



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

ESCUELA PARA GRADUADOS



**EFFECTOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE LA
INHIBICIÓN DE *Alternaria* sp. Y GERMINACIÓN DE
SEMILLAS DE *Solanum lycopersicum* L.**

Vanesa Córdoba

Tesis para optar por el grado académico de

Magister en Ciencias Agropecuarias

con mención en Tecnología de Semillas

Córdoba, Diciembre 2023

EFFECTOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE LA INHIBICIÓN DE *Alternaria* sp. Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Solanum lycopersicum* L.

Vanesa Córdoba

Comisión Asesora de Tesis:

Directora: Ing. Agr. (M.Sc.) Gloria Viotti
Asesores: Dra. María de las Mercedes Oliva (Codirectora)
Ing. Agr. (M.Sc.) Claudio Oddino

Tribunal Examinador de Tesis:

Dra. Ma. Evangelina Carezzano
Ing. Agr. (M. Sc.) Dra. María de la Paz Giménez Pecci
Ing. Agr. (M.Sc.) Claudio Oddino

Presentación formal académica: 18 de Diciembre, 2023

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución - No Comercial – Compartir Igual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

AGRADECIMIENTOS

A mi Comisión Asesora de Tesis: Gloria, Mechi y Claudio quienes siempre estuvieron dispuestos ayudarme con sus valiosas devoluciones prácticas y colmadas de conocimientos, siempre atentos a mis dudas, infinitas gracias por guiarme en el desarrollo de este trabajo. Me siento muy afortunada y ha sido un honor haberlos tenido en mi equipo.

A Jorge Valdés de EEA INTA- La Consulta por su valioso aporte de material vegetal, que fue utilizado en este trabajo.

A Jesi y Fer integrantes de mi querido Lab. 11, por su colaboración.

A mis compañeros de Cohorte, siempre dispuestos a dar una mano, fueron un gran apoyo en muchos momentos.

DEDICATORIA

A mis hijos Santiago y Bautista

A mi amor Facundo

“Mi VIDA y por siempre mi FELICIDAD”

RESUMEN

El Tizón temprano, que puede afectar severamente al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es causado por varias especies de *Alternaria spp.* El control se realiza utilizando fungicidas de síntesis química; sin embargo, en este último tiempo se ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales, como los aceites esenciales, para minimizar los efectos negativos de los principios activos de estos fungicidas. Los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) sobre la germinación de semillas de tomate y la inhibición en el crecimiento de *Alternaria sp. in vitro* para su uso alternativo como control del Tizón temprano. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los aceites esenciales sobre una cepa de *Alternaria sp.* aislada de un fruto de tomate con síntomas y se evaluó el Vigor y el Poder Germinativo de esta concentración sobre semillas de tomate, con el fin de determinar fitotoxicidad. Se obtuvieron valores de CIM iguales a 1,2 mg ml⁻¹ y 0,282 mg ml⁻¹ para los aceites esenciales de orégano y tomillo respectivamente. Se observó que, a las CIM determinadas, los aceites esenciales no produjeron efectos fitotóxicos sobre las semillas, obteniendo valores de Vigor y de Poder Germinativo similares al control. Estos resultados demuestran que los aceites esenciales probados constituyen una nueva alternativa natural para la aplicación sobre semillas de tomate para control del Tizón temprano.

Palabras clave: Tizón temprano, plantas aromáticas, control alternativo.

ABSTRACT

Early blight, which can severely affect tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.), is caused by several species of *Alternaria* spp. Control is carried out using chemical synthesis fungicides; however, recently the search for natural alternatives, such as essential oils, has been promoted to minimize the negative effects of the active ingredients of these fungicides. The objectives of this study were to evaluate the effect of essential oils of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) on the germination of tomato seeds and the inhibition of the growth of *Alternaria* sp. *in vitro* for alternative use as Early blight control. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the essential oils was determined on a strain of *Alternaria* sp. isolated from a tomato fruit with symptoms and the Vigor and Germinative Power of this concentration on tomato seeds was evaluated, in order to determine phytotoxicity. MIC values equal to 1,2 mg ml⁻¹ and 0,282 mg ml⁻¹ were obtained for the essential oils of oregano and thyme, respectively. It was observed that, at the determined MICs, the essential oils did not produce phytotoxic effects on the seeds, obtaining values of Vigor and Germinative Power similar to the control. These results demonstrate that the essential oils tested constitute a new natural alternative for application on tomato seeds to control Early blight.

Keywords: Early blight, aromatic plants, alternative control

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
TABLA DE CONTENIDOS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVOS GENERALES.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
MATERIALES VEGETALES.....	7
Semillas de tomate.....	7
Especies aromáticas.....	7
ACEITES ESENCIALES (AE).....	7
Obtención de los AE.....	7
Identificación y cuantificación de los componentes de AE.....	8
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	8
A partir de semillas de tomate.....	8
A partir de frutos de tomate.....	9
DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UN FUNGICIDA DE SÍNTESIS QUÍMICA SOBRE <i>ALTERNARIA</i> SP.....	10
DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AE SOBRE <i>ALTERNARIA</i> SP.....	10

ENSAYOS DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE.....	12
Efecto de leche descremada sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate.....	12
Efecto de AE de <i>O. vulgare</i> y <i>T. vulgaris</i> sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS AE.....	15
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	18
A partir de semillas de tomate.....	18
A partir de frutos de tomate.....	22
DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE FUNGICIDA DE SÍNTESIS QUÍMICA SOBRE <i>ALTERNARIA</i> SP.....	23
DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AE SOBRE <i>ALTERNARIA</i> SP.....	25
ENSAYOS DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE.....	29
Efecto de leche descremada sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate.....	29
Efecto de AE de <i>O. vulgare</i> y <i>T. vulgaris</i> sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate.....	31
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	36
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	37
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46

LISTA DE TABLAS

Contenido	Pág.
Tabla 2.1 Datos de Concentración Inhibitoria Mínima utilizados de referencia para los análisis de inhibición de crecimiento de <i>Alternaria</i> spp.....	12
Tabla 2.2 Tratamientos aplicados a las semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	13
Tabla 3.1 Resultados del análisis de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa de los aceites esenciales de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.) y orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.). Valores en porcentaje.....	16
Tabla 3.2 Diámetro de crecimiento de <i>Alternaria</i> sp. y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima del fungicida mezcla: carboxin 20%, metiltiofanato 10%, metalaxil 1,33%.....	24
Tabla 3.3 Diámetro de crecimiento de <i>Alternaria</i> sp y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	25
Tabla 3.4 Diámetro de crecimiento de <i>Alternaria</i> sp y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	26
Tabla 3.5 Comparación del Vigor de las semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) tratadas con leche descremada 5% y el control.....	30
Tabla 3.6 Poder Germinativo, expresado como Porcentaje de Plántulas Normales de las semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) tratadas con leche descremada 5% y el control.....	30
Tabla 3.7 Vigor de las semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.). Primer conteo de Plántulas Normales (valores en porcentaje).....	37
Tabla 3.8 Poder Germinativo, expresado como porcentaje de Plántulas Normales, de las semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	34

LISTA DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Fig. 3.1 A y B. Desarrollo de microorganismos de origen fúngico en semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) sin tratamiento químico en medio agar papa glucosado, luego de 7 días de incubación a 24 ± 2 °C, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad	18
Fig. 3.2 A. Aislamiento de <i>Alternaria</i> sp. por Método de papel secante. B. Semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) con crecimiento fúngico.....	19
Fig. 3.3 Crecimiento fúngico de <i>Alternaria</i> sp. aisladas de semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), en medio agar papa glucosado. Aislamiento B (A) y C (B).....	20
Fig. 3.4 Observación microscópica en 10x (A) y 40x (B). Morfología de hifas y conidios de aislamiento B, proveniente de semilla de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) infectada.....	20
Fig. 3.5 Observación microscópica en 10x (A) y 40x (B). Morfología de hifas y conidios de aislamiento C, a partir de semilla de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) infectada.....	21
Fig. 3.6 Colonia de <i>Alternaria</i> sp., en medio agar papa glucosado (A) y observación microscópica a 10x (B) y 40x (C) de conidios, del aislamiento C.....	21
Fig. 3.7 Frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), con síntomas de Tizón temprano.....	22
Fig. 3.8 Fruto de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) con síntomas característicos de Tizón temprano del cual se aisló la cepa E.....	22
Fig. 3.9 Colonia de <i>Alternaria</i> sp. crecida en medio agar papa glucosado. Cepa E.	23
Fig. 3.10 Cepa E. A y B. Observación microscópica a 40x de conidios de <i>Alternaria</i> sp., aislados a partir de fruto de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	23
Fig. 3.11 Crecimiento de <i>Alternaria</i> sp. en placas de agar papa glucosado con fungicida mezcla: carboxin 20%, metiltiofanato 10%, metalaxil 1,33%.....	24
Fig. 3.12 Crecimiento de <i>Alternaria</i> sp. en medio agar papa glucosado con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) y en el control.....	26
Fig. 3.13 Observación microscópica de crecimiento fúngico en medio agar papa glucosado con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) en una concentración de $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$	29
Fig. 3.14 A y B. Plántulas normales de <i>Solanum lycopersicum</i> L. del tratamiento con leche descremada al 5%, con 14 días de	30

crecimiento.....	
Fig. 3.15 Plántulas normales de <i>Solanum lycopersicum</i> L en A: Tratamiento control. B: Tratamiento con aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.). C: Tratamiento con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	32
Fig. 3.16 Primer conteo. Plántulas anormales de <i>Solanum lycopersicum</i> L del tratamiento control (A) y tratamiento con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) (B).....	33
Fig. 3.17 Primer conteo. Plántulas anormales de <i>Solanum lycopersicum</i> L. en el tratamiento con aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	33
Fig. 3.18 Plántulas normales de <i>Solanum lycopersicum</i> L. A: Tratamiento control. B: Tratamiento con aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.). C: Tratamiento con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	34
Fig. 3.19 Plántulas anormales de <i>Solanum lycopersicum</i> L del tratamiento con aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.), en el segundo conteo.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AE: aceite esencial

ANOVA: análisis de la varianza

APG: agar papa glucosado

C: control

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

DC: diámetro control

DT: diámetro tratamiento

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

GC-MS: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

INNOVA T: Fundación Innovación y Transferencia de Tecnología

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agroindustrial

ISTA: International Seed Testing Association

kg: kilogramo

L: litro

mg ml⁻¹: miligramo por mililitro

O: orégano

pH: potencial de hidrógeno

Ref.: referencia

s/c: sin crecimiento

SDHI: inhibidores de la succinato deshidrogenasa

T: tomillo

TC: tratamiento control

TL: tratamiento leche

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

% CIM: Porcentaje de Concentración de Inhibición Mínima

°C: grado centígrado

μ l: microlitro

μ m: micrometro

10x: 10 aumentos

40x: 40 aumentos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Un gran número de enfermedades infecciosas que afectan al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) disminuyendo considerablemente su productividad, son transmitidas por semillas. Entre las enfermedades más importantes se encuentra el Tizón temprano, causada por varias especies diferentes del hongo *Alternaria* spp. el cual se ha asociado con el Tizón temprano del tomate y la papa (Simmons, 2000). Las principales estrategias de manejo se basan en la protección foliar mediante la aplicación de fungicidas de síntesis química. Sin embargo, su uso aumenta los costos de producción, además de que poseen toxicidad que afecta negativamente al ser humano y al medio ambiente, acelera la selección de patógenos resistentes y además no pueden ser utilizados para el control de enfermedades en cultivos orgánicos. Consecuentemente, se están buscando alternativas más naturales y los productos derivados de plantas, en este caso los aceites esenciales constituyen una alternativa a ser evaluada.

El agente causal del Tizón temprano de papa, tomate y otras *Solanáceas* se consideró inicialmente como *Alternaria solani* Sorauer. En una revisión taxonómica basada en la morfología de especímenes de *Alternaria* spp. aisladas en *Solanáceas*, Simmons (2000) describió varias especies nuevas como *A. grandis* Simmons. Además de *A. solani* y *A. grandis*, que eran las especies dominantes de la papa, un hongo similar en el tomate se describió como una nueva especie, llamada *A. tomatephila* Simmons. Esta especie morfológica ha sido respaldada posteriormente, no solo por estudios de inoculación (Fraser y Zitter, 2003), sino también por datos moleculares (Gannibal *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2010) y perfiles metabólicos (Andersen *et al.*, 2008). La aptitud patógena de *Alternaria* spp. aisladas de solanáceas, destaca la complejidad de la etiología del Tizón temprano (Bessadat *et al.*, 2015).

El Tizón temprano es una de las enfermedades más importantes del tomate a nivel mundial (Carreño *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2013). Afecta todos los órganos aéreos de la

planta, y en ataques severos puede producirse la defoliación total. Por esta razón se reduce considerablemente el área verde de la planta, y como consecuencia puede disminuir el rendimiento entre el 50 y 80 % (Paz *et al.*, 2013). También puede causar el mal del tallo (damping-off o caída de almácigos) y necrosis en frutos, que en su mayoría caen prematuramente, y aquellos que alcanzan la madurez no son comercializables (Adhikari *et al.* 2017; Duarte *et al.* 2013). En el fruto las lesiones producidas por el Tizón temprano se caracterizan por producir manchas cóncavas, firmes y secas de color café o negro con bordes bien definidos que se extienden profundamente dentro del fruto. Estas lesiones están frecuentemente asociadas al punto de inserción del pedicelo. La superficie de las zonas alteradas de los frutos se pliega, y puede cubrirse con un moho negro, aterciopelado, bastante característico. En altas condiciones de humedad se producen gran cantidad de estructuras reproductivas de colores verdes oscuras u olivas sobre las lesiones (Babagoli y Behdad, 2012; Blancard, 2012).

Generalmente para el control de enfermedades vegetales se utilizan productos químicos sintéticos los cuales son efectivos. Sin embargo, se comenzó a estudiar su capacidad de biodegradación y se observó que tienen toxicidad residual lo que causa contaminación ambiental (Lo Cantore *et al.*, 2004; Perelló *et al.*, 2013). La resistencia a los productos de síntesis química por parte de los microorganismos patógenos es otro factor importante que impulsa la necesidad de reducir la dependencia a estos fungicidas. Sólo en la última década, un gran número de estudios informaron de la evolución de la resistencia entre diversos hongos patógenos de plantas y Oomycetes a diversos principios activos utilizados como fungicidas (Miles *et al.*, 2013). En algunos casos, el mismo patógeno fúngico desarrolló resistencia a docenas de productos fungicidas (Lamichhane *et al.*, 2015). El surgimiento de la resistencia reduce la disponibilidad de ingredientes activos con diferente modo de acción disponibles en la lucha contra los hongos fitopatógenos, dificultando de sobremanera el manejo agronómico de las enfermedades (Carmona y Sautua, 2017).

Además, las enfermedades transmitidas por semillas pueden causar serios problemas en cultivos orgánicos porque se minimizan las posibilidades de usar productos químicos sintéticos. Hasta ahora, sólo se han aprobado unos pocos tratamientos alternativos (Dal Bello y Sisterna, 2010; Perelló *et al.*, 2013).

El desarrollo de alternativas efectivas para el manejo de enfermedades es esencial para lograr productividad, rentabilidad y minimizar los efectos negativos de los principios activos de síntesis en la biodiversidad de los agroecosistemas. De acuerdo con las demandas de consumidores y productores, se están investigando métodos alternativos para el manejo de enfermedades fúngicas (Feng y Zheng, 2007; Tripathi y Dubey, 2004). Uno de estos enfoques ecológicamente viables para controlar las enfermedades causadas por hongos en las semillas, es el uso de productos naturales, especialmente compuestos de origen vegetal (Dal Bello y Sisterna, 2010). En la actualidad, el desarrollo de productos biocontroladores a partir de las plantas es una alternativa promisoría, pues se demostró el efecto inhibitor de varios de sus derivados sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos (Duarte *et al.*, 2013; Raveau *et al.*, 2020). Estos compuestos, han desempeñado un papel importante en la reducción de la incidencia de patógenos transmitidos por las semillas, en la mejora de la calidad de éstas y la emergencia de plantas en el campo. Por su fuente rica de bioactivos, las plantas pueden proporcionar alternativas potenciales a los fungicidas sintéticos para el tratamiento de semillas (Dal Bello y Sisterna, 2010). Además de su capacidad antimicrobiana se destaca su carácter biodegradable, el bajo impacto en el ambiente debido a que sus residuos son fáciles de degradar y la mínima toxicidad que puede producir en la salud humana (Cuzco Bobadilla y Chico Ruíz, 2015).

Entre estos productos se encuentran los aceites esenciales (AE). Estos se definen como mezclas complejas de fracciones volátiles y sustancias aromáticas líquidas, con más de cien compuestos químicos orgánicos provenientes de la familia de los terpenoides que forman parte del metabolismo secundario de las plantas, y se producen de manera natural para la defensa contra insectos y microorganismos (Borboa Flores *et al.*, 2010; Costa Becheleni *et al.*, 2020; El Rasheed y El Rasheed, 2017).

Las plantas aromáticas suelen tener una notable variación en cuanto a calidades. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de los llamados quimiotipos, es decir individuos de una misma especie que se diferencian entre sí por la composición química en sus aceites (Gil, 2005; Karaman, 2006; Msaada, 2007). Estas variaciones pueden estar dadas por las condiciones ambientales, las cuales provocan un cambio permanente en los caracteres químicos de sus AE y el genotipo de la planta (Villavicencio Gastelú *et al.*, 2016). El tipo

de terpenoide, la cantidad en la que se encuentre en el aceite y las interacciones que se dan entre estos componentes, determinan su capacidad antimicrobiana (Delaquis *et al.*, 2002; Radulović *et al.*, 2007).

El orégano (*O. vulgare* L.) es una especie herbácea originaria de la zona de Turquía, que ha sido ampliamente difundida y es consumida y cultivada en diferentes latitudes en el mundo. Prospera de manera adecuada en una amplia gama de suelos y rango de pH, siendo ideales los tipo franco a franco arenoso, levemente ácidos a neutros. En condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa el cultivo se desarrolla de manera ideal. El AE que se obtiene del material vegetales es un líquido de color amarillo a pardo (Cameroni, 2013). La floración es el momento óptimo de cosecha ya que es allí cuando la producción de AE es máximo (Davidenco, 2015). La composición química es variable dependiendo del tipo de planta que se cultiva. Contiene diversos compuestos químicos, principalmente carvacrol y timol y, en menor proporción, se encuentran fenoles, pinemo y cinemo como también sesquiterpenos y alfa-thuyona, dipenteno, alfa-terpineno y otros (Cameroni, 2013). En la Argentina, el orégano es el cultivo de plantas aromáticas más importante, no sólo debido a la demanda de los consumidores, sino también por mayor superficie cultivada. El 56% de las explotaciones donde se cultiva el orégano tienen alrededor de 5 hectáreas y el 75% de todos los establecimientos concentran menos de diez hectáreas. Las principales zonas de producción se encuentran en la provincia de Córdoba (25% de la producción nacional) y en las provincias de Mendoza (50%) y San Juan (15%) (Asensio, 2013; Cameroni, 2013). En la provincia de Córdoba el orégano comercial proviene de cuatro variedades diferentes: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino (Asensio *et al.*, 2012).

El tomillo (*T. vulgaris* L.) es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece sobre suelos secos y soleados y resiste bien las heladas y sequías (Luengo, 2006). En la provincia de Córdoba, la producción de estas plantas aromáticas se lleva a cabo en las mismas zonas que el cultivo anterior; las superficies implantadas son pequeñas (incluso mucho más reducidas que las destinadas a orégano) (Tolocka, *et. al.*, 2011). Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su AE, en el que ya se han detectado 7 quimiotipos. El AE está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno,

gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol. No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del AE es variable según la época y lugar de la cosecha, además de la bien conocida existencia de diferentes quimiotipos (Luengo, 2006).

Los mecanismos de acción sobre la célula de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables. Por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos celulares y los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. Por otra parte, se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN, mientras que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la exclusión competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999; Lambert *et al.*, 2001). Es frecuente que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula (Alzamora *et al.*, 2001; Kalemba y Kunicka, 2003; Sánchez *et al.*, 2009).

Diversos estudios muestran los efectos antifúngicos de muchos AE contra los hongos patógenos de las plantas, lo que los hace candidatos para el desarrollo de nuevos agentes fungicidas (Arraiza *et al.*, 2018; Bansod y Rai, 2008; Mine y Kose, 2015; Schelz, *et al.* 2006; Suhr y Nielsen, 2003). Se ha investigado la actividad antifúngica de varias plantas medicinales contra *A. solani* encontrando como resultados la inhibición total del crecimiento micelial, de la germinación de las esporas (Goussous *et al.*, 2010) y la reducción de los síntomas del Tizón temprano (Abiodun *et al.*, 2017).

Sin embargo, ciertas especies de plantas, como *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. pueden influir produciendo efectos alelopáticos, afectando la germinación, el vigor y la emergencia de las semillas debido a la síntesis de metabolitos secundarios (Thiesen *et al.*, 2019). Las diferentes concentraciones de estos metabolitos secundarios, influyen en las reacciones alelopáticas debido al contenido de aleloquímicos, el tiempo de aplicación y la concentración empleada (Blanco, 2006). Por ello, resulta importante evaluar el efecto de los AE, sobre la germinación y el normal desarrollo de plántulas de la especie que se desea proteger.

El presente estudio tiene como propósito estudiar el efecto de AE sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. aislada de tomates, y de este modo contribuir en la búsqueda de productos naturales que puedan controlar enfermedades en los cultivos de hortalizas. En ese sentido, se tratará de demostrar que los AE de plantas aromáticas de orégano y tomillo pueden inhibir el crecimiento fúngico, sin alterar la germinación de las semillas.

HIPÓTESIS

Los AE de plantas aromáticas pueden inhibir el crecimiento de *Alternaria* sp., sin alterar la germinación de las semillas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de AE sobre la inhibición de *Alternaria* sp. y la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) para su uso alternativo como control del Tizón temprano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1). Obtener, identificar y caracterizar químicamente los AE provenientes de tomillo y orégano.
- 2). Aislar *Alternaria* spp. a partir de frutos y semillas de tomate.
- 3). Evaluar la eficacia *in vitro* de los AE en la inhibición del crecimiento de *Alternaria* sp.
- 4). Evaluar el impacto de los AE sobre el poder germinativo de semillas de tomate.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES VEGETALES

Semillas de tomate

Los ensayos de germinación, se realizaron a partir de semillas de tomate provistas por la “Asociación Cooperadora EEA La Consulta-INTA”, de la localidad de La Consulta, Mendoza. Corresponden a la Variedad Uco-19 INTA (Lote: 2021, cosecha: 2021). Las mismas presentaron las siguientes características (datos provistos por INTA La Consulta):

-Pureza físico-botánica: 99%

-Poder germinativo: 87%.

Las semillas fueron almacenadas hasta el momento de los ensayos en un ambiente seco a 20 °C.

Especies aromáticas

Se utilizaron las especies aromáticas de *T. vulgaris* y *O. vulgare* por presentar actividad inhibitoria sobre cepas del género *Alternaria* (Feng y Zheng, 2007; Mine y Kose, 2015). El material vegetal fue recolectado de cultivos ubicados en la localidad de Las Rosas, Córdoba.

ACEITES ESENCIALES

Obtención de los AE

Los AE se obtuvieron siguiendo el método de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger y según el procesamiento descrito por Carezzano *et al.* (2017) y Oliva *et al.* (2015), en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e

Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).

Identificación y cuantificación de los componentes de AE

La identificación y cuantificación de las muestras oleosas fueron realizadas por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-MS) en un aparato Perkin Elmer Q-910, en el servicio INNOVA T de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal de la Universidad Nacional de Córdoba.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ALTERNARIA* SP.

A partir de semillas de tomate

Para llevar a cabo los aislamientos se utilizaron semillas libres de tratamientos químicos provenientes de viveros, de la EEA-INTA La Consulta y la Agencia de Extensión Rural INTA Río Cuarto.

La composición del medio de cultivo es un factor importante a la hora de aislar patógenos vegetales. Se empleó medio de cultivo agar papa glucosado (APG) ya que es un medio de cultivo general en el que desarrollan la mayoría de los patógenos fúngicos de plantas (Senanayake *et al.*, 2020).

Se emplearon dos técnicas.

En una de ellas se siguió la metodología propuesta por Moreno Velázquez *et al.* (2005) y Perveen y Ghaffar (1995), con modificaciones. Se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron en papel estéril, se sembraron en APG y se incubaron durante 7 días a 24 ± 2 °C, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Por otro lado, se utilizó el método de papel secante (Blotter Method), según ISTA (2022), con modificaciones. Para ello, se colocaron tres papeles de filtro estériles de 90 mm en placas

de Petri. Se remojaron previamente con agua destilada estéril, y se dejaron escurrir unos segundos para drenar el exceso de agua. Luego, en cada placa se colocaron asépticamente las semillas (sin desinfectar), espaciadas uniformemente en la superficie del papel de filtro. Posteriormente, se incubaron durante 3 días a 20 ± 2 °C en la oscuridad y se transfirieron al congelador a una temperatura de -20 ± 2 °C durante 24 horas. Finalmente, se incubaron durante 7 días a 24 ± 2 °C con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

A las semillas que presentaron crecimiento fúngico se las observó directamente al microscopio óptico con aumento 10x y 40x, para la identificación de conidios. Las semillas con conidios con características morfológicas similares a las de *Alternaria* spp., se colocaron en medio APG e incubaron durante 7 días a 24 ± 2 °C con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad para proseguir con el aislamiento.

A partir de frutos de tomate

Se seleccionaron tomates con síntomas necróticos característicos del Tizón temprano. Se tomaron porciones de aproximadamente 3 cm. de diámetro del borde de las lesiones, y se las colocaron en APG. Se incubaron durante 7 días a 24 ± 2 °C con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Además, se realizaron extendidos directamente de los crecimientos fúngicos, observados en los frutos de tomate con síntomas. Aquellos crecimientos que presentaron conidios con características morfológicas similares a los de *Alternaria* spp., se colocaron en medio APG e incubaron durante 7 días a 24 °C con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

A partir de los aislamientos de *Alternaria* spp., se obtuvieron cultivos puros mediante la transferencia de porciones de APG con abundante crecimiento fúngico a nuevas placas de APG, se incubaron en las mismas condiciones antes descritas, hasta observar abundante crecimiento y esporulación del hongo. De éstos se obtuvieron cultivos monospóricos para los ensayos posteriores (Bessadat *et al.*, 2020).

En todos los métodos de aislamiento, se observó el crecimiento fúngico en las placas de Petri, llevando a cabo la identificación de conidios. Para esto, se realizaron preparados frescos, tomando con un ansa estéril una porción del crecimiento fúngico, y se lo depositó

en un portaobjetos con una gota de agua destilada, se colocó luego el cubreobjetos. Se observaron en microscopio óptico a 10x y 40x.

Para la identificación morfológica, se tuvieron en cuenta las características macroscópicas y microscópicas de los crecimientos fúngicos como: color, elevación y forma de las colonias, tipo de micelio, y características morfológicas de conidióforos y conidios, propuestas por Barnett y Hunter (1998).

Los aislamientos, se conservaron en refrigeración a 4 ± 2 °C y se mantuvieron mediante sucesivos repiques en medio APG.

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UN FUNGICIDA DE SÍNTESIS QUÍMICA SOBRE *ALTERNARIA SP.*

Esta determinación se realizó como control, para validar la técnica utilizada y evaluar la efectividad de los AE sobre la inhibición de *Alternaria sp.* Además, los resultados obtenidos permitieron comparar los efectos de inhibición del fungicida con el de los AE empleados.

Se utilizó un fungicida de uso frecuente que posee acción sobre patógenos presentes en semillas cuyos principios activos y sus concentraciones son las siguientes: carboxin 20%, metiltiofanato 10%, metalaxil 1,33%; comercialmente se identifica como “Options Advance”, de Laboratorios Nova.

En APG se colocó el volumen de fungicida que se debe aplicar para cubrir una semilla y lograr las concentraciones de principios activos recomendadas por el fabricante (250 cm³ por cada 100 kg de semilla). Luego del período de incubación a 24 ± 2 °C durante 7 días, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad se calculó el % CIM (la fórmula se describe en el siguiente punto).

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AE SOBRE *ALTERNARIA SP.*

Para conocer la eficacia inhibitoria de los AE sobre el crecimiento micelial de la cepa aislada de *Alternaria* sp. se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cada AE. La CIM se define como la mínima concentración de compuesto capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo (D'auria *et al.*, 2005; Djordjevic *et al.*, 2013). Los valores de CIM sirven para conocer las mínimas concentraciones efectivas que producen inhibición del crecimiento, de esta manera no se utiliza producto de más en el caso de que se desee aplicarlo.

Para esto, se siguió la técnica descrita por Sajid *et al.* (2020). Se preparó medios de cultivo APG y se esterilizó en autoclave a 121 °C (1 atmósfera) durante 15 minutos. Una vez templado a 45-50 °C, se dosificó en placas de Petri de manera aséptica y se agregaron al medio diferentes volúmenes de AE puros (ambos AE se encontraban en una concentración de 900 mg ml⁻¹) para alcanzar las concentraciones que se deseaban probar. Luego, en el centro de la placa se depositó un taco de 7 mm de diámetro de APG de la cepa de *Alternaria* sp. previamente crecida durante 7 días. Como control, se utilizaron placas con APG estéril libre de AE, a los que se sembró de la misma manera la cepa aislada de *Alternaria* sp.

Posteriormente, todas las placas de Petri se incubaron a 24 ± 2 °C durante 7 días, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Luego de este período, se midió el diámetro de crecimiento del hongo en todas las placas. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, al igual que los controles.

El efecto antifúngico de los AE se expresó mediante el cálculo del % CIM y mediante la determinación de la CIM (Djordjevic *et al.*, 2013).

En las placas en donde se observó crecimiento, se determinó el Porcentaje de Concentración de Inhibición Mínima (% CIM) utilizando la siguiente fórmula (Achimón *et al.*, 2020; Díaz Dellavalle *et al.*, 2011).

$$\% \text{ CIM} = (DC - DT / DC) * 100$$

Donde DC corresponde a “diámetro de control” y DT a “diámetro de tratamiento”.

Los resultados de % CIM, permitieron determinar la CIM. Se consideró que se alcanzó la CIM de los AE, cuando se observó inhibición total del crecimiento fúngico en la placa de Petri, mientras que en el control se desarrolló de manera normal.

Para comenzar con los estudios de eficacia de inhibición de los aceites, sobre la cepa aislada, se tomaron como referencia los siguientes datos Tabla 2.1:

Tabla 2.1 Datos de Concentración Inhibitoria Mínima utilizados de referencia para los análisis de inhibición de crecimiento de *Alternaria* spp.

Autores	Aceite Esencial	Cepa	CIM (mg ml⁻¹)
Santamarina <i>et al.</i> (2015)	<i>O. compactum</i> Bentham	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissler	0,3000
Segvić Klarić <i>et al.</i> (2007)	<i>T. vulgaris</i>	<i>Alternaria</i> sp	0,0094

ENSAYOS DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE

Efecto de leche descremada sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate

Con el fin de descartar algún efecto de la solución de la leche descremada sobre las semillas, la cual se utilizó como diluyente de los AE, previo a la aplicación de los tratamientos con AE, se evaluó su efecto sobre la germinación de las semillas. La metodología de los ensayos de germinación y la evaluación de las plántulas fueron los mismos empleados para medir posteriormente los efectos de los AE sobre las semillas, tal como se describe a continuación. Como control, se realizó la siembra de semillas, sin leche descremada y sólo con agua destilada.

Efecto de AE de *O. vulgare* y *T. vulgaris* sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate

Para estudiar los efectos de los AE de orégano y tomillo sobre el Poder Germinativo de las semillas, se realizaron tratamientos en donde se pusieron en contacto las semillas de tomate con la CIM de los productos naturales.

-Acondicionamiento de las semillas y tratamientos

Para cada uno de los tratamientos se utilizó como sustrato la siembra en arena hidratada con agua destilada, contenida en bandejas plásticas con cierre hermético. Con el fin de llevar a cabo el correcto acondicionamiento del sustrato, se controló que el mismo no presentara toxicidad, que sea del pH adecuado y además tenga la humedad suficiente para garantizar la germinación.

Los AE puros se diluyeron en leche descremada al 5% hasta lograr la CIM. Se colocaron 100 semillas en contacto con 500 µl. del AE diluido a su CIM en un recipiente pequeño. Se homogeneizaron delicadamente con una varilla de vidrio e inmediatamente fueron sembradas. Se aplicó este volumen a las semillas para seguir con las recomendaciones de membrete detallado en los productos con fungicidas de síntesis química (1 L cada 100 kg de semillas). Este tratamiento, se aplicó en cada repetición con cada uno de los AE a probar. Se sembraron en una bandeja preparada como se describe previamente.

Como control, se sembraron semillas tratadas solo con la leche descremada al 5%, sin AE. Los tratamientos se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Tratamientos aplicados a las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Tratamiento	Aplicación
C	Leche descremada al 5%
T	CIM de AE de tomillo
O	CIM de AE de orégano

Ref.: C: Control. T: Tomillo. O: Orégano. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. AE: Aceite Esencial

Se sembraron 100 semillas por bandeja, realizando 4 repeticiones por tratamiento. La

germinación se llevó a cabo en condiciones de temperatura y luz controladas en una cámara de germinación (25 °C y luz constante) provista por el Departamento de Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, de la UNRC.

Se tuvieron en cuenta los parámetros establecidos por las Normas ISTA (2017) para establecer las condiciones de germinación y los días de primer (5 días) y segundo (14 días) conteo para la especie *S. lycopersicum*.

-Evaluación del Vigor y Poder Germinativo

Tanto en el primer conteo como en el segundo conteo, se determinó el porcentaje de plántulas normales, anormales y no germinadas. Para la clasificación se tuvieron en cuenta los parámetros de análisis establecidos en el “ISTA Handbook on Seedling Evaluation” (ISTA, 2018).

Se estimó el Vigor y el Poder Germinativo de las semillas tratadas con las CIM obtenidas para cada AE, contabilizando el Porcentaje de Plántulas Normales (% Plántulas Normales), a los 5 y 14 días respectivamente. Los resultados de Vigor y Poder Germinativo, se expresaron como % Plántulas Normales. Se compararon los porcentajes obtenidos de los tratamientos frente al control sin AE.

Con el fin de describir los posibles daños efectuados en las semillas por los AE, se caracterizaron en detalle las plántulas anormales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el sistema estadístico ANOVA, utilizando el programa InfoStat (InfoStat versión 2018, Di Rienzo *et al.*, 2018). Se determinó un valor de $p > 0,05$ para mostrar diferencias no significativas entre los tratamientos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS AE

El rendimiento del AE que se obtiene es de aproximadamente 0,8% del peso del material vegetal hidrodestilado.

El resultado del análisis demuestra que en el AE de tomillo se identificaron 36 compuestos (99,3%) y en el AE de orégano 24 compuestos (99,7%). Los compuestos químicos mayoritarios que se encontraron en ambos AE fueron el monoterpeno oxigenado carvacrol tomillo (T): 29,5% y orégano (O): 19,7% y entre los monoterpenos hidrocarbonados a p-cimeno (T: 31.5% y O: 11.5%) y gamma terpineno (T: 11.3% y O: 22.7%). En el AE de orégano se observó además cis-sabineno en elevada concentración (19,7%) (Tabla 3.1).

La estructura química de los AE está relacionada con el grado de actividad inhibitoria siendo los terpenoides que contienen grupos fenoles los de mayor actividad, le siguen los alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos en su estructura (Di Pasqua *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009; Zygadlo y Juliani, 2000).

Timol es isómero de carvacrol, su diferencia estructural está dada por la posición en la que se encuentra el oxhidrilo. Los monoterpenos con la presencia de un alcohol primario en el grupo funcional muestran mayor actividad que con alcoholes secundarios y terciarios. Ambos compuestos contienen una mezcla de ciclohexano con un grupo hidroxilo unido y un sistema de electrones deslocalizados responsable de su actividad biológica (Rota *et al.*, 2008; Viuda Martos *et al.*, 2011). Como puede observarse en la Tabla 3.1, ambos AE presentaron un porcentaje muy bajo de timol, a pesar de ser uno de los monoterpenos característicos en el AE de tomillo.

Tabla 3.1 Resultados del análisis de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y orégano (*Origanum vulgare* L.). Valores en porcentaje.

Compuesto	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Origanum vulgare</i> L.
alpha thujene	1,7	0,6
alpha pinene	1,6	Tr
alpha fenchene	0,8	Tr
beta pinene	1,1	-
Sabinene	-	1,8
octanone 3	-	Tr
trans-2-octen-1-ol	-	Tr
Myrcene	1,8	1,2
3-octanol	Tr	-
alpha phellandrene	Tr	-
3-carene	Tr	-
alpha terpinene	1,7	2,4
p-cymene	31,5	11,5
1,8-cineole	2,4	-
Limonene	-	Tr
beta phellandrene	-	Tr
cis ocimene	-	3,9
trans ocimene	-	0,6
gamma terpinene	11,3	22,7
Terpinolene	1,5	2,1
para-cymenene	Tr	-
Linalool	3,5	-
sabinene hydrate cis	Tr	19,7
sabinene hydra trans	-	Tr

Tabla 3.1 Resultados del análisis de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y orégano (*Origanum vulgare* L.). Valores en porcentaje. (continuación)

Compuesto	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Origanum vulgare</i> L.
Camphor	Tr	-
borneol	1	0,6
4-terpineol	1,2	5,1
p-cymen-8-ol	Tr	-
alpha terpineol	Tr	1,8
thymol methyl ether	1,7	1,5
geraniol	Tr	-
geranial	Tr	-
Thymol	1	1,5
Carvacrol	29,5	19,7
isobornyl acetate	Tr	-
alpha copaene	Tr	-
beta bourbonene	Tr	-
longifolene	3,6	-
alpha cadinene	1,1	-
gamma muurolene	Tr	-
gamma cardinene	Tr	-
delta cardinene	Tr	-
calamenene 1S, cis	Tr	-
oxide caryophyllene	1,3	-
beta caryophyllene	-	2,7
Total	99,3	99,7

Ref: Tr: trazas

T. vulgaris tiene un polimorfismo químico con seis quimiotipos diferentes que muestran una marcada segregación espacial en la naturaleza. Aunque algunas poblaciones tienen en

su mayoría un solo quimiotipo, muchas tienen dos o tres (Thompson *et al.*, 2003). De acuerdo al análisis en la composición del AE se puede afirmar que el empleado en este trabajo, corresponde al quimiotipo carvacrol.

En cuanto al AE de *O. vulgare*, se hallaron composiciones muy diversas al ser una especie con una amplia área de distribución. Se han descrito diferentes quimiotipos del AE de orégano, como carvacrol, timol, cariofileno, sabineno, γ -terpineno y β -cubeneno (Verdeguer Sancho, 2011). En otro estudio se identificaron 4 quimiotipos diferentes, Mendocino, Compacto, Criollo y Cordobés, que demostraron actividad antimicrobiana y antioxidante. La composición del AE de orégano estudiado en este trabajo fue semejante al quimiotipo Cordobés ya que presentó como componente mayoritario carvacrol y p-cimeno (Asensio *et al.*, 2014).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ALTERNARIA* SP.

A partir de semillas de tomate

Los aislamientos provenientes de semillas colocadas en APG presentaron crecimiento abundante de levaduras y hongos de crecimiento rápido, a pesar de su desinfección superficial (Fig. 3.1), por lo que se continuó el trabajo utilizando el método de papel secante (Fig. 3.2 A).

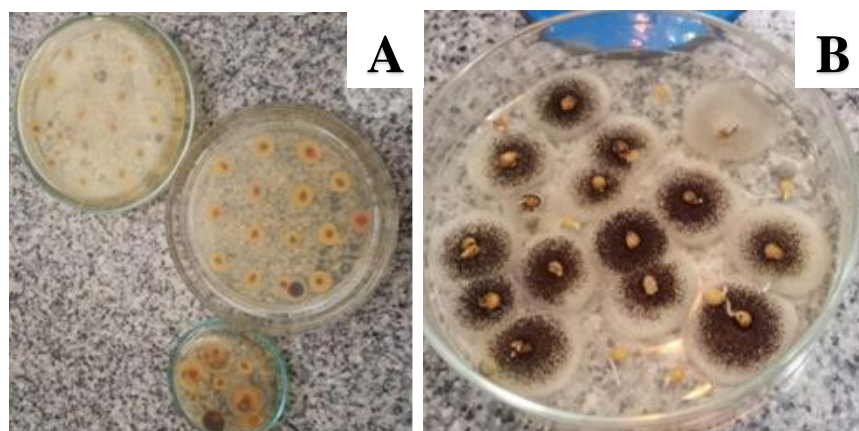


Fig. 3.1 A y B. Desarrollo de microorganismos de origen fúngico en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sin tratamiento químico en medio agar papa glucosado, luego de 7 días de incubación a 24 ± 2 °C, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

El método de papel secante con incubación y posterior congelación permiten el desarrollo de las estructuras fúngicas sin que sean inhibidas por la resistencia natural de la planta (SENASICA, 2018). En la Fig. 3.2 B se observan semillas infectadas, a partir de las cuales se realizaron preparados en fresco para ser observados por microscopía óptica y se pudo constatar la presencia de estructuras fúngicas morfológicamente similares a las de *Alternaria* spp.

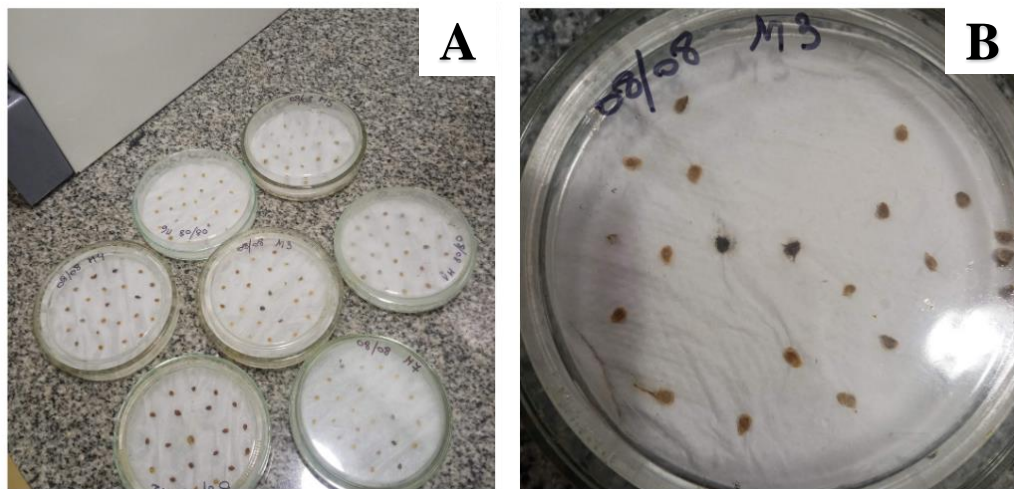


Fig. 3.2 A. Aislamiento de *Alternaria* sp. por Método de papel secante. B. Semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con crecimiento fúngico.

Para continuar con el aislamiento, las semillas infectadas se depositaron en medio APG y fueron incubadas en dos placas de Petri. Los aislamientos fueron nombrados B y C (Fig. 3.3).

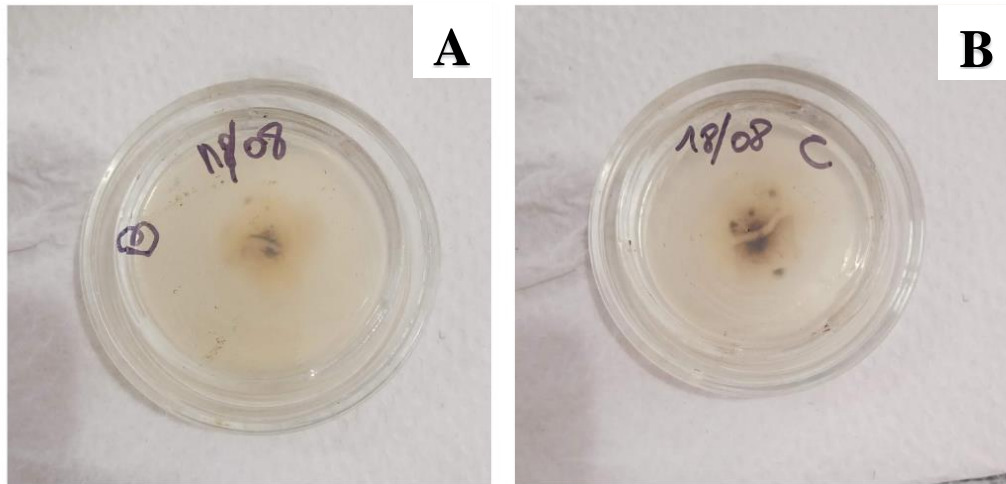


Fig. 3.3 Crecimiento fúngico de *Alternaria* sp. aisladas de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en medio agar papa glucosado. Aislamiento B (A) y C (B).

A partir de cada aislamiento, se realizó un preparado en fresco y se observó en el microscopio óptico las hifas y conidios de las cepas aisladas (Fig. 3.4 y 3.5). Las esporas se observaron pigmentadas, multicelulares, en cadenas o en ramificaciones, más anchas cerca de la base y disminuyendo gradualmente hasta formar un pico alargado. El género *Alternaria* se caracteriza por la formación de conidios polimorfos, solos o en cadenas cortas o más largas y provistas de tabiques longitudinales y oblicuos y picos largos o cortos (Mamgain *et al.*, 2013). Por lo tanto, los aislamientos obtenidos en este estudio coinciden con características del género *Alternaria*.

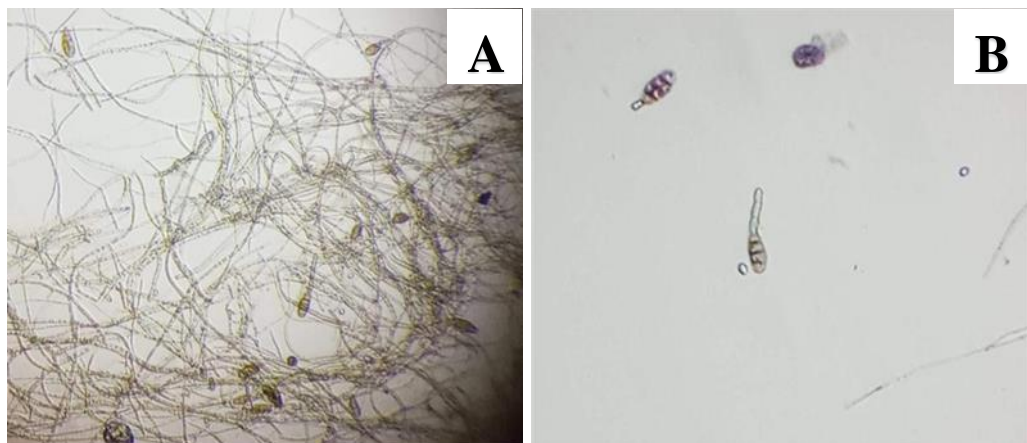


Fig. 3.4 Observación microscópica en 10x (A) y 40x (B). Morfología de hifas y conidios de aislamiento B, proveniente de semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectada.

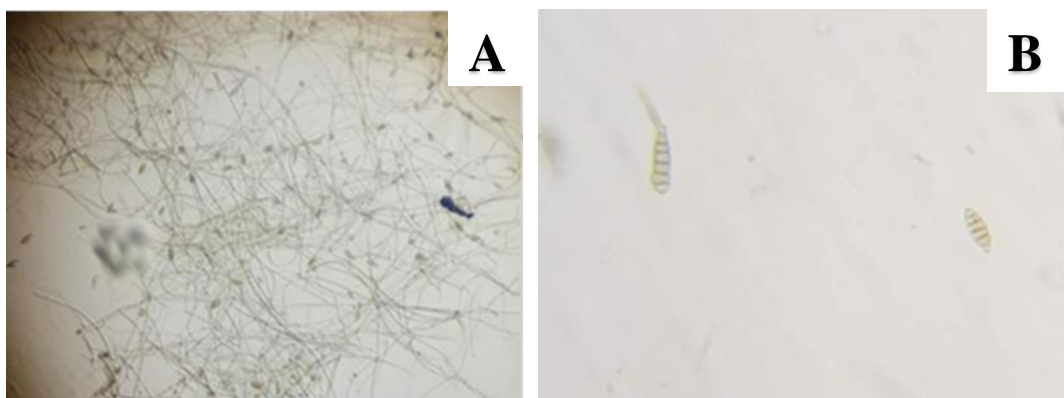


Fig. 3.5 Observación microscópica en 10x (A) y 40x (B). Morfología de hifas y conidios de aislamiento C, a partir de semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectada.

Se observaron colonias de aspecto “lanudo” pero compactas en el envés, de color muy oscuro, coincidente con características de *Alternaria* spp. (Lavhate y Barwant, 2020) (Fig. 3.6).

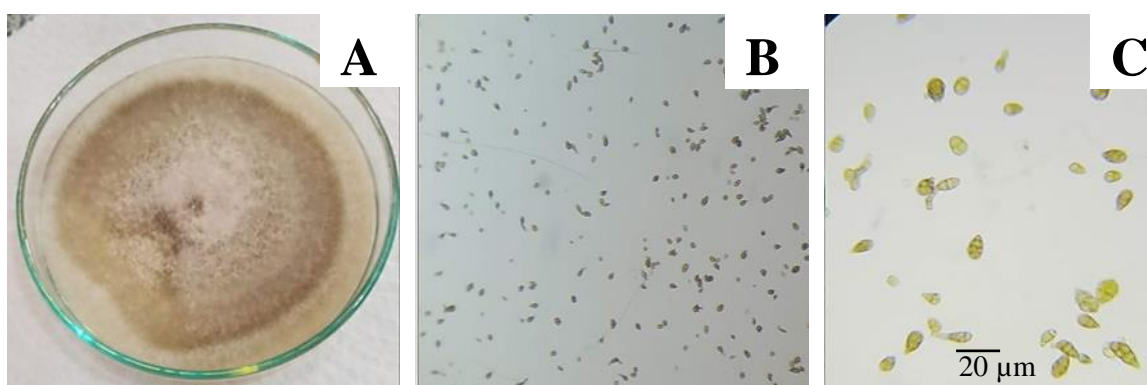


Fig. 3.6 Colonia de *Alternaria* sp., en medio agar papa glucosado (A) y observación microscópica a 10x (B) y 40x (C) de conidios, del aislamiento C.

Se han descrito especies de *Alternaria* spp. de esporas pequeñas como *A. alternata*, *A. tenuissima* Nees & Nees: Fries y *A. arborescens* (syn *A. alternata* f. sp. *lycopersici*). Estas especies pueden causar manchas marrones en las hojas de las papas y cancro en el tallo de cultivares de tomate susceptibles (Kirk *et al.*, 2007). En este trabajo, empleando el método de papel secante, se obtuvieron aislamientos (B y C) compatibles con *Alternaria* spp. con esporas pequeñas.

A partir de frutos de tomate

Para comenzar con los aislamientos, se seleccionaron frutos de tomate (Fig. 3.7) con síntomas necróticos y manchas. Se tomó una pequeña porción de estas regiones, con un ansa estéril y se colocaron en placas con medio APG. Luego fueron incubadas.



Fig. 3.7 Frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con síntomas de Tizón temprano.

En la Fig. 3.8 se observa un fruto de tomate con sintomatología característica del cual se extrajeron los cuerpos fructíferos morfológicamente semejantes a los de *Alternaria* spp. para el aislamiento.



Fig. 3.8 Fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con síntomas característicos de Tizón temprano del cual se aisló la cepa E.

Se observó crecimiento fúngico característico de *Alternaria* spp, el cual se denominó cepa E, cuyo crecimiento se puede observar en la Fig. 3.9.



Fig. 3.9 Colonia de *Alternaria* sp. crecida en medio agar papa glucosado. Cepa E.

En la Fig. 3.10 se observa un extendido del crecimiento de la Cepa E en medio APG, en donde se desarrollaron conidios típicos del género *Alternaria*.

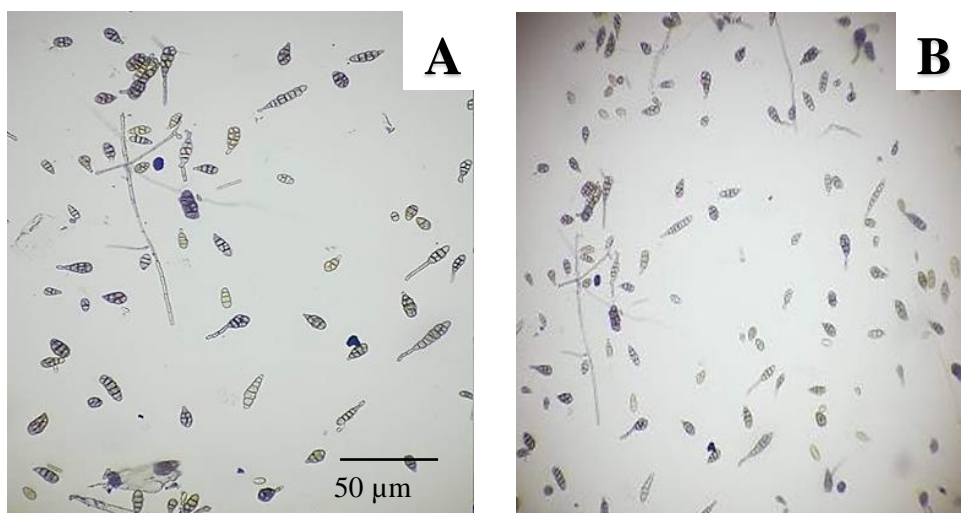


Fig. 3.10 Cepa E. A y B. Observación microscópica a 40 x de conidios de *Alternaria* sp., aislados a partir de fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

De todas las cepas aisladas se determinó únicamente la actividad inhibitoria sobre la cepa E, ya que fue aislada directamente de un tomate con síntomas de Tizón temprano.

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE FUNGICIDA DE SÍNTESIS QUÍMICA SOBRE *ALTERNARIA* SP.

La actividad antifúngica se midió sobre la Cepa E de *Alternaria* sp. Como puede observarse en la Tabla 3.2, el % CIM obtenido fue de 61,50 %.

Tabla 3.2 Diámetro de crecimiento de *Alternaria* sp. y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima del fungicida mezcla: carboxin 20%, metiltiofanato 10%, metalaxil 1,33%.

Tratamiento	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
Control	6,50	-
Fungicida	2,50	61,50

Ref.: % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

Se pudo observar que el fungicida de síntesis probado no inhibió totalmente el crecimiento de la cepa E de *Alternaria* sp. (Fig. 3.11).



Fig. 3.11 Crecimiento de *Alternaria* sp. en placas de agar papa glucosado con fungicida mezcla: carboxin 20%, metiltiofanato 10%, metalaxil 1,33%.

Miles *et al.*, 2013 y Wharton *et al.*, 2012, aislaron cepas de *A. solani* resistentes a los fungicidas boscalid y penthiopyrad, inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI), descubrimiento que sugiere que todos los fungicidas SDHI deben considerarse en alto riesgo de desarrollo de resistencia. Es por esto que resulta importante desarrollar alternativas que no generen resistencia para el control de enfermedades fúngicas en cultivos de importancia agronómica.

El control químico validó la metodología empleada para medir la actividad antifúngica.

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE AE SOBRE *ALTERNARIA SP.*

En las siguientes tablas se detallan % CIM de los tratamientos, por concentración de AE y halo de crecimiento radial, hasta llegar a la CIM (resaltado).

A partir de la concentración de 1,2 mg ml⁻¹ de AE de orégano, se obtuvo un efecto de inhibición total del crecimiento de la cepa E de *Alternaria sp.* quedando así definida la CIM de 1,2 mg ml⁻¹ para el AE de orégano (Tabla 3.3). Sanit (2016), observó una inhibición total de crecimiento micelial de *Alternaria spp.*, en una concentración de 1,0 mg ml⁻¹ de extracto crudo de orégano, coincidiendo con lo obtenido en este trabajo.

Tabla 3.3 Diámetro de crecimiento de *Alternaria sp* y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*).

Aceite esencial de orégano (mg ml⁻¹)	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
Control	7,2	-
0,3	2,8	43,1
0,6	3,6	50
0,9	1,3	82
1,2	s/c	100
1,5	s/c	100

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

En la Fig. 3.12 se observa el crecimiento de *Alternaria sp.* en medio APG, en el control y en concentraciones crecientes de AE de orégano hasta llegar a la CIM.

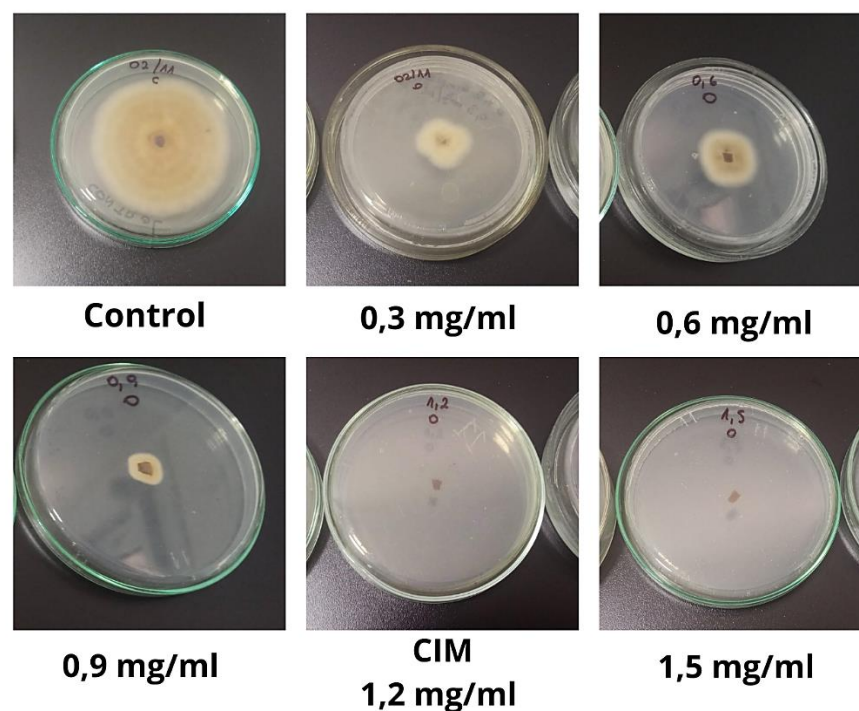


Fig. 3.12 Crecimiento de *Alternaria* sp. en medio agar papa glucosado con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) y en el control.

Resultados similares de inhibición fueron obtenidos cuando se ensayaron varias concentraciones para llegar a la CIM del AE de tomillo, definida en $0,282 \text{ mg ml}^{-1}$ (Tabla 3.4). Bahraminejad *et al.* (2016) observaron inhibición total del crecimiento micelial de *A. solani* utilizando AE de tomillo, coincidiendo con los datos encontrados en este estudio.

Tabla 3.4 Diámetro de crecimiento de *Alternaria* sp y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Aceite esencial de tomillo (mg ml^{-1})	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
Control sin aceite esencial	7,2	-
0,0094	6	7,7
0,0188	6	16,7
0,0282	5,9	18
0,0370	5,8	19,4
0,047	5,7	21

Tabla 3.4 Diámetro de crecimiento de *Alternaria* sp y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (Continuación)

Aceite esencial de tomillo (mg ml ⁻¹)	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
0,094	5,2	34,8
0,141	4,6	38,6
0,188	3,8	49,3
0,235	2,7	64
0,282	s/c	100
0,329	s/c	100

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

Los investigadores Feng y Zheng (2007), Karpinski (2020), Mine y Kose (2015), Puskarova *et al.* (2017) han reportado la susceptibilidad de especies del género *Alternaria*, a los AE de orégano y tomillo, coincidiendo con los resultados de este estudio. Los valores de CIM varían entre las investigaciones anteriores y los resultados de este trabajo, ya que como se mencionó anteriormente los AE presentan varios quimiotipos dentro de una misma especie con diferentes actividades antimicrobianas.

Este trabajo no sólo rectifica resultados de investigaciones previas con respecto a la actividad inhibidora del crecimiento fúngico de estos AE, sino que también aporta una alternativa natural, no contaminante y no generador de resistencia que podría utilizarse en reemplazo de antibióticos u otros antimicrobianos contra hongos fitopatógenos. Además, las formulaciones de productos antifúngicos que podrían obtenerse a partir de los AE serían productos biocontroladores no modificados genéticamente, exentos a sufrir mutaciones, a diferencia de los controladores biológicos basados en microorganismos.

La composición química del AE varía según el órgano del que se extrae el AE. Además, para una misma especie vegetal, el rendimiento y la composición química del AE es muy variable bajo la influencia de varios parámetros, dependiendo del crecimiento y las condiciones de desarrollo de la planta de la que proceden (temperatura, precipitaciones,

humedad, intensidad lumínica), lugar de cultivo (composición del suelo, acidez, contaminación y nutrición mineral) y tiempo de cosecha. Las diferencias en términos de composición química también aparecen entre especies de plantas del mismo género y más precisamente entre variedades de la misma especie vegetal, especialmente en lo que respecta a las proporciones de los principales compuestos (Raveau *et al.*, 2020).

Comparando los resultados obtenidos con el fungicida de síntesis con las actividades inhibitorias de los aceites, se puede decir que la aplicación de los aceites a una concentración determinada (CIM), puede inhibir el crecimiento de la cepa de *Alternaria* sp., mientras que para el fungicida se necesitaría aplicar dosis mayores a las recomendadas por el fabricante, para el mismo efecto sobre la cepa fúngica aislada en este trabajo (Tabla 3.2). El hecho de que los AE presenten mejor capacidad de inhibición del hongo causante del Tizón temprano que los fungicidas de síntesis empleado a la concentración recomendada, abre la posibilidad de formular nuevos compuestos para el control del hongo de origen natural. Estos productos naturales, tienen posibilidades de uso en el tratamiento de semillas para controlar hongos fitopatógenos y poseen el potencial de emplearse como alternativas ambientalmente seguras para la fitoprotección (Duarte *et al.* 2013; Montes Belmont y Moctezuma, 2001). Entre las plantas aromáticas con actividad antimicrobiana reportada, los de la familia *Lamiaceae*, como el orégano y el tomillo, ocupan un lugar destacado (Pierozan *et al.*, 2009) ya que poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, relacionadas al elevado porcentaje de los compuestos fenólicos carvacrol y timol. Los mismos pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Bagamboula *et al.*, 2004; Borboa Flores *et al.*, 2010; Kotan *et al.*, 2007; Soković *et al.*, 2007).

El efecto sobre patógenos fúngicos *in vivo* y sobre las plantas de tomate podría ser objeto de futuras investigaciones. Concordando con Djordjeyic *et al.* (2013) estos AE podrían usarse para inhibir el crecimiento de estos hongos *in vivo* y las plantas aromáticas, ricas en estos aceites, podrían ser parte de una importante estrategia de control.

En los tratamientos cercanos a la CIM, se observó que el crecimiento fúngico fue de color más claro con respecto al control. Se realizó un extendido para observación microscópica, en donde se pudo observar muy poca presencia de conidios e hifas bien claras coincidiendo

a lo observado en las placas (Fig. 3.13). Montes Belmont *et al.* (2000), observaron cambios en la estructura, color y forma de las colonias de *A. porri*, bajo el efecto de extractos vegetales.



Fig. 3.13 Observación microscópica a 40x de crecimiento fúngico en medio agar papa glucosado con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) en una concentración de $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$.

ENSAYOS DE GERMINACIÓN SOBRE SEMILLAS DE TOMATE

Efecto de leche descremada sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate

Se realizaron dos ensayos, el tratamiento control (TC) en donde las semillas entraron en contacto con agua destilada y el tratamiento leche (TL) en donde las semillas entraron en contacto con leche descremada en solución al 5% en agua destilada. En la Fig. 3.14, se observan las plántulas de TL con 14 días de crecimiento.

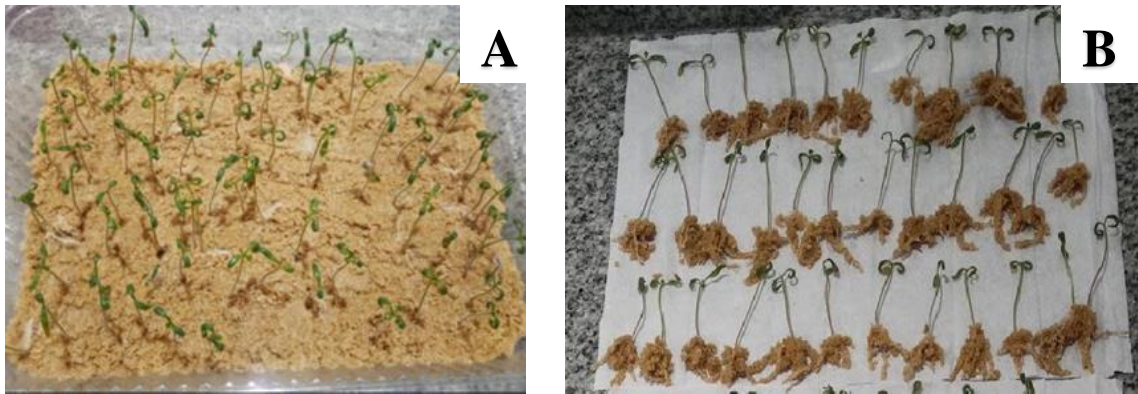


Fig. 3.14 A y B. Plántulas normales de *Solanum lycopersicum* L. del tratamiento con leche descremada al 5%, con 14 días de crecimiento.

Según el análisis estadístico, no se presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos en cuanto al Vigor de las semillas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Comparación del Vigor de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con leche descremada 5% y el control

% Plántulas Normales	
TC	TL
78,50 ^a	82,00 ^a

^aMedias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)
 Ref.: TC: Tratamiento Control. TL: Tratamiento con Leche descremada 5%

Tampoco se presentaron diferencias entre % Plántulas Normales, Anormales y No Germinadas en el segundo conteo (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Poder Germinativo, expresado como Porcentaje de Plántulas Normales de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con leche descremada 5% y el control.

Tratamiento	% Plántulas anormales	% No germinadas	% Plántulas Normales
TC	7,00 ^a	7,50 ^b	85,50 ^c
TL	7,25 ^a	7,50 ^b	85,25 ^c

^{a,b,c}Medias con letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
 Ref.: TC: Tratamiento Control. TL: Tratamiento con leche descremada 5%.

Estos resultados no sólo permitieron descartar el efecto negativo de la leche descremada al 5% sobre la germinación de las semillas, sino que también confirmaron el buen estado fisiológico y Poder Germinativo de las semillas que se utilizaron en los tratamientos posteriores.

Efecto de AE de *O. vulgare* y *T. vulgaris* sobre el Poder Germinativo de semillas de tomate

Los AE de orégano y tomillo demostraron buena capacidad para inhibir el crecimiento fúngico de *Alternaria* sp. *in vitro*. Es por esto, que se evaluó el efecto de ambos AE sobre la germinación de semillas de tomate, considerando que podrían ser incluidos en alguna formulación para evitar el crecimiento fúngico.

Se ha reportado la eficiencia de los AE en el control de patógenos asociados a las semillas, ya que reducen la disponibilidad inicial del inóculo y perjudican la selección de cepas resistentes (Lima *et al.*, 2016).

Un método para analizar la fitotoxicidad de los aceites e hidrolatos de plantas aromáticas, es evaluar el nivel de germinación de las semillas y/o el crecimiento inicial de las plántulas mediante la evaluación del Vigor (Hussain y Reigosa, 2014). Para ello, es necesario investigar la respuesta de diferentes tipos de semillas a los AE (Bowers y Locke, 2000).

Evaluación del Vigor

Comparadas con el tratamiento control, en los tratamientos con los AE las plántulas normales presentaron un desarrollo del sistema radicular más corto y menor cantidad de raíces secundarias, al igual que menor desarrollo del hipocótilo. Estas diferencias se observaron marcadamente en los tratamientos con el AE de tomillo. El desarrollo de los cotiledones no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 3.15).



Fig. 3.15 Plántulas normales de *Solanum lycopersicum* L en A: Tratamiento control. B: Tratamiento con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), C: Tratamiento con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Como puede observarse en la Tabla 3.7, los tratamientos con los AE no afectaron el Vigor de las semillas, ya que el % de Plántulas Normales fue semejante al tratamiento control.

Tabla 3.7 Vigor de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Primer Cuento de Plántulas Normales (valores en porcentaje).

Plántulas Normales %		
Control	AE orégano	AE tomillo
69,75 ^a	67,50 ^a	74,50 ^a

^aMedias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Ref.: AE: Aceite esencial

En el análisis del Primer Cuento se caracterizaron las plántulas anormales. Las plántulas anormales del tratamiento control y del tratamiento con AE de orégano presentaban en general (Fig. 3.16):

- ✓ Anormalidades del sistema radicular: la raíz primaria se encontraba retardada.
- ✓ Anormalidades del sistema del brote: el hipocótilo estaba doblado.
- ✓ Anormalidades de los cotiledones: en su gran mayoría quedaron atrapados en el tegumento de la semilla.

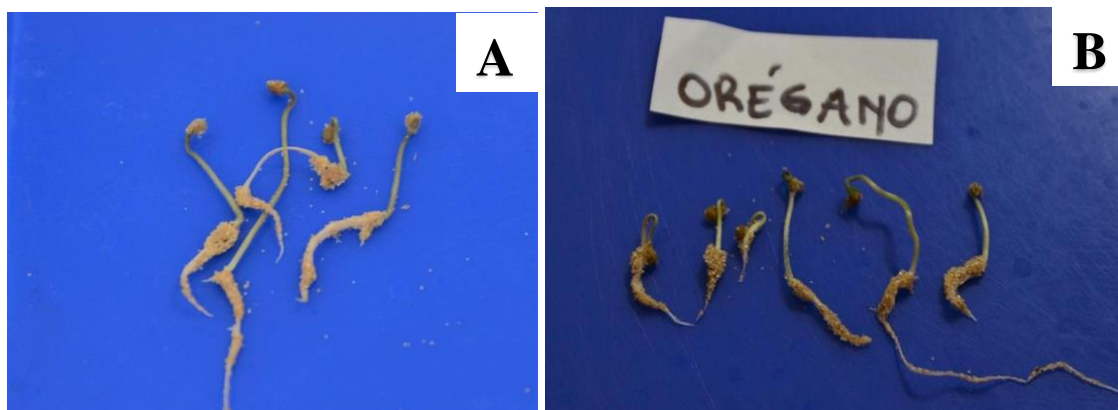


Fig. 3.16 Primer conteo. Plántulas anormales de *Solanum lycopersicum* L del tratamiento control (A) y tratamiento con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (B).

En el tratamiento con AE de tomillo (Fig. 3.17) se presentaron anomalías semejantes a las observadas en orégano, con diferencias marcadas respecto a las no tratadas en cuanto al retraso de crecimiento de la raíz y menor elongación en el hipocótilo.



Fig. 3.17 Primer conteo. Plántulas anormales de *Solanum lycopersicum* L en el tratamiento con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Evaluación del Poder Germinativo

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con AE aplicados a las semillas y el tratamiento control (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Poder Germinativo, expresado como porcentaje de Plántulas Normales, de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Tratamiento	% Plántulas Anormales	% No Germinadas	% Plántulas Normales
Control	5,00 ^b	10,25 ^c	84,75 ^d
AE orégano	3,25 ^b	10,75 ^c	86,25 ^d
AE tomillo	2,25 ^b	11,75 ^c	86,00 ^d

^{b, c, d} Medias con letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Ref.: AE: Aceite Esencial

En la Fig. 3.18, se observan las plántulas normales obtenidas en los tratamientos. Aunque la diferencia no es significativa, se puede ver que las plántulas normales del tratamiento con el AE de tomillo, son un poco más pequeñas.



Fig. 3.18 Plántulas normales de *Solanum lycopersicum* L. A: Tratamiento control. B: Tratamiento con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). C: Tratamiento con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.).

Al igual que en el Primer Conteo las plántulas anormales del tratamiento control y del tratamiento con AE de orégano presentaban en general (Fig. 3.19):

- ✓ Anormalidades del sistema radicular: la raíz primaria se encontraba retardada.
- ✓ Anormalidades del sistema del brote: el hipocótilo estaba doblado.
- ✓ Anormalidades de los cotiledones: atrapados en el tegumento de la semilla.

Por otro lado, en el tratamiento con AE de tomillo se presentaron las mismas anomalías que en los tratamientos anteriores, y al igual que en el primer conteo, las anomalías fueron más marcadas (Fig. 3.19).



Fig. 3.19 Plántulas anormales de *Solanum lycopersicum* L en el tratamiento con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), en el segundo conteo.

En general, las anomalías afectaron en mayor medida al sistema radicular; esto podría explicarse por un efecto de peroxidación lipídica por parte de los AE, en el cual se generan radicales libres, hidroperóxidos orgánicos y reacciones de óxido-reducción. Como los ácidos grasos y otros lípidos son componentes estructurales de la membrana, es razonable suponer que la degradación de las membranas resulta en un aumento de los lípidos libres en el citoplasma de las células afectadas. Estos lípidos pueden ser el objetivo de una acción oxidativa, con lo que se puede establecer una correlación entre la peroxidación lipídica y la inhibición del crecimiento de raíces (Scrivanti *et al.*, 2003).

Ibáñez y Blázquez, (2020) analizaron la fitotoxicidad de AE de orégano y tomillo sobre semillas de tomate, encontrando también una mayor sensibilidad en el crecimiento de la raíz que en el hipocótilo de las plántulas. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron porcentajes de Vigor y Poder Germinativo agrónomicamente aceptables en semillas tratadas con los AE. Los datos de este trabajo coinciden con los obtenidos por Tomazoni *et al.* (2016) respecto al efecto inhibitorio del AE de *L. alba* sobre *A. solani* y la CIM del aceite sobre la germinación de las semillas.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Se logró aislar e identificar *Alternaria* spp en semillas y frutos de tomate aislando e identificando las mismas por técnicas bioquímicas convencionales.

El análisis de la composición química de los aceites esenciales permitió identificarlos por su quimiotipo.

Los aceites esenciales probados en este estudio resultaron con buena actividad inhibitoria sobre la cepa de *Alternaria* sp. aislada y empleada en este trabajo, siendo inhibida por ambos aceites a bajas concentraciones. De los dos aceites evaluados, el de tomillo resultó más efectivo, ya que se necesitó una menor concentración para inhibir totalmente el crecimiento de la cepa fúngica bajo control. Estos resultados indican que los aceites esenciales de tomillo y orégano podrían ser considerados como una alternativa de control frente a la enfermedad conocida como Tizón temprano causada por el hongo *Alternaria* sp.

Las Concentraciones Inhibitorias Mínimas de ambos aceites no produjeron efectos fitotóxicos sobre las semillas de tomate, demostrando que fueron capaces de inhibir al patógeno sin presentar efectos negativos notables sobre la germinación. Por lo tanto, podrían considerarse para controlar el Tizón temprano sin perjudicar el desarrollo de las plántulas.

La metodología y tipo de estudio empleado en este trabajo, puede ser proyectada a otras especies del género del hongo, como de cultivos que se desean proteger.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Dada la necesidad de responder la demanda de consumidores y productores agropecuarios de lograr productividad, rentabilidad y minimizar los efectos negativos de los principios activos de síntesis en la biodiversidad de los agroecosistemas, es importante desarrollar alternativas efectivas para el manejo de enfermedades. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se proponen como futuras líneas de investigación:

a). Evaluar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales sobre diferentes especies del género *Alternaria*, y así probar su acción inhibitoria en otras especies y proteger otros tipos de cultivo.

b). Medir el efecto de los aceites esenciales sobre el desarrollo de las plántulas hasta su estado fenológico adulto, a través de parámetros como materia seca, largo del tallo, de raíces y producción de frutos.

c). Comparar el efecto de aceites esenciales de diferentes quimiotipos, en la inhibición del crecimiento de patógenos fúngicos.

d). Desarrollar una tecnología de aplicación para los productores agropecuarios que deseen proteger sus cultivos con productos naturales.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

- Abiodun, J., Efe-Imafidon, A. E., Benson, O. A. & Ajibola Aluko, P. (2017). Efficacy of selected plant extracts in the management of tomato Early Blight disease caused by *Alternaria solani*. *Asian J. Plant Pathol.*, 11 (1): 48-52. DOI: 10.3923/ajppaj.2017.48.52
- Achimón, F., Brito V., Pizzolitto, P. R., Ramirez Sanchez, A., Gómez E., & Zygadlo, J. A. (2020). Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Revista Argentina de Microbiología*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>.
- Adhikari, P., Oh, Y. & Panthee, D. R. (2017). Current status of Early Blight resistance in tomato: an update. *International Journal Molecular Sciences*. 18, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms18102019>
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, L. (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 62(2), 156-161.
- Andersen, B., Dongo, A., & Pryor, B. M. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*, 2(2), 241–250.
- Arraiza, M. P., González Coloma, A., Berrocal Lobo, A. M. F., Domínguez Núñez, J. A., Da Costa, A., Navarro Rocha, J., & Calderón Guerrero, C. (2018). Antifungal effect of essential oils. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.78008>.
- Asensio, C. M. (2013). *Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 253 pp.
- Asensio, C. M.; Galluci, N.; Oliva, M. M. & Demo, M. S. (2014). Sensory and biochemical preservation of ricotta cheese using natural products. *International Journal of Food Science and Technology*.
- Babagoli, M. A. & Behdad E. (2012). Effects of three essential oils on the growth of the fungus *Alternaria solani*. *Journal of Research in Agricultural Science*, 8(1), 45-57.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M. & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42.

- Bahraminejad, S., Seifolahpour, B. & Amiri, R. (2016). Antifungal effects of some medicinal and aromatic plant essential oils against *Alternaria solani*. *J. Crop Prot.*, 5(4), 603-616. doi: 10.18869/modares.jcp.5.4.603.
- Bansod, S. & Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, 3(2), 81-88.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Bessadat, N., Hamon, B., Bataille S. N., Mabrouk, K. & Simoneau, P. (2020). *Alternaria telliensis* sp. Nov., a new species isolated from *Solanaceae* in Algeria. *Phytotaxa*, 440(2), 89–100.
- Bessadat, N., Hamon, B., Henni, J. E., & Simoneau, P. (2015). First report of tomato early blight caused by *Alternaria grandis* in Algeria. *Plant Disease*, 100(2).
- Blancard, D. (2012). *Tomato diseases: identification, biology and control: A Colour Handbook*. London, UK.
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 5-16.
- Borboa Flores, J., Rueda Puente, O., Acedo F. E., Ponce J., Cruz Villegas, M., García Hernández, J. & Ortega Nieblas, M. (2010). Evaluation of antibacterial activity in vitro of essential oils vs *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 12, 539-547.
- Bowers, J. H. & Locke, J.C. (2000). Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Disease*, 84, 300-305.
- Cameroni G. (2013). Ficha Técnica de Orégano "*Origanum vulgare*". https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/productos/Oregano_2013_03Mar.pdf
- Carezzano, M. E., Sotelo, J. P., Primo, E., Reinoso, E. B., Paletti Rovey, M. F., Demo M. S., Giordano, W. F. & Oliva M. de las M. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*, 19, 599- 607.
- Carmona, M. & Sautua F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y Ambiente*. Facultad de Agronomía UBA, 37(1), 1-19.
- Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A. J. & Restrepo, S. (2007). Biotic constraints of the *Solanaceae* caused by *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 320-329.

- Costa Becheleni, F. R., Del Toro Sánchez, C. L., Wong Corral, F. J., Robles Burgueño, M. R., Cárdenas López, J. L. & Borboa Flores, J. (2020). Aceites esenciales para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) y efecto sobre la calidad del grano de maíz *Zea mays* Linnaeus (Poales: Poaceae). *Revista Chilena de Entomología*, 46(4), 639-652.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
- Cuzco Bobadilla, C. & Chico Ruíz J. (2015). Antifungal effect of *Origanum vulgare* essential oil on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*. *Sagasteguiana*, 3(1), 79-86.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvator, E. G., Battinelli, L. & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43, 391-396.
- Dal Bello, G. & Sisterna, M. (2010). Use of plant extracts as natural fungicides in the management of seedborne diseases. *Management of Fungal Plant Pathogens*, 51- 66.
- Davidenco, V. (2015). Aspectos ecofisiológicos que determinan la productividad del cultivo de orégano (*Origanum* spp.) en ecotipos de arquitectura contrastante. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 154 pp.
- Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101–109.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Agricultural and food chemistry*, 55, 4863-4870.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. InfoStat versión (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F. & Dalla Rizza, M. (2011). Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, 71(2), 231-239.
- Djordjevic, M., Djordjevic, O., Djordjevic, R., Mijatovic, M., Kostic, M., Todorovic, M. & Ivanovic, M. (2013). Alternative approach in control of tomato pathogen by using essential oils in vitro. *Pakistan Journal of Botany*, 45(3), 1069-1072.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M. C. & Martínez, B. (2013). Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Protección Vegetal*, 28(1), 54-59.
- El Rasheed, S., L., & El Rasheed, A., S. (2017). Vegetable diseases control by using essential oils to access organic production in Sudan. *Agri Res & Tech: Open Access*

J, 6(4).

- Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, 18(9), 1126-1130.
- Fraser, J. T. & Zitter, T. A. (2003). Two species of *Alternaria* cause early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Phytopathology*, 93, 3.
- Gannibal, P. B., Orina, A. S., Mironenko, N. V. & Levitin, M. M. (2014). Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 609–623.
- Gil, A. (2005). Cedrón: Abordaje desde la investigación para el desarrollo del cultivo en la Argentina. *Plantas aromáticas y medicinales y sus derivados industriales*. 1: 81.
- Goussous, S. J., Abu el-Samen, F. M. & Tahhan, R. A. (2010). Antifungal activity of several medicinal plants extracts against the early blight pathogen (*Alternaria solani*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(17), 1745-1757. DOI: 10.1080/03235401003633832
- Hussain, M.I. & Reigosa, M. (2014). Evaluation of herbicide potential of sesquiterpene lactone and flavonoid: impact on germination, seedling growth indices and root length in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 995-1000.
- Ibáñez, M., D., & Blázquez M.A. (2020). Phytotoxic effects of commercial essential oils on selected vegetable crops: cucumber and tomato. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100209>
- ISTA (2017). International Rules for Seed Testing. Edición 2017. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- ISTA (2018). International Rules for Seed Testing. Edición 2018. Handbook of seedling evaluation. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- ISTA (2022). International Rules for Seed Testing. Edición 2022. Capítulo 7: Validated Seed Health Testing Methods. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- Karpinski, T. M. (2020). Essential oils of *Lamiaceae* family plants as antifungals. *Biomolecules*, 10, 103. doi:10.3390/biom10010103.
- Kirk, W.W., Schafer, R.L., Tumbalan, P., & Wharton, P. (2007). Evaluation of fungicide programs for potato early blight and brown leaf spot control. *Plant Disease Management Report*, 2(65), 1-2.
- Kotan, R., Dadasoglu, F., Kordali, S., Cakr, A., Dikbas, N. & Cakmakc, R. (2007).

- Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. *Journal of Agricultural Technology*, 3(2), 299-306.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- Lamichhane, J. R., Saaydeh, S. D., Kudsk, P. & Messeén, A. (2015). Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10-24.
- Lavhate, N., & Barwant, M. (2020). Screening and isolation of fungal pathogens *Alternaria solani* and *Fusarium oxysporium*. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 5.
- Lima, C.B., Lopes, L., Rentschler, A., Bueno, J. T. & Boaventura, A. C. (2016). Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). *Ciência Rural, Santa Maria*, 46(5), 764-770.
- Lo Cantore, P., Iacobellis, N., De Marco, N., Capasso, F., & Senatore, F. (2004). Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal. Agricultural. Food Chemistry*, 52, 7862-7866.
- Lopez Luengo, M. T. (2006). Tomillo: Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Ámbito farmacéutico. Fitoterapia*, 25(1), 74-77.
- Mamgain, A., Roychowdhury, R. & Tah, J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Res. J. Biol.*, 1, 01-09.
- Miles, T. D., Fairchild, K. L., Merlington, A., Kirk, W., Rosenzweig, N. & Warton, P. S. (2013). First report of boscalid and penthiopyrad-resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Michigan. *Plant Dis.*, 97(12), 1655. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0279-PDN.
- Mine, S. & Kose, F. (2015). Antifungal activities of essential oils against citrus black rot disease agent *Alternaria alternata*. *Journal of Essential Oil. Bearing Plants*, 18, 894-903.
- Montes Belmont, R., & Moctezuma, H., E. F. (2001). Combate de *Fusarium thapsinum* y *Claviceps africana* mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales. *Manejo Integrado de Plagas*, 61, 23-30. Costa Rica.
- Montes Belmont, R., Cruz Cruz, V., Martínez Martínez, G., Sandoval García, G., García Licona, R., Zilch Domínguez, S., Bravo Luna, L., Bermúdez Torres, K., Moctezuma, H.E.F., & Carvajal Moreno, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18, 125- 131.

- Moreno Velázquez, M., Yáñez Morales, M. J., Rojas Martínez, R. J., Zavaleta Mejía, E. & Santos, T. A. (2005). Diversidad de hongos en semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 111-118.
- Msaada, K.; Hosni, K.; Ben Taarit, M.; Chahed, T.; Kchouk, M. E. & Marzouk, B. (2007). Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry*, 102: 1131-1134.
- Oliva, M. de las M., Carezzano, M. E., Giuliano, M., Daghero, J., Zygadlo J., Bogino, J., Giordano, W. & Demo, M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, 17, 758-765.
- Paz, R., Sita, N., Polanco Aballe, A. G., Reyes Gómez, S. & Pavel, N. (2013). Comportamiento del tizón temprano del tomate (*Alternaria solani*) en las condiciones del municipio de Holguín, Cuba. *Fitosanidad*, 17(2), 75-81.
- Perelló, A., Gruhlke, M., & Slusarenko, A. (2013). Effect of garlic extract on seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat. *Journal of Plant Protection Research*, 53(4), 319-323.
- Perveen, S. & Ghaffar, A. (1995). Seedborne mycoflora of tomato. *Pakistan Journal Botanical*, 27(1), 201-208.
- Pierozan, M., Pauletti, G., Rota, L., Santos, A., Lerin, L., Di Luccio, M., Mossi, A., Atti-Serafini, L., Cansian, R. & Oliveira, J. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 29(4), 764-770.
- Puskarova, A., Bučková1, M., Kraková, L., Pangallo, D. & Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7, 8211. doi:10.1038/s41598-017-08673-9
- Radulović, N., Mišić, M., Aleksić, J., Doković, D., Palić, R. & Stojanović, G. (2007). Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. *Fitoterapia*, 78, 565–570.
- Raveau, R., Fontaine, J. & Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. *Foods*, 9(365).
- Rodrigues, T. T. M. S., Berbee, M. L., Simmons, E. G., Cardoso, C. R., Reis, A., & Maffia, L. A. (2010). First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease. Reports*, 22, 28. doi:10.5197/j.2044-0588.2010.022.028
- Rota, M., Herrera, A., Martínez, R., Sotomayor, J. & Jordán, M. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19, 681–687.

- Sajid, A., Irshad, G., Naz, F., Ghuffar, S., Hassan, I., Mahmood, N., Rani, K., Manzoor, M.F., Meesam, A., Hamzah, A. M. & Karamt, M. Z. (2020). In vitro evaluation of plant essential oils against *Alternaria alternata* causing fruit rot of grapes. *Asian J Agric & Biol.* 8(2), 168-173.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum Kunth* (Caisimón de anís). *Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- Sanit, S. (2016). Antifungal activity of selected medicinal plants against *Alternaria* species: The pathogen of dirty panicle disease in rice. *J. Med. Plants Res.*, 10(15), 195-201. doi: 10.5897/JMPR2013.5117.
- Santamarina, M.P.; Roselló, J.; Sempere, F.; Giménez, S. & Blázquez, M.A. (2015). Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Nat. Prod. Res.* 29, 2215–2258. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1002406>
- Schelz Z., Molnar J., & Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279–285.
- Scrivanti, R.L., Zunino, M.P., & Zygadlo, J.A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 563-572.
- Segvić Klarić, M.; Kosalec, I.; Mastelić, J.; Piecková, E. & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 36–42
- Senanayake, I.C., Rathnayaka, A. R., Marasinghe, D.S., Calabon, M.S., Gentekaki, E., Lee, H.B., Hurdeal, V. G., Pem, D., Dissanayake L. S., Wijesinghe, S. N., Bundhun, D., Nguyen, T. T., Goonasekara, I. D., Abeywickrama, P. D., Bhunjun, C. S., Jayawardena, R. S., Wanasinghe, D. N., Jeewon, R., Bhat, D. J. & Xiang, M. M. (2020). Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere* 11(1), 2678–2754. doi 10.5943/mycosphere/11/1/20.
- SENASICA. (2018). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. *Protocolo de Diagnóstico: Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas*. Tecámac, México.
- Simmons, E. G. (2000). *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon*, 75, 1–115.
- Soković, M., Marin, P., Brkić, D., & Griensven, L. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food Global Science Books*.
- Suhr, K.I., & Nielsen, P.V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied*

Microbiology, 94, 665–674.

- Thiesen, A. L., Schmid, D., Marques Pinheiro, M. V., Holz, E., Stringari Altissimo, B., & Holz, E. (2019). Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. influences the germination, vigor and emergence of lettuce seeds. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 416-425.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 859-880
- Tolocka P. A., Doucet, M. E., Lax, P. & Bima P. (2011). Plaga oculta que afecta al cultivo de plantas aromáticas en la Argentina. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV). Trabajos del Tomo LXV*. 49-62
- Tomazoni, E. Z., Pansera, M. R., Pauletti, G. F., Moura, S., Ribeiro, R. & Schwambach, J. (2016). In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (*Verbenaceae*) essential oils against *Alternaria solani* (*Pleosporaceae*) isolates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 999-1010.
- Tripathi, P. & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 3, 235-245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>.
- Verdeguer Sancho, M. (2011). Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Villavicencio Gastelú, J.E., Moromi Nakata, H., Salcedo Moncada, D., Pineda Mejía, M., Ramos Perfecto, D., Zambrano de la Peña, L.S., Martínez Cadillo, E.E., Mendoza Rojas, G.A., Petkova Gueorguieva, M., & Bardales Álvarez, R. M. (2016). Antifungal effect in vitro of *Origanum Vulgare* in *Candida albicans* strains. *Odontol. Sanmarquina*, 19(2), 5-8.
- Viuda Martos, M., Mohamady, M., Fernández López, J., Abd ElRazik, K., Omer, E. & Pérez Alvarez, J. (2011). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils. *Egyptian aromatic plants. Food Control*, 22, 1715-1722.
- Wharton, P., Fairchild, K., Belcher, A. & Wood E. (2012). First report of in vitro boscalid resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Idaho. *Plant Disease* 96(3): 454. doi: 10.1094/PDIS-07-11-0544
- Zygadlo, J. A. & Juliani, H. R. (2000). Bioactivity of essential oil components. *Current topics in Phytochemistry*, 3, 203-214.

ANEXO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

TRATAMIENTOS: CONTROL AGUA Y CONTROL LECHE DESCREMADA 5%.

Medidas resumen

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
CA	Normales 5 días	4	78,50	3,79	73,00	81,00
CA	Anormales 5 días	4	7,25	2,22	5,00	10,00
CA	No germinadas 5 días	4	14,25	3,40	11,00	19,00

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
CA	Normales 14 días	4	85,50	1,73	84,00	88,00
CA	Anormales 14 días	4	7,00	1,41	6,00	9,00
CA	No germinadas 14 días	4	7,50	1,91	6,00	10,00

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
CL	Normales 5 días	4	82,00	2,58	79,00	85,00
CL	Anormales 5 días	4	9,50	2,08	7,00	12,00
CL	No germinadas 5 días	4	8,50	3,11	5,00	12,00

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
CL	Normales 14 días	4	85,25	1,71	83,00	87,00
CL	Anormales 14 días	4	7,25	1,71	5,00	9,00
CL	No germinadas 14 días	4	7,50	2,89	5,00	10,00

Análisis de la varianza

Normales 5 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Normales 5 días	8	0,28	0,16	4,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24,50	1	24,50	2,33	0,1775
Tratamiento	24,50	1	24,50	2,33	0,1775
Error	63,00	6	10,50		
Total	87,50	7			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,60658

Error: 10,5000 gl: 6 Tratamiento

Medias n E.E.

CA 78,50 4 1,62 A

CL 82,00 4 1,62 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Normales 14 días

Variable N R² R² Aj CV
Normales 14 días 8 0,01 0,00 2,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,13	1	0,13	0,04	0,8439
Tratamiento	0,13	1	0,13	0,04	0,8439
Error	17,75	6	2,96		
<u>Total</u>	<u>17,88</u>	<u>7</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,97596

Error: 2,9583 gl: 6 Tratamiento

Medias n E.E. CL 85,25 4
0,86 A

CA 85,50 4 0,86 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anormales 14 días

Variable N R² R² Aj CV
Anormales 14 días 8 0,01 0,00 22,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,13	1	0,13	0,05	0,8291
Tratamiento	0,13	1	0,13	0,05	0,8291
Error	14,75	6	2,46		
<u>Total</u>	<u>14,88</u>	<u>7</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,71284

Error: 2,4583 gl: 6 Tratamiento

Medias n E.E. CA 7,00 4 0,78 A

CL 7,25 4 0,78 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

No germinadas 14 días

Variable N R² R² Aj CV No germinadas 14 días 8 0,00 0,00 32,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor
Modelo 0,00 1 0,00 0,00 >0,9999

Tratamiento 0,00 1 0,00 0,00 >0,9999

Error 36,00 6 6,00

Total 36,00 7

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,23818

Error: 6,0000 gl: 6 Tratamiento

Medias n E.E. CA 7,50 4 1,22 A

CL 7,50 4 1,22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

TRATAMIENTOS: CONTROL LECHE DESCREMADA 5%, AE DE ORÉGANO, AE DE TOMILLO. PRIMER CONTEO.

Medidas resumen

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
C	Normales 5 días	4	69,75	6,70	63,00	76,00
O	Normales 5 días	4	67,50	7,37	59,00	77,00
T	Normales 5 días	4	74,50	9,04	63,00	85,00

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV

Normales 5 días 12 0,16 0,00 11,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V. SC gl CM F p-valor

Modelo 102,17 2 51,08 0,85 0,4602

Tratamiento	102,17	2	51,08	0,85	0,4602
Error	542,75	9	60,31		
<u>Total</u>	<u>644,92</u>	<u>11</u>			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=12,42185

Error: 60,3056 gl: 9

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
O	67,50	4	3,88 A
C	69,75	4	3,88 A
<u>T</u>	<u>74,50</u>	<u>4</u>	<u>3,88 A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba T para muestras Independiente

Variable:Normales 5 días - Clasific:Tratamiento - prueba:Bilateral

	<u>Grupo 1 Grupo 2</u>	
	C	O
n	4	4
Media	69,75	67,50
Media(1)-Media(2)	2,25	
LI(95)	-9,94	
LS(95)	14,44	
pHomVar	0,8794	
T	0,45	
<u>p-valor</u>	<u>0,6674</u>	

Variable:Normales 5 días - Clasific:Tratamiento - prueba:Bilateral

	<u>Grupo 1 Grupo 2</u>	
	C	T
n	4	4
Media	69,75	74,50
Media(1)-Media(2)	-4,75	
LI(95)	-18,52	
LS(95)	9,02	
pHomVar	0,6356	
T	-0,84	
<u>p-valor</u>	<u>0,4308</u>	

Variable: Normales 5 días - Clasific: Tratamiento - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	O	T
n	4	4
Media	67,50	74,50
Media(1)-Media(2)	-7,00	
LI(95)	-21,27	
LS(95)	7,27	
pHomVar	0,7458	
T	-1,20	
<u>p-valor</u>	<u>0,2752</u>	

TRATAMIENTOS: CONTROL LECHE DESCREMADA 5%, AE DE ORÉGANO, AE DE TOMILLO.SEGUNDO CONTEO.

Medidas resumen

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
	Normales 14 días	4	84,75	0,96	1,13	84,00	86,00
C							
C	Anormales 14 días	4	5,00	0,82	16,33	4,00	6,00
C	No germinadas 14 días	4	10,25	1,26	12,28	9,00	12,00
O	Normales 14 días	4	86,25	1,26	1,46	85,00	88,00
O	Anormales 14 días	4	3,25	2,22	68,23	0,00	5,00
O	No germinadas 14 días	4	10,75	0,96	8,91	10,00	12,00
T	Normales 14 días	4	86,00	0,82	0,95	85,00	87,00
T	Anormales 14 días	4	2,25	0,96	42,55	1,00	3,00
T	No germinadas 14 días	4	11,75	1,26	10,71	10,00	13,00

Normales 14 días

Variable	N	R ²	R ² Aj
CV Normales 14 días	12	0,35	0,21
			1,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,17	2	2,58	2,45	0,1417
Tratamiento	5,17	2	2,58	2,45	0,1417
Error	9,50	9	1,06		

Total 14,67 11

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=2,02835 Error: 1,0556

gl: 9 Tratamiento Medias n

E.E.

C	84,75	4	0,51	A
T	86,00	4	0,51	A
O	86,25	4	0,51	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anormales 14 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Anormales 14 días	12	0,44	0,32	42,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15,50	2	7,75	3,58	0,0719
Tratamiento	15,50	2	7,75	3,58	0,0719
Error	19,50	9	2,17		
Total	35,00	11			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=2,90601 Error: 2,1667

gl: 9 Tratamiento Medias n

E.E.

T	2,25	4	0,74	A
O	3,25	4	0,74	A
C	5,00	4	0,74	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

No germinadas 14 días

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
No germinadas 14 días	12	0,28	0,11	10,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo	4,67	2	2,33	1,71	0,2340
Tratamiento	4,67	2	2,33	1,71	0,2340
Error	12,25	9	1,36		
<u>Total</u>	<u>16,92</u>	<u>11</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=2,30329 Error: 1,3611

gl: 9 Tratamiento Medias n

E.E.

C 10,25 4 0,58 A

O 10,75 4 0,58 A

T 11,75 4 0,58 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)