

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

Luciano Rafael Casacchia Sassone

Trabajo Final de Grado presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

Tutora: María C. Sandoval

E-mail: luciano.casacchia@hotmail.com

Resumen

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

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

Introducción

Hongos de suelo

En los sistemas agrícolas los fitopatógenos fúngicos de suelo pueden atacar a nivel de la rizósfera, infectar tallos y partes aéreas de la planta provocando pérdidas millonarias a nivel mundial (National Academy of Sciences, 1980). Los hongos constituyen el grupo de microorganismos que produce mayor número de enfermedades. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie fúngica y un mismo hongo puede atacar a más de una especie vegetal (National Academy of Sciences, 1980).

Algunos hongos fitopatógenos son específicos y su distribución está restringida. Sin embargo, otros tienen gran capacidad de adaptación y se comportan como cosmopolitas (Cook y Baker, 1983).

Según FAO (2012) las plagas y enfermedades causan importantes pérdidas en la producción agrícola. En este contexto los fitopatógenos fúngicos habitantes del suelo y sustratos cumplen un rol de gran relevancia (Villa-Martínez *et al.*, 2015). En los suelos agrícolas es común la presencia de fitopatógenos de géneros de *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Phytophthora spp.*, y *Colletotrichum spp.*, entre otros, agentes causales de patologías que generan grandes pérdidas económicas (Gohel *et al.*, 2006).

Para manejar la carga de hongos patógenos que se encuentran en el suelo y/o sustratos el control químico es la alternativa más utilizada (Rubio *et al.*, 2008). El excesivo empleo de agroquímicos tiene repercusiones negativas en la salud humana (Whalen *et al.*, 2003), resulta contraproducente para los organismos benéficos y puede generar inconvenientes en la exportación de granos, frutas y verduras por la presencia de residuos (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuellar, 2002). Sumado a esto, el uso inapropiado induce resistencia de los patógenos a los principios activos de los fungicidas (Bajwa *et al.*, 2003).

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

En este contexto, las alternativas naturales surgen como una posible solución al problema. Además de su capacidad antimicrobiana es destacable su carácter biodegradable, el bajo impacto negativo en el ambiente y la mínima toxicidad que puede producir en la salud humana (Bravo *et al.*, 2000). Sea cual fuere la estrategia de manejo, es importante que su aplicación sea sencilla, eficiente y de nula toxicidad en la salud (Naeini *et al.*, 2010).

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

***Phytophthora capsici* Leonian**

P. capsici, es un Oomycete patógeno de distintas especies de las familias solanáceas y cucurbitáceas (Pavon y Babadoost, 2006). La enfermedad de mayor relevancia económica producida por el patógeno es la "tristeza del pimiento" (García Morato, 1996). El término "tristeza" alude a una sintomatología y no a un agente patógeno concreto (Palazón y Palazón, 1989). Los tejidos pierden turgencia y en consecuencia ocurre un marchitamiento total o parcial, disminuye la intensidad del color verde y hay menor desarrollo global del cultivo. Por consiguiente, la tristeza sea cual fuere la causa, está relacionada a un desequilibrio hídrico en la planta (Palazón y Palazón, 1989). Cuando la enfermedad es causada por *P. capsici*, el ataque puede ocurrir en cualquier etapa fenológica, pero es crítica durante la fructificación (García Morato, 1996). La enfermedad ocurre en dos etapas, al principio en la etapa biotrófica no se observan síntomas y posteriormente en la etapa necrotrófica hay colapso y muerte de células. García Morato (1996) sostiene que *P. capsici* tiene una temperatura base de desarrollo de 11° C, una máxima de 35° C y un rango óptimo de 25 a 28° C además indica que la velocidad de crecimiento y desarrollo es mayor cuando la humedad es elevada. El método de diseminación principal es el agua de riego o escorrentía (Schlub, 1983) que transporta los zoosporangios que maduran y desprenden zoosporas (Erwin y Ribeiro, 1996). En cuanto al manejo de la enfermedad, es posible prevenir, pero no curar (García Morato, 1996). El agua de riego resulta un factor clave para controlar la enfermedad, es preferible que se realicen riegos por goteo o aspersión poco intensos y muy frecuentes (Chew Madinaveitia *et al.*, 2008). La rotación de cultivos es muy importante (Mármol, 2010). En cuanto al control biológico, microorganismos autóctonos que se comporten como antagonistas podrían ser una alternativa a los productos químicos (Ezziyani, 2004). En cuanto al control químico, este debe iniciarse en el tratamiento de las plántulas antes de trasplantar al lugar definitivo. El procedimiento consiste en sumergir las raíces unos minutos en una mezcla de los funguicidas captán y metalaxil (Chew Madinaveitia *et al.*, 2008).

***Rhizoctonia solani* Kuhn.**

En 1858 se reportó por primera vez una descripción de *R. solani* Kuhn causando enfermedad en papa (Kuhn, 1858). Este Basidiomycota está distribuido en todo el mundo, se comporta como patógeno de diversos cultivos (Parmeter *et al.*, 1969), como saprófito bajo determinadas condiciones y algunas cepas conviven en simbiosis con orquídeas (Sneh *et al.*, 1996; Pope y Carter, 2001).

Si bien su morfología es sencilla, su fisiología y características como hongo presentan una complejidad que dificultan la determinación de su taxón (Parmeter *et al.*, 1969). La diferenciación en grupos se basa en la ocurrencia o ausencia de compatibilidad vegetativa entre los hongos (anastomosis). De este modo, quedan diferenciados grupos anastomóticos considerados entre ellos como poblaciones genéticamente distintas (Ogoshi, 1987; Parmeter *et al.*, 1969). Las distintas cepas poseen células somáticas multinucleadas, desarrollan esclerocios indiferenciados, no forman esporas asexuales (conidios) y las estructuras sexuales rara vez aparecen e inclusive son difíciles de inducir experimentalmente (Ogoshi, 1987; Parmeter y Whitney, 1970). El anamorfo es *R. solani* y el teleomorfo ha sido designado como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk para la mayoría de los grupos anastomóticos del hongo (AG) (González-Hernández, 2002). Se clasifica como basidiomycete porque bajo determinadas condiciones el teleomorfo produce basidiosporas (Tovar Castaño, 2008).

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

La temperatura óptima para la infección oscila entre 15 a 18° C (Agrios, 2005). La diseminación es más efectiva cuando el suelo es húmedo y ácido. Frente a condiciones adversas tiene la capacidad de comportarse como saprófito y logra sobrevivir por la formación de esclerocios que a su vez se comportan como fuente de inóculo para iniciar la enfermedad (Prado *et al.*, 2001). Desde estas estructuras de resistencia se emite micelio que ataca la superficie externa del hospedante (Ceresini, 1999). Después de este primer ataque el hongo forma apresorios que penetran las células del hospedante y absorben sus nutrientes para continuar su crecimiento y desarrollo (Ceresini, 1999). Como resultado se produce la muerte celular y las hifas comienzan a colonizar el tejido muerto pudiendo formar más esclerocios. Posteriormente se produce el nuevo inóculo dentro o fuera del tejido hospedero y se repiten nuevos ciclos (Ceresini, 1999).

Tiene gran relevancia en cultivos intensivos sobre los que puede provocar damping-off o caída de plántulas producto de un estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel del cuello de las plantas. Disminuye el vigor del cultivo y la producción de tubérculos en el caso puntual de la papa (Cedeño *et al.*, 2001). Cuando se comporta como patógeno causa distintos síntomas incluyendo damping-off pre y post-emergente, quema foliar y podredumbre de raíces y coronas (Sneh *et al.*, 1998). Para controlar la enfermedad es recomendable que la densidad de siembra o plantación sea tal que permita la circulación de aire entre plantas y en el suelo. En cultivos hortícolas y florícolas los sustratos deben ser esterilizados con cualquier método físico o químico, tienen que drenar bien y si es posible, las semillas tienen que sembrarse en zonas elevadas (Agrios, 2005). En cuanto al control biológico especies del género *Trichoderma* funcionan como antagonistas de *R. solani* (Harman *et al.*, 2004). Como fungicidas de contacto se emplean iprodione y clorotalonil, como sistémicos carboxina, tradimefon y tiofanato de metilo (Agrios, 2005).

Fusarium solani

Las especies del género *Fusarium* son Ascomycetes de amplia distribución y tienen gran relevancia desde el punto de vista agrícola. Su ocurrencia es cosmopolita y las especies que lo componen son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Algunas especies son capaces de sintetizar toxinas que afectan al hombre y los animales (Booth, 1971). También hay benéficas y útiles para el control biológico de determinados hongos y otras se emplean como micoherbicidas por su capacidad para destruir malezas (Nelson *et al.*, 1990).

Las especies patogénicas del género producen enfermedades destructivas en ornamentales, en cultivos hortícolas bajo cubierta y en explotaciones extensivas (Tjamos y Beckman, 1989), las especies de este grupo son capaces de producir marchitez, tizones, manchas foliares y pudriciones en raíces, tallos, frutos, granos y semillas de cualquiera de estos cultivos (Ma *et al.*, 2013; Nelson *et al.*, 1990). Los ataques del hongo generalmente inician con una colonización de las hifas en el tejido vascular de raíces y tallo, luego los conidios se transportan por la planta a través de la corriente transpiratoria. Inicialmente se manifiesta una clorosis y se distorsionan las hojas bajas. Ocurre una marchitez y se presenta una decoloración vascular y necrosis de los tallos. A medida que el patógeno avanza progresa la enfermedad culminando con la muerte del hospedante. El daño que generan en el huésped por lo común es de carácter irreversible provocando pérdidas económicas de gran relevancia (García *et al.*, 2007). Crece en el suelo, donde se comporta como saprófito sobre residuos de especies hospedantes. También desarrolla de manera saprofítica en la rizósfera del hospedante antes de invadirlo. Se disemina a través de esporas y trozos de micelio (Sanabria *et al.*, 2002). Se caracteriza por formar clamidosporas, como estructuras de

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

resistencia, con forma redonda a oval de pared gruesa lisa o levemente rugosa, en pares terminales o intercaladas constituidas por una o dos células (Agrios, 2005). En cuanto al manejo, este incluye la esterilización del suelo en invernáculos por solarización, utilización de vapor de agua caliente, o cualquier otro método junto con la utilización de materiales de propagación sanos. Sin embargo, debido a su fácil diseminación es necesaria una fumigación con Captafol después de realizar la esterilización. La roturación del suelo a 25-30 cm previa siembra, también disminuye la incidencia, así como la rotación con cultivos no hospedantes. Deben utilizarse variedades con buen comportamiento frente a la enfermedad y materiales de propagación sanos tratados o no con fungicidas como por ejemplo Benomyl.

La planta de tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) es un subarbusto perenne perteneciente a la familia Lamiaceae (Souza Prestes *et al.*, 2015). Es una especie perteneciente al grupo de las plantas aromáticas, de aspecto compacto (Figura 1). El tomillo es una especie aromática rica en aceites esenciales utilizada principalmente en medicina tradicional y como condimento (Rojas Armas *et al.*, 2015).



Figura 1. Ejemplar joven de tomillo. Foto: L. R. Casacchia.

En la actualidad, se cultivan 7 quimiotipos, clasificados en función del compuesto presente en mayor proporción (Fonnegra y Jiménez, 2006). El aceite esencial está compuesto por carvacrol y timol en porcentajes del 20 a 70% según razas; también contiene p-cimeno, terpinenos, linalol, borneol y sus ésteres acéticos, ciñel, geraniol, cariofileno.

Aceites esenciales

A diferencia de otros organismos las plantas tienen la capacidad de sintetizar sustancias orgánicas que no cumplen una función directa en el metabolismo primario, sino que forman parte del metabolismo secundario (García y Pérez Urria-Carril, 2009).

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

Los metabolitos secundarios o también llamados productos naturales se hallan en pequeñas cantidades y pueden ser específicos de determinada familia, especie o variedad vegetal (García y Pérez Urría-Carril, 2009). Algunos funcionan como pigmentos, otros como atrayentes, forman parte del sistema de defensa natural de las plantas, o como intermediarios metabólicos (Soto-Mendivil *et al.*, 2006). Sin embargo, gran parte de ellos cumplen funciones desconocidas. No obstante, se utilizan en la industria química, alimenticia, cosmética y/o medicinal (García y Pérez Urría-Carril, 2009).

El aceite esencial corresponde a la fracción obtenida por destilación o expresión, en el caso de que se utilicen sustancias de extracción el producto se denomina extracto vegetal (Archila Calderón, 2008). Los aceites esenciales Pueden tener hasta más de 200 componentes, agrupados en 2 fracciones; una volátil (90 a 95% del total) constituida por compuestos alifáticos, hidrocarburos y análogos oxigenados de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos), monoterpenos, monoterpenoides, sesquiterpenos y sesquiterpenoides; y otra fracción no volátil, que constituye el 5-10% del aceite y agrupa ácidos grasos, colorantes, cumarinas, psoralenos, esteroides y flavonoides (Archila Calderón, 2008). Se caracterizan por ser inestables ante la luz, el oxígeno, ante agentes oxidantes y reductores, a pH extremos y a trazas de metales que catalizan la descomposición (Archila Calderón, 2008). Son solubles en solventes no polares aumentando esta propiedad con la cantidad de monoterpenos que lo compongan; además, tienen alta solubilidad en etanol, lo que facilita la manipulación en la industria cosmética y farmacéutica (Archila Calderón, 2008).

Este grupo de compuestos varía cuantitativa y cualitativamente no solo con la genética de la especie vegetal, sino también por la localización geográfica, las condiciones climáticas y el ambiente donde se esté cultivando (Vokou *et al.*, 1993). Además, se han informado fluctuaciones en la composición del aceite de acuerdo a la época del año, siendo mayor en el verano (Soto-Mendivil *et al.*, 2006). Es importante destacar que si bien intervienen muchos factores en la cantidad y calidad de aceite que se sintetiza, los rendimientos son muy bajos, llegando en casos extremos a 3% de esencia en estado seco (Solís Campoverde, 2011).

El origen natural convierte a los aceites esenciales en productos más seguros para el ser humano, así como también para el medio ambiente (López, 2006). Otro factor que los posiciona como una alternativa de manejo de los cultivos es el bajo riesgo que presentan los microorganismos blanco de su acción para desarrollar resistencia, esto podría atribuirse a la gran cantidad de puntos de acción, producto de la complejidad en la composición del aceite (López, 2006). En el caso particular del *T. vulgaris*, el aceite esencial está compuesto principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol, linalol (Solís Campoverde, 2011). Es posible atribuir sus propiedades antimicrobianas a los compuestos monoterpénicos fenólicos carvacrol y timol (López, 2006). Sin embargo, en algunos casos la capacidad de inhibir microorganismos del timol puede ser eliminada por la complejidad en la composición de los aceites esenciales (Parish y Davidson, 1993). Además del tomillo, el carvacrol y timol son los monoterpenos que caracterizan especies de familia Lamiaceae, dentro de los cuales también se encuentra el orégano que posee propiedades antifúngicas similares a las del tomillo (Vokou *et al.*, 1993).

Los aceites esenciales surgen como una alternativa natural para la protección de los cultivos frente a problemas sanitarios que podrían presentarse, se podrían utilizar de manera preventiva o curativa (Solís Campoverde, 2011). Así, debido a sus propiedades y principios activos, aumentan su participación en medicina, cosmetología, industria farmacéutica, biotecnología y actualmente con aplicación en la

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone Efecto del aceite [...]
agricultura ecológica (Fonnegra y Jiménez, 2006). Es muy probable que de los aceites esenciales puedan aislarse moléculas novedosas y eficaces para ser usadas como antimicóticos (Lizcano González, 2007).

Problema de investigación.

La demanda actual de alimentos de origen vegetal y animal se inclina por productos obtenidos en sistemas de producción que privilegian la utilización reducida de agroquímicos, con el propósito de acercarse a los alimentos que los consumidores perciben como “naturales” (Blanco-Padilla *et al*, 2014). La situación descrita ha estimulado el desarrollo de investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos principios activos biodegradables, que tengan un menor impacto ambiental negativo y que sean igual o más eficaces y eficientes que un producto de origen sintético (Quintero *et al.*, 2001). Estas investigaciones se han enfocado en el estudio de principios activos contenidos en aceites esenciales y extractos vegetales.

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

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

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

Objetivo

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

Hipótesis

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

Materiales y Métodos

Aceite esencial (AE) de tomillo.

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

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

Hongos patógenos de suelo.

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



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



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

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

Las diluciones de suelo, en agua destilada estéril, y los explantos procedentes de material vegetal sintomático fueron sembrados en placas de Petri conteniendo medio agar papa glucosado (APG) al 2%. Las placas sembradas fueron incubadas durante 8 días a 24° C. Luego de la identificación se obtuvieron cultivos puros, con los cuales se procedió a la inoculación de plántulas sanas contenidas en macetas. La técnica de inoculación consistió en el riego del sustrato de cultivo con una suspensión del cultivo de cada uno de los hongos patógenos aislados, de modo de cumplir con los postulados de Koch (Agrios, 2005). En todos los casos las pruebas se efectuaron por triplicado. Los cultivos puros de los tres patógenos (Figura 4, 5 y 6) fueron mantenidos en medio APG y repicados periódicamente hasta su utilización en las pruebas de inhibición.

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]



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

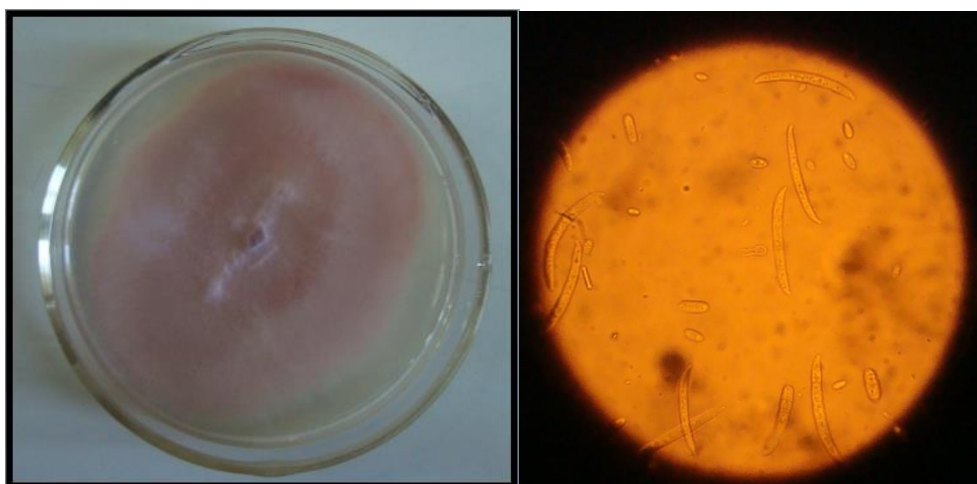


Figura 5. *F. solani* en medio APG y detalle de macro y microconidios (40X). Foto: L. R. Casacchia.



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

Pruebas de inhibición.

A partir del aceite puro se obtuvieron diluciones del mismo utilizando como diluyente medio APG. Se obtuvieron 6 diluciones con distinta concentración (dosis) del aceite: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm. Para lo cual, una vez determinado el volumen de aceite para cada concentración se vertió, utilizando micropipeta, el aceite en frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 250 mL de APG enfriado a 45° C. A continuación se procedió a verter el medio + el aceite en placas de Petri estériles. Una vez solidificado el medio contenido en las placas se procedió a sembrar en el centro de las mismas el inóculo del patógeno, procedente de un cultivo en APG. Las siembras se efectuaron por separado para cada uno de los tres patógenos y para cada concentración del aceite. Las placas sembradas fueron incubadas durante 8 días a temperatura ambiente y alternancia de 12 hs de oscuridad y 12 hs de luz. La variable respuesta consistió en la medición del diámetro de las colonias del patógeno, dicha medición se realizó cada 24 h durante 8 días. Las placas sembradas fueron conservadas durante 20 días para permitir la detección de variaciones posteriores en el desarrollo de las colonias. La siembra se realizó por triplicado para cada combinación patógeno-concentración (dosis) del aceite esencial y los testigos consistieron en la siembra del patógeno en medio de cultivo sin el agregado de aceite.

Análisis estadístico.

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

Resultados y discusión

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

Composición del aceite.

El análisis realizado (Retta, 2016) mostró que el AE de tomillo utilizado en las pruebas pertenece al quimiotipo timol (Tabla I).

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

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

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

Pruebas de inhibición

Rhizoctonia solani

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



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

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

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

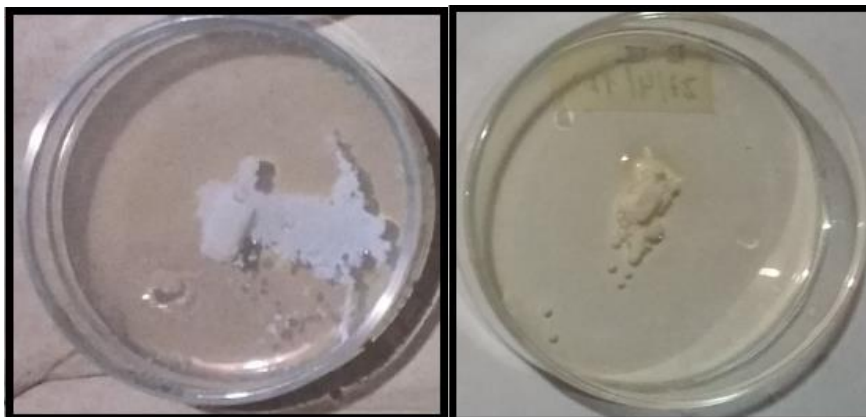


Figura 8. *R. solani* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo (izquierda). *R. solani* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 150 ppm de AE de tomillo (derecha).

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



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

Por consiguiente, las concentraciones de 50, 100 y 150 ppm tuvieron en niveles crecientes, en función de la concentración, un efecto fungistático sobre *R. solani*. Mientras que, el efecto fungicida se observó cuando se utilizó una concentración de 200 ppm. La comparación realizada entre las concentraciones del aceite esencial con efecto fungistático mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de 50 y 100 ppm en comparación con la concentración de 150 ppm (Tabla II y Figura 10).

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

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

* Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones. ** Valores seguidos por igual letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

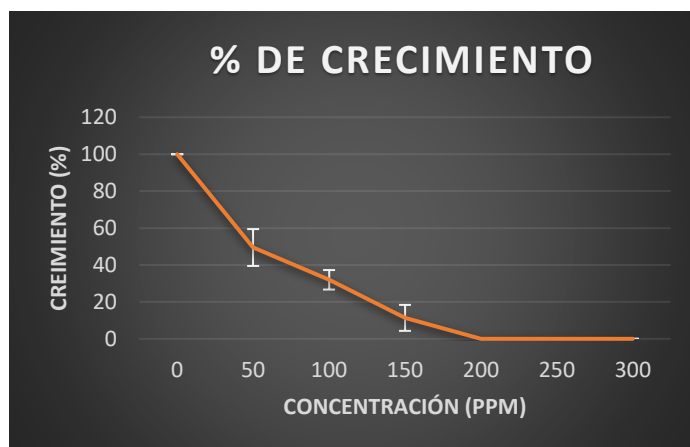


Figura 10. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *R. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

Phytophthora capsici

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



Figura 11. Colonia de *P. capsici* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 50 ppm de AE de tomillo.

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

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

componentes del aceite. Esto es, el efecto fungistático habría cesado con el proceso de evaporación.



Figura 12. Nulo crecimiento de la colonia de *P. capsici* el día 8 en medio de cultivo APG con una concentración de 100 ppm de AE de tomillo.



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

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

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

* Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones.

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

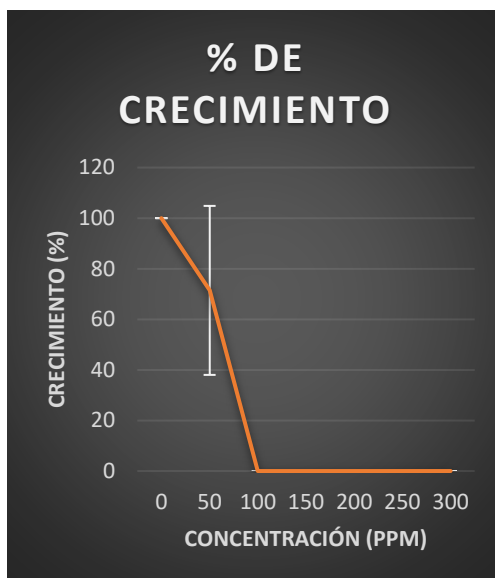


Figura 14. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *P. capsici* en medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de aceite esencial de tomillo.

Fusarium solani

El efecto del AE sobre el crecimiento de las colonias de *F. solani* fue dependiente de la concentración utilizada (Tabla IV y Figuras 22 y 23). Transcurridos ocho días de iniciadas las pruebas (Tabla IV y Figura 17), el crecimiento de *F. solani* se redujo en un 14,05%, en comparación con el testigo, con la concentración de 50 ppm del AE.

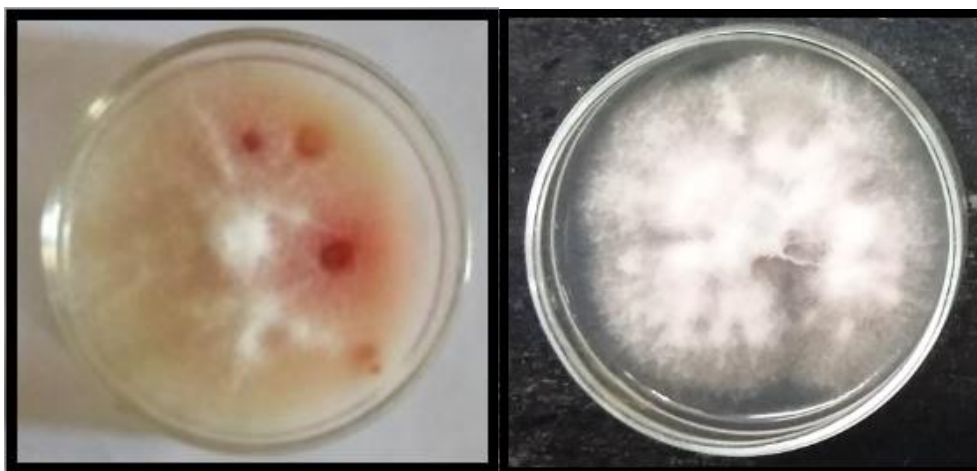


Figura 15. Desarrollo de la colonia de *F. solani* en medio APG (izquierda) y medio APG + 50 ppm del AE (derecha), observados el día 8 de la prueba.

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

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]



Figura 16. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 100 ppm de AE de tomillo.



Figura 17. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 150 ppm de AE de tomillo.



Figura 18. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 200 ppm de AE de tomillo.

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

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

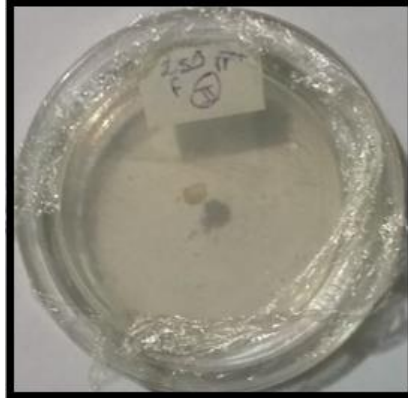


Figura 19. Colonia de *F. solani* el día 8 en medio de cultivo APG + 250 ppm de AE de tomillo.

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

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

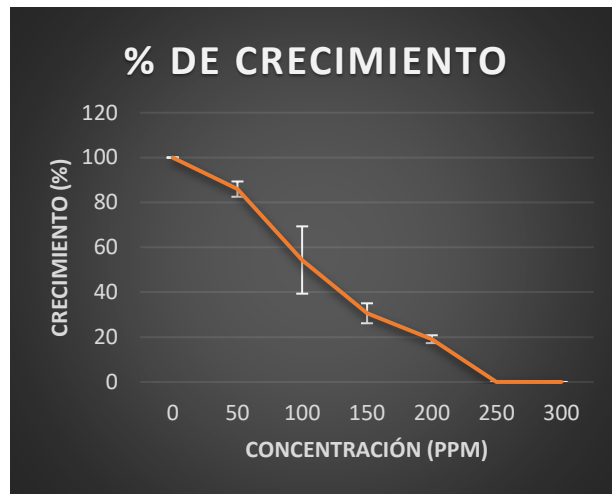


Figura 20. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *F. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo

Consideraciones finales

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

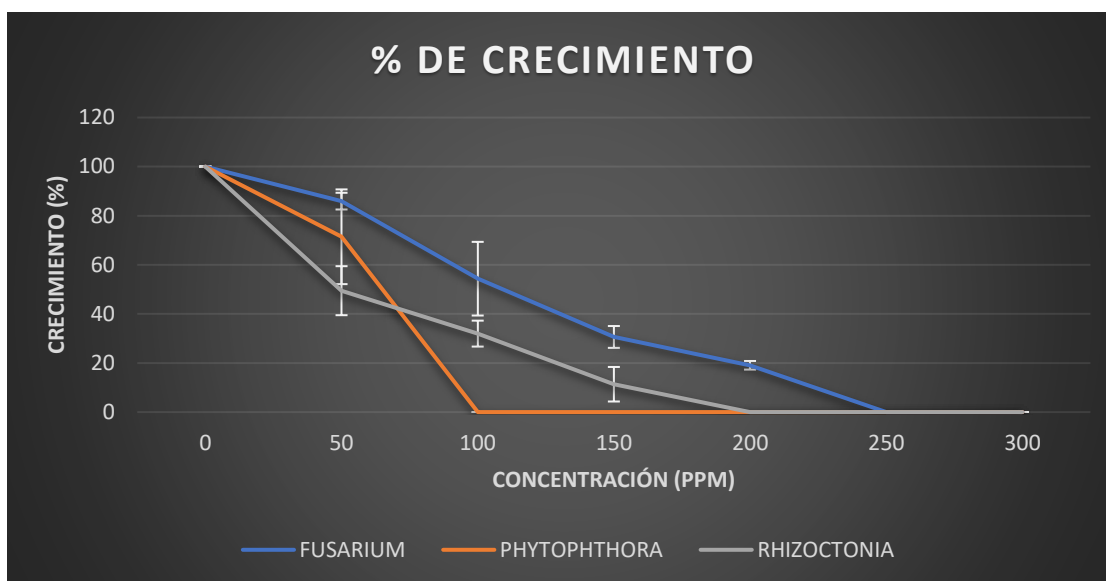


Figura 21. Crecimiento en valores porcentuales de las colonias de *F. solani*, *P. capsici* y *R. solani* en medio de cultivo conteniendo distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

Los resultados muestran que, en condiciones *in vitro*, la menor concentración con efecto fungicida fue requerida para el tratamiento de *P. capsici*. Mientras que fue necesaria una concentración cuatro veces superior para alcanzar el mismo efecto en el caso de *F. solani*. El motivo de las diferencias observadas, en las concentraciones con efecto fungicida y/o fungistático, en el presente estudio requiere de la realización de nuevos estudios. Los mecanismos de acción antifúngica de los monoterpenos no son entendidos completamente. Sin embargo, varios estudios concluyeron que dada su naturaleza lipófila ejercen su acción a nivel de la membrana (Uribe *et al.*, 1985). En tal sentido, otros autores afirman que sucede un cambio en la composición de ácidos grasos de la membrana celular (Prashar *et al.*, 2003). Los cambios que producen a nivel de la membrana pueden producir inhibición de la respiración y alteración de la permeabilidad (Coxet *et al.*, 2000). Sumado a estos resultados, Montes *et al.* (2000) sostienen que los aceites esenciales afectan no solo al desarrollo y crecimiento del micelio, sino también la germinación de esporas, la formación de estructuras de penetración y la esporulación.

Conclusiones

Los resultados alcanzados permiten enunciar las siguientes conclusiones:

El aceite esencial de *T. vulgaris* (tomillo) posee efecto fungistático y fungicida para los 3 patógenos fúngicos evaluados en condiciones *in vitro*.

El efecto del aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de las colonias fúngicas fue dependiente de la concentración y del patógeno evaluado.

RESUMEN DE TESIS

Casacchia Sassone

Efecto del aceite [...]

El patógeno fúngico *P. capsici* requirió menor concentración de aceite esencial para ser inhibido (100 ppm), seguido de *Rhizoctonia solani* (200 ppm) y por último *Fusarium solani* (250 ppm).

El empleo de aceites esenciales podría ser una alternativa viable en el control de fitopatógenos fúngicos de suelo. Sin embargo, es necesario realizar ensayos *in vivo* evaluando estos y otros fitopatógenos.

La capacidad antifúngica se atribuye principalmente al Timol, por lo que este monoterpeno podría ser utilizado en la elaboración de nuevos principios activos con actividad fungistática y/o fungicida.

El mecanismo de acción es poco conocido. Sin embargo, estudios previos señalan una alteración de la permeabilidad de la membrana e inhibición de enzimas como principales causas de la capacidad antifúngica del aceite esencial.

Bibliografía

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

Archila Calderón, J. A. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores, hojas y tallos de Ylang-Ylang, y determinación de los ácidos grasos en sus semillas. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química. Bucaramanga.

Bajwa, R; Kjalidy, A; Cheema, T.S. 2003. Antifungal activity of allelopathic plant extracts. III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. Pakistan Journal of Plant Pathology. 2: 145-156.

Başer, K; Buchbauer, G. 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. Boca Ratón: CRC Press. 118 p.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute.

Bravo, L.L; Bermúdez, T.K; Montes, B.R. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo Integrado de Plagas. 57: 29- 34.

Cedeño, L; Carrero, C; Quintero, K; Araujo, Y; Pino, H; García, R. 2001. Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kuhn asociados con papa en Mérida, Venezuela Inci v.26 n 7 Caracas.

Ceresini, P. 1999. *Rhizoctonia solani*. Pathogen profile. Lima: CIP. Centro Internacional de la Papa. p. 42.

Cheng, S.S; Liu, J.Y; Huang, C.G; Hsui, Y.R; Chen, W.J; Chang, S.T. 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum mophloeum* against three mosquito species. BioresourceTechnology 100: 457-464.

Chew Madinaveitia, Y.I; Vega Piña, A; Plomo Rodríguez, M; Jiménez Díaz, F. 2008. Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico Número 15. Campo Experimental la Laguna. Matamoros, Coahuila, México.

Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 5 (2) 2018: 11-33

RESUMEN DE TESIS

- Casacchia Sassone Efecto del aceite [...]
Cook, R.J; Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota: The American Phytopathological Society. 539 pp.
- Cox, S.D; Mann, C.M; Markham, J.L; Bell, H.C; Gustafson, J.E; Warmington, J.R; Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), J. Appl. Microbiol. 88: 170–175.
- Erwin, D.C; Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota: APS PRESS. The American Phytopathological Society. 562 pp.
- Ezziyani, M; Pérez Sánchez, C; Requena, M.E; Rubio, L; Candela, M.E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78, 2004. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100-Espinardo.
- FAO. 2012. El pacto mundial contra las plagas de las plantas. Recuperado de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>
- Fonnegra, R; Jiménez S. 2006. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia.
- García Morato, M. 1996. Enfermedades fúngicas, bacterianas y fisiopatías. En Namesny, A. (e.). Pimientos. 59-66. Madrid: Ediciones de Horticultura.
- García M; Pérez Urria-Carril 2009. Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Madrid: Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- García, J. M. D; Shagarodsky, T; Fresneda, J. A; Fundora, Y. H; González, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. Temas de Ciencia y Tecnología 32 (11), 63–66.
- Gogoi, P; Baruah, R.P; Nath, S.C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. J. Essential Oils Res. 9:213-215.
- Gohel, V; Singh, A; Vimal, M; Ashwini, P; Chatpar, H. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Afric. J. Biotechnol. 5:54-72.
- González-Hernández, D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Departamento de sistemática vegetal, Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz. Volumen 20, Número 2.
- Harman, G; Howell, C; Viterbo, A; Chet, I; Lorito. M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology. Vol. 2.
- Karavina, C; Mandumbu, R. 2012. Phytoparasitic nematode management post-methyl bromide: where to for Zimbabwe? International Journal of Agricultural Technology 8:1141-1160.
- Kuhn, J. G. 1858. Die Krankheiten der kulturgewaches, ihreursachen und ihreverhutung. Berlin. Bessemann.
- Lizcano González, M.C. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbiología agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.
- López, A. G. 2006. Regulación de Componentes de Aceites esenciales sobre la Toxicogénesis de *Fusarium verticillioides*. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ICTA. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Meepagala, K. M; Sturtz, G; Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. J. Agric. Food Chem. 50: 6989-6992.
- Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 5 (2) 2018: 11-33

RESUMEN DE TESIS

- Casacchia Sassone Efecto del aceite [...]
Montes, R; Cruz, V; Martínez, G; Sandoval, G; García, R; Zilch, S; Bravo, L; Bermúdez, K; Flores, H.E; Carvajal, M. 2000). Propiedades antifúngicas de plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología 18: 125-131.
- Naeini, A; Ziglari, T; Shokri, H; Khosravi, A. R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. Journal de Mycologie Médicale. 20(3), 174-178.
- National Academy of Sciences. (1980). Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Control de Plagas de plantas y animales. Vol 1. México: Editorial Limusa. 223 pp.
- Nelson, P. E; Tousson, T. A; Marasas, W. F. O. 1990. *Fusarium species*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-143.
- Palazón, C; Palazón, I. 1989. Estudios epidemiológicos sobre la "tristeza" del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. Bol. San. Veg. Plagas, 15:233-262.
- Parish, M.E; Davidson, P.M. 1993. Methods of evaluation. En antimicrobials in foods. Davidson, P. M; Branen, AS. L. (eds.). New York: Marcel Dekker, Inc. pp 597-615.
- Parmeter, J.R; Sherwood, R.T; Platt, W.D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1270-1278.
- Pavon, C; Babadoost, M. 2006. Determining density of *Phytophthora capsici* oospores in soil. Department of Crop Sciences, University of Illinois 1102 S.
- Pitarokili, D; Tzakou, O; Couladis, M; Verykokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera subsp. calycina* growing wild in Greece. J. Essential Oil Res. 11:655-659.
- Pope, E.J; Carter, D.A. 2001. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isoates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. Mycologia 93: 712-719.
- Prado, G; Correa, F; Aricapa, M; Escobar, F. 2001. Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). Foro Arroceros Latinoamericano. 7(1):8-11.
- Prashar, A; Hili, P; Veness, R.G; Evans, C.S. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*, Phytochemistry. Pp: 569-575.
- Quintero, S.R; Gioanetto, F; Chávez, C. E; Bárcenas, O.D. (eds.) 2001. Curso Taller de Agricultura Orgánica. Universidad Autónoma de Chihuahua. CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua. 227.p.
- Ramírez-Legarreta, M.R; Jacobo-Cuellar, J.L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 168-173.
- Sanabria, N; Guadarrama, A; Romero, H. 2002. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 28:161-173.
- Sánchez-León, G., A; Vargas-Rincón; Jiménez, P. 2015. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* L. sobre tres hongos fitopatógenos. Bioagro 27(1): 3-10.
- Schlub, R.L. 1983: Epidemiology of *Phytophthora capsici* on bell pepper. Journal of Agricultural Science, 10 (1):7-11.
- Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 5 (2) 2018: 11-33

RESUMEN DE TESIS

- Casacchia Sassone Efecto del aceite [...]
Sneh, B; Burpee, L; Ogoshi, A. 1998. Identification of *Rhizoctonia* Species. Minnesota: APS Press. pp. 135.
- Sneh, B; Jabaji-Hare, S; Neate, ; Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 578 p.
- Solís Campoverde, P.N. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia Riobamba-Ecuador.
- Soto-Mendivil, E.A; Moreno-Rodriguez, J.F; Estarrón-Espinosa, M; García-Fajardo, J.A; Obledo-Vázquez, E.N. 2006. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. Vol. 4, Art. 16.
- Souza Prestes, L; Frascolla, R; Santín R; Ziemann dos Santos, M.A; Schram, C.R; Alves Rodrigues, M.R; Damé Schuch, L.F; Araújo Meireles, M.C. 2015. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa.
- Tjamos, E.C; Beckman, C.H. 1989. Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control. En: NATO ASI Series H: Cell Biology, Vol. 28.
- Uribe, S; Ramirez, J; Pena, A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions, J. Bacteriol. pp: 1195–1200.
- Villa-Martínez, A; Pérez-Leal, R; Morales-Morales, H.A; Basurto-Sotelo, M; Soto-Parra, J.M; Martínez-Escudero, E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium spp.* Y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agron. 64 (2): 194 – 205.
- Vokou, D; Kokkini, S; Bessiere, J.M. 1993. Geographic variation of Greek orégano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential oils. Biochem. Syst. Ecol. 21:287-95.
- Whalen, M.M; Wilson, S; Gleghorn, S; Loganathan, B.C. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. Environmental Research. 92: 213-220.
- Wilson, C.L; Solar, J.M; El Ghaouth, A; Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 204-210.
- Yuce, E.K; Yigit, S; Tosun, E. 2011. Efficacy of solatization combined with metam sodium and hydrogen peroxide in control of *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici subsp. Michiganensis* in tomato greenhouse. Acta Horticulturae 914: 385-392.
- Zapata, R; Sanabria, M; Rodríguez, D. 2003. Reducción del desarrollo de Hongos Fitopatógenos con extracto de cardón lefaria. Interciencia. 28 (5): 302-306.