.
- Bazan, C. (1958): La marchitez o wilt del aji en el Perú. Informe N°105, 19 p. Estación Experimental Agrícola de "La Molina", Lima (Perú).
- Belanger, R., Dufour, N., Caron, J. y Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science Technology 5: 41-54.
- Bello, A. (1998). Biofumigation and integrated pest management. Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries (pp. 99-126). Phytoma, España, DG XI EU, CSIC, Valencia, Spain.

- Bello, A., López-Pérez, J.A., Díaz-Viruliche, L., Sanz, R. y Arias, M. (2000). Biofumigation and local resources as methylbromide alternatives. *Nematrópica*.
- Benavides-Mendoza, A., Ramírez, H., Robledo-Torres, V. y Hernández-Dávila, J. (2004). El efecto de tres fumigantes de suelo y dos cepas de bacterias sobre la productividad de fresa (*Fragaria x ananassa*). Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo 25315 Coah. México.
- Bergeron, C., Marston, A., Hakzamungu, E. y Hostettmann, K. (1995). Antifungal constituents of *Chenopodium procerum*. *International Journal of Pharmacognosy* 33: 115-119.
- Blackwell, E. (1943). The life history of *Phytophthora cactorum* (Leb y Cohn) Schroet. *Trans. British Mycological Society* 26: 71-103.
- Blanco-Padilla, A., Soto, K.M., Hernández Iturriaga, M. y Mendoza S., (2014). "Food antimicrobials nanocarriers".
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Kew. Commonwealth Mycological Institute.
- Bravo, L.L., Bermúdez, T.K. y Montes, B.R. (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas* 57: 29- 34.
- Bravo-Luna, L., Bermúdez Torres, K. y Montes Belmont, R. (1998). Growth mycelial inhibition and sporulation of *Fusarium moniliforme* held by plant

- essential oils and some their chemical components. *Mex. J. Phytopathol.* 16(1):18-23.
- Bruni, R., A. Medici, E. Andreotti, C. Fantin, M.V. Muzzoli, M. Dehesa, C. Romagnoli y G. Sacchetti (2004). Chemical composition and biological activity of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocoteaquixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 85: 415-421.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*.
- Caccioni, D.R.L. y Guizzardi, M. (1994): Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent., Oil Res.* 6, 173-179.
- Camele, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini, E. y Rana, G.L. (2012). In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Science* 13 (2): 2290-2300.
- Carlile, M.J. (1966): The orientation of zoospores and germ tubes, 175-187. En Madelin, M.F., *The Fungus Spore*. Butterworths, London.
- Carling, D., Kuninaga, S. y Brainard, K. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA Internal Transcribed Spacer Sequences, and virulence levels among

- subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*. 92(1):43-50.
- Carrillo, Y.A., Gómez, M.I., Cotes, J.M. y Núñez, C.E. (2010). Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio Agron. Colomb., Volumen 28, Número 2, p. 245-253, 2010. IISN electrónico 2357-3732. ISSN impreso 0120-9965.
- Castro, C., Davis, J.R. y Wiese, M.V. (1983). Differential medium for identification of *Rhizoctonia solani* AG-3. *PlantDis*. 67: 1069-1071.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H y García R. (2001). Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kuhn asociados con papa en Mérida, Venezuela Inci v.26 n 7 Caracas.
- Ceresini, P. (1999). *Rhizoctonia solani*. Pathogenprofile. CIP. Centro Internacional de la Papa. 1996. Principales enfermedades, nemátodos e insectos de la papa. Lima, Perú. p. 42.
- Chapman, J. S. (1998). Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation Journal* 41:241–245.
- Charudattan, R. y De Loach, C.J. (1988). Management of pathogens and insects for weed control in agroecosystems. p. 245-264. En M.A. Altieri and M. Liebman (eds.). *Weed management in agroecosystems. Ecological approaches*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

- Cheng, S.S., Liu, J.Y., Huang, C.G., Hsui, Y.R., Chen, W.J. y Chang, S.T. (2009). Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum mosmophloeum* against three mosquito species. *Bioresource Technology* 100: 457-464.
- Chet, I. e Ibar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry y Biotechnology* 48: 37-43.
- Chew Madinaveitia, Y.I., Vega Piña, A., Plomo Rodríguez, M. y Jiménez Díaz, F. (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico Número 15. Campo Experimental la Laguna. Matamoros, Coahuila, México.
- Chitwood, D.E. y Deshusses, M.A. (2001). Development of a methyl bromide collection system for fumigated farmland. *Environ. Sci. Technol.* 25, 636-642.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American phytopathological society. St. Paul, Min. 539 pp.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L, Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. y Wyllie, S.G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *J. Appl. Microbiol.* 88. Pp: 170–175.

- Cruz, O.J., Montoya, A.S., Estrada, R.F. y Castro, C.J.M. (1999). Extractos vegetales para el control de vectores de enfermedades virales en calabacita en Culicán Sinaloa. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. Resumen 306.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. y Polissiou, M.G. (2003). The Effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibactermichiganensis subsp. Michiganensis*. Crop Protection. 22:30-44.
- Deans, S.G. y Svoboda, K.P. (1990). The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.). FlavourFragranceJournal 5:187-190.
- Desjardines, A.E. (2006). *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS, St. Paul.
- Dhingra, O.D., Costa, M.L.N., Silva Jr, G.J. y Mizubuti, E.S.G. (2004). "Essential Oil of Mustard to control *Rhizoctonia solani* Causing Seedling Damping-off and Seedling Blight in Nursery", FitopatologíaBrasileira 29: 683-686.
- Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Vol 1. Academic Press. New York. p. 795-809.
- Duhamel, H. L. (1728). Explication physique d'umemaladie Que fait perirplusieursplantesdans le gatinois et particulierment le sefra'n. Hist. Acad. Roy. Sci. Paries. 100-112.

Duniway, J.M. (1983): Role of Physical Factors in the Development of *Phytophthora* Diseases. 175-187. En Erwin, D.C.; Brtnicki-García, S. y Tsao, P.H., *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. Ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

Eklund, T. (1989). Organic acids and esters. En: G.W. Gould (Ed). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science. Londres, pp. 161-200.

Elenkov, E. y Bakharieva, V. (1975): Mildew, *Phytophthora capsici*, a dangerous disease of pepper in Bulgaria. *Rastit. Zash.*, 23: 31-35.

El-Zemity, S.R., y Ahmed, S.M. (2005). Antifungal activity of some essential oils and their major chemical constituents against some phytopathogenic fungi. *Journal of Pest Control and Environmental Science*, 13, 61-72.

EOL. S.D. Disponible en:

<http://eol.org/>

Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562 pp.

Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M.E., Rubio, L. y Candela, M.E. (2004). Biocontrol por *Streptomycesrochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicumannuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78, 2004. Departamento de Biología Vegetal, Facultad

de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100-Espinardo.

FAO, (2012). El pacto mundial contra las plagas de las plantas.

Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>

Farag, R.S., Daw Z.Y. y Abo-Raya S.H. (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins on a synthetic medium. J. Food Sci. 54: 74-76.

Fernández, O. y Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas (Costa Rica). N° 62: 96-100.

Fonnegra, R. y Jiménez S. (2006). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia.

Frayre, S.L., Domínguez A.A.D., García, A.B. y Sánchez, H.H.A. (1996). Evaluación de extractos vegetales para el control de la mancha negra *Phytophthora sp.*, en el cultivo de pepino. Memorias del IX Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria; INIFAP-Produce, publicación especial N° 9. Villa Hermosa, Tabasco, México. Pp. 61-68.

Gaona, E.B. (2007). Hongos asociados con la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en la Comarca Lagunera. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agrarias. Antonio Narro-Unidad Laguna. 46 p.

García Morato, M. (1996). Enfermedades fúngicas, bacterianas y fisiopatías. En Namesny, A. (Ed.). Pimientos. 59-66. Madrid: Ediciones de Horticultura S. L. Reus.

- García y Pérez Urria-Carril (2009). Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009. ISSN: 1989-3620.
- García, J. M. D., Shagarodsky, T., Fresneda, J. A., Fundora, Y. H., y González, J. (2007). Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicerarietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. Temas de Ciencia y Tecnología 32 (11), 63–66.
- Gehan, I.K., Marei,A., Mona, A., Abdel Rasoul, A., Samir, A.M. y Abdelgaleil (2014). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi.
- Gil, P. (2002). Productos naturales. Universidad Pública de Navarra. España.
- Giraud, T., E. Fournier, D. Vautrin, M. Solignac, E. Vercken, B. Bakan y Y. Brygoo (2002). Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes* 2: 121-123.
- Gogoi, P., Baruah, R.P. y Nath, S.C. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. *J. Essential Oils Res.* 9:213-215.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. y Chatpar, H. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afric. J. Biotechnol.* 5:54-72.

- González, I. (1989). Introducción a la Fitopatología, Servicio editorial UCA, San José de Costa Rica.
- González García, M. (2008). Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 N° 514. Playa, Ciudad de La Habana.
- González, M.M., Torres, P. y Guzmán, M. (2002). Patógenos involucrados en la marchitez del chile. In: Proceedings of the 16 th International Pepper Conference. Tampico, Tam. México. November 10-12.
- González, S.F.A. y Guevara, M.M.M. (1990). Determinación de la persistencia de la actividad bactericida de la resina de *Larrea tridentata* sobre *Pseudomonas solanacearum* en laboratorio e invernadero. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa México. P. 107.
- González-Chavira, M.M., Torres-Pacheco, I. y Guzmán Maldonado, H. (2002). Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de chile. Tampico: Proceedings of the 16th International Pepper.
- González-Hernández, D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Departamento de sistemática vegetal, Instituto de Ecología, A.C. Apdo. Postal 63, Xalapa, Veracruz CP 91000. Volumen 20, Número 2.

- Goodman, R.N., Kiraly, Z. y Zaitlin, M. (1967). *The Biochemistry and Physiology of Infectious Plant Diseases*, D Van Nostrand Co. Inc. Princeton, New Jersey. P: 354.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Avendaño, L., Scorza, J., Castillo, C., Olivar, R., Méndez, Y. y Sánchez, L. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.).
- Guerrero -Aguilar, Z., Sánchez-Delgadillo, F., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R.G., Torres-Pacheco, I. y González-Chavira, M.M. (2001). Caracterización de aislados mexicanos de *Rhizoctonia solani* (Kuhn). Querétano: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
- Guerrini, A., G. Sacchetti, D. Rossi, G. Paganetto, M. Muzzoli, E. Andreotti, M. Tognolini, M. Maldonado y B. Bruni. (2009). *Bioactivities of Piper aduncum L. and Piper obliquum Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology 27: 39-49.*
- Gullino, M.L., Minuto, A. y Garibaldi, A. (2002). MededRijksuniv Gent FakLandbouwkDoegepBiol Wet 67 (2002) 171.
- Gutiérrez, A. (1996). Control biológico de hongos fitopatógenos. En: *Implantación de huertos de manzanos, bases para el manejo orgánico. Manual Carillanca N°78. INIA, CRI Carillanca.*

- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito. M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology. Vol. 2. January.
- Hartz, T.K., DeVay, J.E. y Elmore, C.L. (1993). HortScience 28 (1993) 104.
- Hausbeck, M.K. y Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *PlantDisease* 88:1292–1303.
- Hawksworth, D. L. (1991). “The fungal dimension of biodiversity, magnitude, significance and conservation”, *Mycological Research*, vol. 95, pp. 641-655.
- Hickman, C.J. (1970). Biology of *Phytophthora* zoospores. *Phytopathology*, 60: 1128-1135.
- Himelrick, D.G. y Dozier Jr., W.A. (2003). Commercial production strawberry. Published by the Alabama Cooperative Extension System Reprinted, May 2003, ANR-0633.
- Hwang, B.K., Lee, J.Y., Kim, S. y Moon, S.S. (2001). Isolation and in vivo and in vitro Antifungal activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces Humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3739-3745.
- Inbar, J., Abramsky, M., Kohen, D. y Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Eur J Plant Pathol* 100: 337-346.

- Insunza, B.V. y Valenzuela, A.A. (1995). Control of *Ditylenchus dipsaci* on garlic (*Allium sativum*) with extracts of medicinal plants from Chile. *Nematropica* 25:35-41.
- Jayashree, T. y Subramanyam, C. (1999). Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Let. Appl. Microbiol.* 28: 179-83.
- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R. y Samiyappan, R. (2004). Physiological and molecular plant pathology. 65: 91-100 p.
- Kalemba D. y Thiem B. (2004). Constituents of the essential oils of four micropropagated *Solidago* species. *FlavourFragr.J.* 19 40–43.
10.1002/ffj.1271
- Karavina, C. y Mandumbu, R. (2012). Phytoparasitic nematode management post-methyl bromide: where to for Zimbabwe? *International Journal of Agricultural Technology* 8:1141-1160.
- Khaledi, N., Taheri, P. y Tarighi, S. (2015). Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens.
- Kim, B.S., Moon, S.S. y Hwang, B.K. (1999). Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 47: 3372-3380.
- Kirkegaard, J.A., Gardner, J., Desmarchelier, J.M. y Angus, J.F. (1993). Biofumigation using *Brassica* species to control pest and diseases in

- horticulture and agriculture. In N. Wrather; R. J. Mailes (Eds). Proc. 9th Australian Research Assembly on Brassicas (Wagga Wagga) .77-82.
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International* 30:47-55.
- Kuhn, J. G. (1858). Die Krankheiten der kulturgewaches, ihreursachen und ihreverhütung. Berlin. Besseemann.
- Lagos La Rosa, E.R. (2012). Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman-TACNA. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica. Tesis. PERÚ.
- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J. y Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13 (4):329-337 doi: 10.1111/J. 1364-3703.2011.00754.
- Latorre, B. (1999). Enfermedades de las plantas cultivadas. Alfaomega grupo editor. México 37 731-738.
- Lazar E. E., Jobling J. J. y Benkeblia N. (2010). Postharvest disease management of horticultural produce using essential oils: today's prospects. *Stewart Postharvest Rev.* 61–9. 10.2212/spr.2010.3.15.
- Leonian, L.H. (1922): Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. *Phytopathology*, 12 (9): 401-408.

- Lindquist, J.C. (1932): Sobre la presencia de la *Phytophthora capsici* en la Rep. Argentina. *Physis.*, 11: 170-171.
- Lizcano González, M.C. (2007). "Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*". Microbiología agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.
- Lomelí, R.M.G. y Ochoa, R.H.G. (1999). Evaluación fungicida del extracto de mesocarpio de *Coco nucifera* Linn. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara Jalisco, México. Resumen 10.
- López, A. G., (2006). Regulación de Componentes de Aceites esenciales sobre la Toxicogénesis de *Fusarium verticillioides*. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ICTA. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- López-Báez, O, Ramírez-González, S.I., Ramírez-González, M., González-Mejía, O., Espinosa-Zaragoza, S. y Villarreal-Fuentes, J.M. (2009). Extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmivora* (Butler) en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Quehacer Científico en Chiapas* 2009 1(8) 44-51.
- Luginbuhl, S. (2010). *Fusarium solani*. A class Project for PP728 Soilborne Plant Pathogens Fall 2010.

- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. Annual review of microbiology, 67, 399–416.
- Malaguti, G. y Pontis, R.E. (1950): *Phytophthora capsici* in Venezuela. Estratto dalla Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale, 1-3, 12 p.
- Marei, G., Rasoul, M.A. y Abdelgaleil, S.A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. PesticBiochem Physiol. 103:56-61.
- Mármol, J. R. (2010). Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Sevilla. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Martin, F.N., Abad, Z.G., Balci, Y e Ivors, K. (2012). Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *PlantDisease*96 (8):1080-1103.
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales, Universidad de Antioquia, Facultad Química Farmacéutica, Medellín. Febrero, 2003.
- Matthiesen, J. N. y Kirkegaard, J.A. (1993). Biofumigation, a new concept for 'clean and green' pest and disease control. Western Australian Potato Grower. October, 14 -15.
- Meepagala, K. M., Sturtz, G. y Wedge, D.E. (2002). Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. J. Agric. Food Chem. 50: 6989-6992.

- Mehmet, K. (2003). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environmental International* 30:47-55.
- Mehra L., MacLean D., Shewfelt R., Smith K. y Scherm H. (2013). Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85 109–115. 10.1016/j.postharvbio.2013.05.007.
- Mercado, Z.F.J. y Rosado, M.F.J. (1986). Efecto de compuestos orgánicos liberados por *Cyperusrotundus*L. sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. Memorias del XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. p. 55.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. y Hosseini, S. (2015). Chitosan nanoparticles loaded whit Cinnamomum zeylanicum essential oil enhanced the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology.* 110: 203-213.
- Monterroso, L. (2015). El suelo y las enfermedades de las plantas. Fitopatología Facultad de Agronomía UNICEN. Centro de investigaciones sobre Sistemas Agronómicos Sustentables (NACT CIISAS).
- Montes, B.R., Cruz, C.V. y Madrigal, D.P. (1990). Control de la roya del frijol mediante extractos vegetales bajo condiciones de campo en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa, México. p. 104.

- Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúdez, K., Flores, H.E. y Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas de plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 125-131.
- Muchovej, J.J., Maffia, L.A. y Muchovej, R.M.C. (1980): Effect of exchangeable soil aluminum and alkaline calcium salts on the pathogenicity and growth of *Phytophthora capsici* from green pepper. *Phytopathology*, 70 (12): 1212-1214.
- Muller, M.F., Berger, B. y Yegen, O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties of phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (8): 2262-2266.
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., y Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 20(3), 174–178.
- National Academy of Sciences. (1980). Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Control de Plagas de plantas y animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pp.
- Nelson, P. E., Tousson, T. A. y Marasas, W. F. O. (1990). *Fusarium species*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.

- Nychas, G.J.E. (1995). Natural antimicrobials from plants. En *New Methods of Food Preservation*. GW Gould (Ed.). Blackie Academic and Profesional. Glasgow. Escocia pp. 58-89.
- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology* 25: 125-143.
- Palazón, C. (1988): Estudio de los posibles métodos de control de la “Tristeza” o “Seca” del pimiento. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 231 p.
- Palazón, C. y Palazón, I. (1989). Estudios epidemiológicos sobre la “tristeza” del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Bol. San. Veg. Plagas*, 15:233-262, 1989.
- Parish, M.E. y Davidson, P.M. (1993). Methods of evaluation. En *antimicrobials in foods*. PM Davidson y AL Branen (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York. EUA. Pp 597-615.
- Parmeter, J.R., Sherwood, R.T. y Platt, W.D. (1969). Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59: 1270-1278.
- Passardi F., Penel C. y Dunand C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall.
- Pavon, C. y Babadoost, M. (2006). Determining density of *Phytophthora capsici* oospores in soil. Department of Crop Sciences, University of Illinois 1102 S.

- Perdones A., Sánchez-González L., Chiralt A. y Vargas M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry.
- Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C. y Ubera, J.L. (2007). Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and the chemical composition of *Thymus zygis* essential oils. *Food Sci. Tech. Int.* 13(5):341-347.
- Piñol, M. (2001). Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas, citado por Ascon-bieto, J. y Talon, M. *Fundamentos de biología vegetal. Introducción al metabolismo secundario.* S.I.: Mc Graw Hill Interamericana. NY USA. 261-262 p.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Couladis, M. y Verykokidou, E. (1999). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera subsp. calycina* growing wild in Greece. *J. Essential Oil Res.* 11:655-659.
- Pope, E.J. y Carter, D.A. (2001). Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isoates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* 93: 712-719.
- Prado, G., Correa, F., Aricapa, M. y Escobar, F. (2001). Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). *Foro Arrocerero Latinoamericano.* 7(1):8-11.
- Prashar, A., Hili, P., Veness, R.G. y Evans, C.S. (2003). Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry.* Pp: 569–575.

- Qasem, J.R. y Abu-Blan, H.A. (1996). Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. *Journal of Phytopathology* (Berlín) 144:157-161.
- Quintero, S.R., Gioanetto, F., Chávez, C. E. y Bárcenas, O.D. (eds.) (2001). *Curso Taller de Agricultura Orgánica*. Universidad Autónoma de Chihuahua. CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua. 227.p.
- Ramírez, J. y Romero, S. (1980): Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leon., agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia*, 39: 9-18.
- Ramírez-Legarreta, M.R y Jacobo-Cuellar, J.L. (2002). Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 168-173.
- Rasooli, I. y Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 66(24):2851-2856.
- Remsing, L., González, A.M., Nur-e-Alam, M., Fernández-Lozano, M.J., Braña, F., Rix, U., Oliveira, M.A., Méndez, C., Salas, J.A. y Rohr, J. (2003). Mithramycin SK, a novel antitumor drug with improved therapeutic index generated by combinatorial biosynthesis in the mithramycin producer *Streptomyces Argillaceus*. *Journal American Chemistry Society* 125: 5745-5753.
- Resh, H.M. (1992). *Cultivos hidropónicos*. Tercera edición. Madrid, España. 369 p.

- Rico-Guerrero, L., Guerrero-Aguilar, B.Z., López-Vázquez, A., Muñoz-Sánchez, C.I., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R.G., Torres-Pacheco, I. y González Chavira, M.M. (2001). Búsqueda de resistencia natural en plantas de chile (*Capsicum*spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Querétaro: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
- Ristaino, J.B. (2003). *Phytophthora*blight. In: K. Pernezny et al. (eds.) Compendium of pepper diseases. APS Press. Pp. 17-19.
- Rivera, J. M. N. (2009). Marchitez del chile poblano (*Capsicum*annuum L.): identificación molecular del agente causal, detección en semillas, histopatología y alternativas de control. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, 98 p.
- Rodriguez, B.H.R., Torres, E. y Sanabria, G.A. (1999). Actividad de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. Resumen 139.
- Rojas Armas, J., Ortiz Sánchez, J., Maldonado, J.J., Quiroz, J.R. y Román, R.A. (2015). Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo) su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema.

- Romagnoli C., Bruni R., Andreotti E., Rai M., Vicentini C. y Mares D. (2005). Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetespatula* L.
- Rovira, A.D., Ogoshi, A. y McDonald, H.J. (1986). Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* from cereal roots in South Australia and New South Wales. *Phytopathology* 76: 1245-1248.
- Rubio, R. G., Baltodano, S. F., Abanto, C. L., Wilson, K. J. y Muñoz, R. M. (2008). Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas.
- Saksena, H.K. y Vaartaja, O. (1961). Taxonomy, morphology, and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from forest nurseries. *Canad. J. Bot.* 39:627-647.
- Salazar, H.F., García, E.R. y Tlapal, B.B. (1990). Evaluación de residuos de las plantas de gobernadora *Larrea tridentata* y epazote *Chenopodium ambrosioides* L. sobre los hongos *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* en frijol *Phaseolus vulgaris* L. Memorial del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa, México. p. 102.
- Sanabria, N., Guadarrama, A. y Romero, H. (2002). Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia.* 28:161-173.

Sánchez-León, G., A. Vargas-Rincón y P. Jiménez (2015). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanusraphanistrum* L. sobre tres hongos fitopatógenos. *Bioagro* 27(1): 3-10.

Savage, E.J., Clayton, C.W., Hunter, J.H., Brenneman, J.A., Laviola, C. y Gallegly, M.E. (1968): Homotalisme, heterotalisme and interspecific hybridation in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology*, 58: 1004-1021.

Scalvenzi L., Yaguache-Camacho, B., Cabrera- Martínez, P. y Guerrini, A. (2016). Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocoteaquixos* (Lam.) Kosterm. Y *Piperaduncum* L.

Schlub, R.L. (1983): Epidemiology of *Phytophthora capsici* on bell pepper. *Journal of Agricultural Science*, 10 (1):7-11.

Schneider, S.M., Roskopf, E.N., Leesch, J.G., Chellemi, D.O., Bull, C.T. y Mazzola, M. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest. *Pest Manag Sci* 2003. Jun-Jul; 59 (6-7): 814-26.

SENASA. (1958). Decreto Ley 3489 -1958. Disponible en:

<http://www.senasa.gob.ar/normativas/decreto-ley-nacional-3489-1958-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

SENASA, 2003. Disposición 5-2003 SENASA. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/disposicion-5-2003-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

SENASA. (2006). Bromuro de metilo. Resolución 77-2006. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/tags/bromuro-de-metilo>

Shaw, R.A. y Larson K.D. (1999). A meta-analysis of strawberry yield response to preplant soil fumigation with combinations of methyl bromide-chloropicrin and four alternative systems. Hort Science 34:839-845.

Sid Ahmed, A., Pérez Sánchez, C. y Candela, M.E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European journal of Plant Pathology 106: 817-824.

Slooten, (1997). Thermal components of soil solarization as selected to changes in soil and root microflora and increased plant growth response. Phyto-pathology, 74 (3), 255- 259.

Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1998). Identification of *Rhizoctonia* Species. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. pp. 135.

Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. y Dijst, G. (1996). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 578 p.

- Sokovic, M.D., Vukojevic, J., Marin, P.D., Brkic, D.D., Vajs V. y Van Griensven, L. (2009). Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and their Antifungal Activities. *Molecules* 2009, 14(1), 238-249.
- Soliman, K.M. y Badeaa, R.R. (2002). Effect of oil extract from some medicinal plants on different mycotoxicogenic fungi. *FoodChem. Toxicology*. 40:1669-75.
- Solís Campoverde, P.N. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia Riobamba-Ecuador.
- Soto-Mendivil, E.A., Moreno-Rodriguez, J.F., Estarrón-Espinosa, M., García-Fajardo, J.A. y Obledo-Vázquez, E.N. (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. Vol. 4, Art. 16.
- Souza Prestes, L., Frascolla, R., Santín R., Ziemann dos Santos, M.A., SChram, C.R., Alves Rodrigues, M.R., DaméSchuch, L.F., Araújo Meireles, M.C. (2015). Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa.
- Sumalan, R. M., Alexa, E. y Poiana, M. A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–12.

- Thomas, W. (1997). Impacto ambiental del bromuro de metilo. Alternativas al Bromuro de Metilo en Agricultura (pp.13-18). Junta Andalucía, Sevilla, España.
- Tierney, G. (2000). The use of solarization against *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions in Liguria. *Informatore Fitopatológico*, 39, 43-45.
- Tjamos, E.C. y Beckman, C.H. (1989). Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control. En: NATO ASI Series H: Cell Biology, Vol. 28.
- Tovar Castaño, J.C. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.
- Tsao, R. y Zhou, T. (2000). Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*, *J. Essential Oil Res.* 12. 113–121.
- Tucker, C. M. (1931): Taxonomy of the Genus *Phytophthora* de Bary. *Res. Bul.*, 153, Missouri Agri. Exp. Sta.
- Uribe, S., Ramirez, J. y Pena, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions, *J. Bacteriol.* Pp: 1195–1200.
- Velásquez, M.A., Álvarez, R.M., Tamayo, P.J. y Carvalho, C.P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium sp.*

- Velásquez, V.R. y Medina, M.M. (2003). La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. I. Estudios básicos. Folleto Científico N°14. SAGARPA-INIFAP-CIRNOC-Campo experimental Pabellón. Aguascalientes. 26 p.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J. y Marín, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microb.* 89: 145-154.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H.A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J.M. y Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* Y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agron.*, Volumen 64, Número 2, p. 194 - 205, 2015. ISSN electrónico 2323-0118. ISSN impreso 0120-2812.
- Vokou, D., Kokkini, S. y Bessiere, J.M. (1993). Geografic variation of Greek orégano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.* 21:287-95.
- Wagacha, J. M., y Muthomi, J. W. (2007). *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877–885.
- Weber, G.F. (1932). Blight of peppers in Florida caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopath.*, 22: 775-780.
- Weste, G. (1983). Population Dynamics and Survival of *Phytophthora*. 237-257.

- Whalen, M.M., Wilson, S., Gleghorn, S. y Loganathan, B.C. (2003). Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environmental Research* 92: 213-220.
- Wilson, C.L., Solar, J.M, El Ghaouth, A. y Wisniewski, M.E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 204-210.
- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. (1999). Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.
- Yuce, E.K., Yigit, S. y Tosun, E. (2011). Efficacy of solatization combined with metam sodium and hydrogen peroxide in control of *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici subsp. Michiganensis* in tomato greenhouse. *Acta Horticulturae* 914: 385-392.
- Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z; Severi, A. y Benvenuti, S. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research*. 16:69-74
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A. y Albasini, A. (1996). Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi In Vitro. Dipartimento di Protezione e Valorizzazioni Agroalimentare, Università di Bologna, Italy.
- Zapata, R., Sababria, M. y Rodriguez, D. (2003). Reducción del desarrollo de Hongos Fitopatógenos con extracto de cardón lefaria. *Interciencia* mayo, año/vol. 28, número 005. Caracas Venezuela. Pp. 302-306.

Zekaria, D. (2008). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier.

Zheng, W., Papiernik, S.K., Guo, M. y Yates, S.R. (2003). Accelerated degradation of methyl iodide by agrochemicals. J Agric Food Chem 51 (3): 673-679

7. ANEXO

7.1. Cálculo de las concentraciones a evaluar.

Para el cálculo de la concentración a evaluar utilizamos una densidad de AE de tomillo de 0,9225 g/mL (Lagos La Rosa, 2012).

Las mediciones las realizamos utilizando una micropipeta.



Figura 26. Micropipeta. Laboratorio de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias. Foto: L. R. Casacchia.

- Para 50 ppm diluimos 5,425 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.
- Para 100 ppm diluimos 10,85 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.
- Para 150 ppm diluimos 16,275 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.
- Para 200 ppm diluimos 21,7 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.
- Para 250 ppm diluimos 27,125 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.
- Para 300 ppm diluimos 32,55 μ L de AE de tomillo en 100 mL de APG.



Figura 27. Aceite esencial (AE) de tomillo puro. Foto: L. R. Casacchia

7.2. Mediciones.

La medición del diámetro del micelio de cada hongo a cada concentración se realizó todos los días desde la siembra hasta el día 8 utilizando un Vernier.

Para calcular el % de crecimiento realizamos el siguiente cálculo:

$$(D_T - S) \text{ -----} 100\%$$

$$(MD - S) \text{ -----} C =$$

D_T = Diámetro total de la caja de Petri en cm.

S = Micelio sembrado el día 1 en cm.

MD = Medición diaria en cm.

C = Crecimiento.

La inhibición del crecimiento la calculamos como:

$$I = 100\% - C$$

I = Inhibición en porcentaje.

Para 0 ppm (testigo):

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>		<i>Fusarium</i>		<i>Phytophthora</i>	
		Diám. (cm)	% CREC	Diám. (cm)	% CREC	Diám. (cm)	% CREC
1	20/04/2017	0,5	0,0	0,5	0,0	0,4	0,0
2	21/04/2017	1,8	23,6	1,1	10,0	0,4	0,0
3	22/04/2017	2,3	32,7	2,3	33,0	0,6	4,9
4	23/04/2017	2,9	43,6	3,0	46,0	1,7	24,3
5	24/04/2017	3,3	50,0	4,1	66,0	3,1	49,5
6	25/04/2017	5,4	89,1	6,0	100,0	3,7	59,2
7	26/04/2017	5,6	92,7	6,0	100,0	4,8	78,6
8	27/04/2017	6,0	100,0	6,0	100,0	6,0	100,0
Diámetro total		6,0		6,0		6,0	

Tabla V. Medición diaria del micelio de cada hongo para 0 ppm de AE de tomillo.

Para 50 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	11/05/2017	0,7	0,5	0,5	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7
2	12/05/2017	0,7	1,0	1,0	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7
3	13/05/2017	1,0	1,3	1,1	1,4	1,2	1,0	0,6	0,7	0,8
4	14/05/2017	1,3	2,0	1,5	1,9	1,6	1,4	0,6	0,7	0,9
5	15/05/2017	1,5	3,2	2,1	3,0	2,5	2,2	0,6	1,0	0,9
6	16/05/2017	2,1	3,6	2,9	4,3	4,0	3,9	0,6	2,2	3,0
7	17/05/2017	2,2	3,8	3,1	4,6	4,2	4,1	1,0	3,0	3,5
8	18/05/2017	2,3	4,0	3,5	5,0	4,5	4,5	2,3	4,5	4,5
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla VI. Medición diaria del micelio de cada hongo para 50 ppm de AE de tomillo.

Para 100 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	05/05/2017	0,7	0,7	0,5	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	0,7
2	06/05/2017	0,7	0,7	0,5	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	0,7
3	07/05/2017	0,7	0,7	0,5	0,9	1,5	2,3	0,6	0,7	0,7
4	08/05/2017	0,7	1,0	1,5	1,0	1,8	2,3	0,6	0,7	0,7
5	09/05/2017	0,7	1,0	1,5	1,0	2,1	3,0	0,6	0,7	0,7
6	10/05/2017	0,8	1,2	1,5	1,2	2,3	3,1	0,6	0,7	0,7
7	11/05/2017	0,8	1,3	1,7	1,5	2,8	3,6	0,6	0,7	0,7
8	12/05/2017	2,2	1,7	2,6	1,9	3,5	4,0	0,6	0,7	0,7
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla VII. Medición diaria del micelio de cada hongo para 100 ppm de AE de tomillo.

Para 150 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	27/04/2017	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6
2	28/04/2017	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6
3	29/04/2017	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6
4	30/04/2017	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6
5	01/05/2017	0,5	1,0	0,6	0,4	1,0	1,5	0,4	0,5	0,6
6	02/05/2017	0,5	1,5	0,7	0,9	1,5	1,8	0,4	0,5	0,6
7	03/05/2017	0,5	1,6	0,8	1,2	1,7	2,2	0,4	0,5	0,6
8	04/05/2017	0,5	1,8	1,0	1,8	1,8	2,5	0,4	0,5	0,6
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla VIII. Medición diaria del micelio de cada hongo para 150 ppm de AE de tomillo.

Para 200 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	20/04/2017	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2	21/04/2017	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3	22/04/2017	0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5
4	23/04/2017	0,5	0,5	0,5	0,8	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5
5	24/04/2017	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
6	25/04/2017	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	1,8	0,5	0,5	0,5
7	26/04/2017	0,5	0,5	0,5	1,8	2,0	2,4	0,5	0,5	0,5
8	27/04/2017	0,5	0,5	0,5	2,0	2,1	2,5	0,5	0,5	0,5
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla IX. Medición diaria del micelio de cada hongo para 200 ppm de AE de tomillo.

Para 250 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	20/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
2	21/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
3	22/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
4	23/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
5	24/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
6	25/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
7	26/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
8	27/04/2017	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,6
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla X. Medición diaria del micelio de cada hongo para 250 ppm de AE de tomillo.

Para 300 ppm:

Día	Fecha	<i>Rhizoctonia</i>			<i>Fusarium</i>			<i>Phytophthora</i>		
		Diámetro (cm)			Diámetro (cm)			Diámetro (cm)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	03/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
2	04/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
3	05/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
4	06/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
5	07/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
6	08/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
7	09/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
8	10/04/2017	0,6	0,5	0,3	1,2	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
TAMAÑO DE CAJAS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabla XI. Medición diaria del micelio de cada hongo para 300 ppm de AE de tomillo.

7.3. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon mediante las pruebas de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC).

Análisis de la varianza

PATÓGENO	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1.00	ASEN % DE CRECIMIENTO	13	0.91	0.87	32.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.31	4	0.58	21.12	0.0003
DOSIS (ppm)	2.31	4	0.58	21.12	0.0003
Error	0.22	8	0.03		
Total	2.53	12			

Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.5143

Error: 0.0300 gl: 24

DOSIS (ppm)	Medias	n	E.E.	
200.00	0.00	3	0.10	A
150.00	0.28	3	0.10	A
100.00	0.59	3	0.10	B
50.00	0.78	3	0.10	B
0.00	1.57	1	0.17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla XII. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para R. solani.

PATÓGENO	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2.00	ASEN % DE CRECIMIENTO	13	0.90	0.85	17.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.56	4	0.39	17.71	0.0005
DOSIS (ppm)	1.56	4	0.39	17.71	0.0005
Error	0.18	8	0.02		
Total	1.74	12			

Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.5143

Error: 0.0300 gl: 24

DOSIS (ppm)	Medias	n	E.E.	
200.00	0.45	3	0.09	A
150.00	0.58	3	0.09	A
100.00	0.83	3	0.09	A
50.00	1.19	3	0.09	B
0.00	1.57	1	0.15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla XIII. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para *F. solani*.

PATÓGENO	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3.00	ASEN % DE CRECIMIENTO	13	0.91	0.86	62.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4.29	4	1.07	19.51	0.0003
DOSIS (ppm)	4.29	4	1.07	19.51	0.0003
Error	0.44	8	0.05		
Total	4.73	12			

Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.5143
Error: 0.0300 gl: 24

DOSIS (ppm)	Medias	n	E.E.	
200.00	0.00	3	0.14	A
150.00	0.00	3	0.14	A
100.00	0.00	3	0.14	A
50.00	1.10	3	0.14	B
0.00	1.57	1	0.23	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Tabla XIV. Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos el día 8 para *Phytophthora capsici*.