

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Composició química y actividad antifúngica de los aceites esenciales Satureja montana y Mentha longifolia.

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: SARA JORDÁ MARÍN

TUTOR: Don. Juan Antonio Llorens

COTUTORA: Dña. M. Pilar Santamarina Siurana

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Dña. Josefa Roselló Caselles

Curso Académico 2017/2018

VALENCIA, JUNIO DEL 2018



Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales *Satureja montana* y *Mentha longifolia*.

Autora: Sara Jordá Marín

Trabajo Final de Grado

Tutor: Juan Antonio Llorens Molina

Realizado en: Valencia

Co-tutora: M.Pilar Santamarina Siurana

Fecha: Junio, 2018

RESUMEN

La resistencia de los productos fitosanitarios existentes tiende a incrementarse, razón por la cual existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos de origen natural como alternativa a los productos de síntesis química utilizados tradicionalmente. Cabe indicar que solo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales productos hortofrutícolas de mayor importancia económica.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales *Satureja montana* y *Mentha longifolia* sobre los hongos fitopatógenos y de post-cosecha *Alternaria alternata* (AA), *Botrytis fuckeliana* (BF), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL1), *Rhizoctonia solani* (RS) y *Verticillium dahliae* (VD) con el fin de identificar las potencialidades de dichos aceites esenciales para conseguir un biofungicida botánico respetuoso con el medioambiente, y de bajo riesgo. La composición química de los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha longifolia* (quimiotipo óxido de piperitona-óxido de piperitenona) se determinó mediante cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Dichos aceites esenciales son de origen comercial (Ajedrea) y obtenidos mediante hidrodestilación de planta cultivada en parcelas experimentales de la UPV (*M. longifolia*).

La actividad antifúngica "in vitro" de los aceites esenciales se evaluó siguiendo la metodología de Singh et al., (2008) modificada. Los bioensayos se realizaron a las distintas dosis de 100, 200, 300 y 400 µg/mL.

El aceite de *S. montana* mostró excelentes resultados, ya que a 300 µg/mL inhibió el crecimiento de todos los hongos objeto de estudio, con valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) del 100% en todas las especies fúngicas, a excepción de *Botrytis fuckeliana* y *Fusarium oxysporum lycopersici* que muestran un 92,8% y 97,6%, respectivamente. A la dosis de 200 µg/mL inhibió totalmente el crecimiento de cuatro de las siete especies fúngicas estudiadas, y a la dosis de 100 µg/mL mantuvo la capacidad antifúngica, con resultados de inhibición (MGI) que oscilaron del 50 al 80% sobre los hongos ensayados.

El aceite esencial de la menta, *M. longifolia*, reveló resultados también satisfactorios a la dosis de 300 µg/mL, mostrando valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) entre el 45 y el 60%, siendo del 77% sobre *Fusarium oxysporum lycopersici*, alcanzando el 100% de inhibición del crecimiento miceliar sobre *Verticillium dahliae*.

En este estudio se pone de manifiesto el gran potencial del aceite esencial de *Satureja montana* para el control de los hongos y se muestra como alternativa sólida a los agroquímicos.

Palabras clave: aceite esencial, *Satureja*, *Mentha*, actividad antifúngica



**Composició química i activitat antifúngica
dels olis essencials *Satureja montana* i
Mentha longifolia.**

Autora: Sara Jordá Marín

Treball final de Grau

Tutor: Juan Antonio Llorens Molina

Realitzat en: València

Co-tutora: M.Pilar Santamarina Siurana

Data: Junio, 2018

RESUM

La resistència dels productes fitosanitaris existents tendeix a incrementar-se, raó per la qual hi ha un creixent interès en la recerca de nous agents antifúngics d'origen natural com a alternativa als productes de síntesi química utilitzats tradicionalment. Cal indicar que només els fongs fitopatògens provoquen una pèrdua de prop del 20% dels principals productes hortofructícoles de major importància econòmica.

En el present treball es va avaluar l'activitat antifúngica del olis essencial *Satureja montana* y *Mentha longifolia* sobre els fongs fitopatògens i de post-collita *Alternaria alternata* (AA), *Botrytis fuckeliana* (BF), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL1), *Rhizoctonia solani* (RS) i *Verticillium dahliae* (VD) per tal d'identificar les potencialitats d'aquests olis essencials per aconseguir un biofungicida botànic respectuós amb el medi ambient, i de baix risc. La composició química dels olis essencials de *Satureja montana* i *Mentha longifolia* (quimiotip òxid de piperitona-òxid de piperitenona) es va determinar mitjançant cromatografia de gasos (GC) i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS). Aquests olis essencials són d'origen comercial (*S.Montana*) i obtinguts mitjançant hidrodestilació de planta conreada en parcel·les experimentals de la UPV (*M. longifolia*).

L'activitat antifúngica "in vitro" dels olis essencials es va avaluar seguint la metodologia de Singh et al., (2008) modificada. Els bioassaigs es van realitzar a diferents dosis de 100, 200, 300 y 400 µg/ml.

L'oli de *S. montana* va mostrar excel·lents resultats, ja que a 300 µg/mL va inhibir el creixement de tots els fongs objecte d'estudi, amb valors d'inhibició del creixement miceliar (MGI) del 100% en totes les espècies fúngiques, llevat de *Botrytis fuckeliana* y *Fusarium oxysporum lycopersici* que mostren un 92,8% y 97,6%, respectivament. A la dosi de 200 µg/mL va inhibir totalment el creixement de quatre de les set espècies fúngiques estudiades, i a la dosi de 100 µg/mL va mantenir la capacitat antifúngica, amb resultats d'inhibició (MGI) que van oscil·lar del 50 al 80% sobre els fongs assajats.

L'oli essencial de la menta, *M. longifolia*, va revelar resultats també satisfactoris a la dosi de 300 µg/mL, mostrant valors d'inhibició del creixement miceliar (MGI) entre el 45 i el 60%, sent el 77% sobre *Fusarium oxysporum lycopersici*, aconseguint el 100% d'inhibició del creixement miceliar sobre *Verticillium dahliae*.

En aquest estudi es posa de manifest el gran potencial de l'oli essencial de *Satureja montana* per al control dels fongs i es mostra com a alternativa sòlida als agroquímics.

Paraules Clau: oli essencial, *Satureja*, *Mentha*, activitat antifúngica



**Chemical composition and antifungal activity
of essential oils *Satureja montana* and
Mentha longifolia.**

Author: Sara Jordá Marín

Final Work Degree

Tutor: Juan Antonio Llorens Molina

Made in: Valencia

Co-tutora: M.Pilar Santamarina Siurana

Date: Junio. 2018

ABSTRACT

The resistance of existing phytosanitary products tends to increase, which is the reason why there is a growing interest in the search for new antifungal agents of natural origin as an alternative to the chemically synthesized products traditionally used. It should be noted that only phytopathogenic fungi cause a loss of about 20% of the main horticultural products of the most economic importance.

In the present work the antifungal activity of essential oils *Satureja montana* and *Mentha longifolia* was evaluated on the phytopathogenic and post-harvest fungi *Alternaria alternata* (AA), *Botrytis fuckeliana* (BF), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL), *Rhizoctonia Solani* (RS) and *Verticillium dahliae* (VD) in order to identify the potential of these essential oils to achieve a botanical biofungicide that is respectful of the environment and of low risk. The chemical composition of the essential oils of *Satureja montana* and *Mentha longifolia* (piperitone oxide-piperitone oxide chemotype) was determined by gas chromatography (GC) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). These essential oils are of commercial origin (*S. montana*) and obtained by hydrodistillation of a plant grown in experimental plots of the UPV (*M. longifolia*).

The "in vitro" antifungal activity of the essential oils was evaluated following the methodology of Singh et al., (2008) modified. The bioassays were carried out at different a doses of 100, 200, 300 and 400µg/mL.

The *S. montana* oil showed excellent results, since at 300 µg/mL it inhibited the growth of all the fungi under study, with 100% mycelial growth inhibition (MGI) values in all the fungal species, with the exception of *B. fuckeliana* and *Fusarium oxysporum lycopersici*, which was 92,8% and 97%, respectively. At the dose of 200 µg/mL it totally inhibited the growth of four of the seven fungal species studied, and at the dose of 100 µg/mL it maintained the antifungal capacity, with inhibition results (MGI) that ranged from 50 to 80% over the fungi rehearsed.

The essential oil of the mint, *M. longifolia*, revealed also satisfactory results at the dose of 300 µg/mL, showing values of inhibition of mycelial growth (MGI) between 45 and 60%, being 77% on *Fusarium oxysporum lycopersici*, reaching 100% inhibition of mycelial growth on *Verticillium dahliae*.

This study highlights the great potential of the essential oil of *Satureja montana* for the control of fungi and it is shown as a solid alternative to agrochemicals.

Key words: essential oil, *Satureja*, *Mentha*, antifungal activity

AGRADECIMIENTOS

Son ellos quienes han confiado, son ellos los que han apostado, me han apoyado, me han corregido y me han enseñado todo aquello que en un tiempo será la base de mi futuro. Son ellos quienes descubren o motivan para avanzar y no parar. Y sin ellos, nuestros profesores, el mundo ocuparía un saber sin lugar. Gracias Juan Antonio Llorens por transmitirme y contagiarme el entusiasmo por la química. A M^a Pilar Santamarina Siurana y Pepa Roselló Caselles por introducirme plenamente en el mundo de la botánica y micología y sobre todo por su paciencia, confianza y saber compartir toda su sabiduría.

Y todos los que me rodean, pilar fundamental para llevar a cabo cada uno de mis pasos. Están y permanecen, y ese calor solo lo puedo agradecer día a día. Gracias a todos ellos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Descripción y ecología de las especies.....	2
1.1.1 <i>Mentha longifolia</i>	2
1.1.2 <i>Satureja montana</i>	3
1.2 Aceites esenciales.....	4
1.2.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.	4
1.2.3 Aceite esencial de <i>Mentha longifolia</i>	5
1.2.4 Aceite esencial de <i>Satureja montana</i>	5
1.3 Los hongos.....	6
1.3.1 Características generales:.....	6
1.3.5 Género <i>Alternaria</i>	7
1.3.2 Género <i>Botryotinia</i>	8
1.3.3 Género <i>Curvularia</i>	9
1.3.6 Género <i>Fusarium</i>	10
1.3.7 Género <i>Rhizoctonia</i>	12
1.3.8 Género <i>Verticillium</i>	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1 Material vegetal.....	16
3.2. Extracción del aceite esencial <i>Mentha longifolia</i>	16
3.2.1 Materiales:.....	16
3.2.2 Fundamento (Equipo Clevenger):.....	16
3.2.3 Metodología (Equipo Clevenger).....	17
3.3. Composición de los aceites esenciales:.....	17
3.3.1 Materiales y equipos.....	17
3.3.2 Fundamento.....	18
3.3.3 Metodología: parámetros de funcionamiento en el análisis cromatográfico.....	18
3.4. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales.....	20
3.4.1 Materiales.....	20
3.4.2 Hongos.....	20
3.4.3 Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI).....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Caracterización química de los aceites esenciales.....	21
4.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelial.....	23
4.3 Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI).....	25
4.4 Determinación del efecto fungicida y/o fungistático.....	30

4.5 Discusión.....	31
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Mentha longifolia</i> . Flora Ibérica.....	2
Figura 2: <i>Satureja montana</i> . Flora Ibérica.....	3
Figura 3: Conidios de <i>Alternaria alternata</i>	7
Figura 4: <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA.....	7
Figura 5: <i>Alternaria alternata</i> en tomate.....	7
Figura 6: Conidióforos y conidios de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	9
Figura 7: <i>Botryotinia fuckeliana</i> en medio PDA.	9
Figura 8: <i>Botryotinia fuckeliana</i> en uva.	9
Figura 9: Conidios de <i>Curvularia hawaiiensis</i>	10
Figura 10: <i>Curvularia hawaiiensis</i> en medio PDA.	10
Figura 11: <i>Curvularia hawaiiensis</i> en mazorcas.	10
Figura 12: Conidios de <i>Fusarium equiseti</i>	11
Figura 13: <i>Fusarium equiseti</i> en medio PDA.	11
Figura 14: <i>Fusarium equiseti</i> en calabacín.	11
Figura 15: Conidio de <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i>	12
Figura 16: <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> en medio PDA.	12
Figura 17: <i>Fusarium oxysporum lycopersic</i> en tomate.....	12
Figura 18: Conidio de <i>Rhizoctonia solani</i>	13
Figura 19: <i>Rhizoctonia solani</i> en medio PDA.....	13
Figura 20: <i>Rhizoctonia solani</i> en patata.	13
Figura 21: Conidio de <i>Verticillium dahliae</i>	14
Figura 22: <i>Verticillium dahliae</i> en medio PDA.....	14
Figura 23: <i>Verticillium dahliae</i> en fresa.....	14
Figura 24: Equipo Clevenger.	17
Figura 25: Diagrama del proceso analítico cromatográfico.....	19
Figura 26: Representación gráfica del MGI (%) de <i>Satureja montana</i> a las dosis de 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL para las distintas especies ensayadas.	25
Figura 27: Representación gráfica del MGI (%) de <i>Mentha longifolia</i> a las dosis de 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL para las distintas especies ensayadas.	26
Figura 28: Crecimiento de AA, BF, CH, FE, FOL, RS Y VD en PDA (control) y en PDA con el aceite esencial de <i>S. montana</i> a las dosis de 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL, a los 7 días de incubación.	28
Figura 29: Crecimiento de AA, BF, CH, FE, FOL, RS Y VD en PDA (control) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. lonfifolia</i> a las dosis de 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL , a los 7 días de incubación.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de los aceites de <i>Satureja montana</i> y <i>Metha longifolia</i> . Compuestos en orden de elución en columna HP-1.	22
Tabla 2: Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA- <i>Satureja montana</i> a distintas dosis a los 7 días de incubación.	24
Tabla 3: Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA- <i>Mentha longifolia</i> a distintas dosis a los 7 días de incubación.	24
Tabla 4: Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con <i>Satureja montana</i>	25
Tabla 5: Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con <i>Mentha longifolia</i>	26
Tabla 6: Crecimiento medio (mm) de los hongos AA, CH, FE, RS y VD, cuyo MGI fue 100% a 300 µg/mL con aceite de <i>S. montana</i> , en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.	30
Tabla 7: Crecimiento medio (mm) de los hongos CH, FE, RS y VD, cuyo MGI fue 100% a 200 µg/mL con aceite de <i>S. montana</i> , en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.	30
Tabla 8: Crecimiento medio (mm) del hongo VD, cuyo MGI fue 100% a 300 µg/mL con aceite de <i>M. longifolia</i> , en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.	31

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen el grupo más importante de agentes fitopatógenos en razón del número y diversidad de enfermedades que causan. La contaminación por hongos es un problema crónico en productos alimenticios, ya que tienen un efecto negativo sobre la calidad y la cantidad de alimentos producidos. Sólo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica (Agrios, 2005; Roselló y col., 2015).

Las frutas y hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. Este tipo de microorganismos son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, como las micotoxinas, que se distribuyen con facilidad en el sustrato y pueden llegar a ser perjudiciales, aún cuando se encuentren en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho su inocuidad, ya que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población (FAO, 2001).

Para la protección y control de dichos efectos negativos, se han establecido hasta el momento, estrategias basadas en la utilización de productos químicos de origen sintético (fitosanitarios). Sin embargo, las nuevas legislaciones para reducir la contaminación y hacer un uso sostenible y respetuoso con el medio ambiente de los productos fitosanitarios, ha suscitado el interés científico en la búsqueda de alternativas que permitan mitigar el impacto negativo de los agroquímicos de baja especificidad. Una estrategia que ha resultado satisfactoria ha sido la utilización de sustancias de origen vegetal, consideradas más seguras tanto para el medio ambiente como para la salud de los consumidores (Kotan y col., 2013).

Las sustancias de origen vegetal como los aceites esenciales provenientes de las plantas aromáticas, han sido popularmente utilizadas en la medicina debido a las propiedades secundarias de los mismos. En los últimos años, son numerosos los estudios que se han llevado a cabo para documentar los efectos antifúngicos de los aceites esenciales, determinando que estos son capaces de reducir e incluso inhibir el desarrollo de diferentes tipos de hongos (Santamarina y col., 2015). Los géneros capaces de elaborar estos principios volátiles se agrupan en unas cincuenta familias, casi todas ellas pertenecientes a los órdenes Magnoliales, Laurales, Rutales, Lamiales y Asterales.

En este trabajo se evalúa la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha longifolia* frente a hongos fitopatógenos que causan alteraciones en post-cosecha, y para relacionarlo con la composición química, se realiza su estudio analítico.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Descripción y ecología de las especies.

1.1.1 *Mentha longifolia*.

La *Mentha longifolia* L. se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Lamiales, Familia Lamiaceae, Género *Mentha*, y Especie *Mentha longifolia* L.

Es llamada comúnmente menta de caballo, hortolana o menta silvestre. La palabra *longifolia* significa hojas largas, del latín *longi-* (*longus*) largo, y *-folium* que significa hoja. Se describe botánicamente como una planta perenne y herbácea. Sus tallos son erguidos y comprenden una longitud entre 24 y 120 cm, siendo de sección cuadrangular, con una pilosidad blanquecina o grisácea. Las hojas de 15-115 x 6-42 mm, son sésiles, de forma lanceolada, lisa o rugosa en la base, con el margen provisto de dientes irregulares y patentes, el haz gris tomentoso y con el envés de color ceniciento, por la presencia de tricomas grisáceos.

En cuanto a las inflorescencias, son hermafroditas y pediceladas, reunidas en inflorescencias bracteadas y ramificadas formadas por numerosos verticilastros que forman espigas densas y cilíndricas, unas 6 por tallo de 4-10 x 1-1,5 cm. El fruto es una núcula o aquenios de 0,54-0,79 mm, de elipsoide a subtriangular, de color pardo a claro (López, 2012).

La *Mentha longifolia* florece de mayo a octubre y crece en zonas húmedas ya sean bordes de arroyos, juncuales, prados húmedos y en ocasiones bordes de carreteras o caminos donde hay más aporte de nitrógeno, desde unos 400 a 2300 m de altitud (López, 2012).

Destaca por sus usos medicinales, ya que esta especie posee propiedades antisépticas, antiasmáticas, carminativas y estimulantes para el aparato digestivo. Sus infusiones se emplean también para tratar fiebres, dolores de cabeza y problemas digestivos. Cabe destacar sus usos culinarios, ya que las hojas se emplean crudas o cocinadas, como aditivo a las comidas y como infusión. Asimismo, el aceite esencial de sus hojas se emplea como aditivo saborizante en repostería (López, 2012). Un estudio realizado sobre la actividad antifúngica de *Mentha longifolia* reveló que el extracto de dicha planta inhibía el crecimiento de hongos de interés clínico, además de ser activo frente a las enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* (Saeide y col., 2014). Otros estudios realizados por otros investigadores han demostrado el gran poder del aceite esencial de diferentes especies de *Mentha* como insecticida (Kumar y col., 2011).



Figura 1: *Mentha longifolia*. Flora Ibérica. España. Cantabria, Hermandad de Campoo de Suso, Serna, 1000m, borde de arroyo, 26-VIII-2012, Autor de la foto: C. Aedo.

1.1.2 *Satureja montana*.

El género *Satureja* L. pertenece a la familia de las lamiáceas (labiadas), encuadrada taxonómicamente dentro de las angiospermas dicotiledóneas en la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsidae, subclase Lamidae (lámidas), orden Lamiales (Lamianas) y especie *Satureja montana* L. (Sitte y col., 2004).

En España esta planta, es conocida con el nombre vulgar de ajedrea. El nombre genérico, *Satureja*, deriva de la palabra latina *Satura*, que significa salsa o guiso, en alusión al uso culinario de esta planta (Muñoz, 2003). Se describe botánicamente como una planta perenne. Sus tallos están divididos desde su parte basal, densamente pelosos, con pelos muy cortos, con fascículos axilares de hojas jóvenes, sobre todo en los nudos inferiores. Las hojas de 12-24(26) × 2-5,5(6,5) mm, de forma lanceoladas, más anchas en el tercio superior, muy agudas, casi apiculadas, con frecuencia con el ápice algo arqueado hacia abajo, con nervio central marcado por el envés, algo pelosas en su parte basal, con cilios muy cortos, a veces vestigiales, cubiertas de minúsculas glándulas esferoidales generalmente rojizas. En cuanto a las inflorescencias, son espiciforme, formadas por verticilastros axilares con pedúnculo 3-4 mm, con 2 o más flores cada uno. Por último, el fruto es una núcula de 1,3-1,7 × 1,1-1,3 mm, agudas, con superficie de inserción formada por dos cicatrices subapicales, con glándulas esferoidales en su parte redondeada (Castroviejo, 2010).

S. montana está adaptada a vivir en zonas montañosas, pudiendo llegar hasta los 2000 m de altitud (Flora Ibérica, 2010). Es, de todas las especies españolas, la que parece manifestar una mayor exigencia en humedad. Coloniza suelos pedregosos al lado de los acantilados rocosos o grietas de roquedos. Bioclimáticamente, su área de distribución está caracterizada por condiciones templadas o templado-cálidas, pudiendo soportar condiciones más rigurosas, pero siempre en exposiciones soleadas. No obstante, también se extiende a lo largo de los cauces de los ríos donde encuentra un microclima más fresco (Rivas, 1982).

Todas las especies de *Satureja* se recolectan localmente como plantas medicinales, así como por sus aplicaciones condimentarias, todas ellas derivadas en su mayor parte de la composición de sus aceites esenciales. En la industria alimentaria son muy apreciadas para el aliño de las aceitunas y el adobo de las carnes, así como para la elaboración de licores (Castroviejo, 2010).



Figura 2: *Satureja montana*. Flora Ibérica. España. Huesca, Bielsa, Valle de Pineta, 29-VII-2009, Autor de la foto: J.L. Benito Alonso.

1.2 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) se definen como el producto de la destilación por arrastre de vapor de material procedente de distintos órganos: hojas, flores y raíces de numerosas especies vegetales. Los componentes de los aceites esenciales constituyen la fracción relativamente volátil de los metabolitos secundarios de las plantas (Molina y col., 2012).

Los AE representan una fracción muy pequeña del total de la planta (menos del 5% del total de materia seca). Están compuestos principalmente por terpenoides, en especial monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y otras sustancias tales como compuestos aromáticos, óxidos, alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas. Debido a su naturaleza hidrófoba y su densidad, generalmente menor que la del agua, son compuestos lipófilos, solubles en disolventes orgánicos e inmiscibles en agua (Asbahani y col., 2015).

En la naturaleza juegan un papel ecológico importante, ya que están envueltos en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, de manera que actúan como aleloquímicos. También representan una defensa contra herbívoros, insectos, hongos y patógenos. Pueden atraer a los insectos polinizadores, o incluso ser secretados como respuesta a situaciones de estrés (Verdeguer, 2011).

Respecto a su composición existen numerosas referencias bibliográficas. Pueden contener más de 60 componentes individuales. Los componentes mayoritarios pueden suponer un 85% del aceite, mientras que otros componentes se encuentran sólo en trazas. Parece ser que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica de estos aceites, hay evidencias de que los componentes minoritarios tienen un papel importante en su actividad, produciendo un efecto sinérgico con otros componentes. El análisis de su composición detallada se ha conseguido mediante Cromatografía de Gases y Espectrómetro de Masas.

La composición de los aceites de algunos tipos de plantas puede variar según la época de la cosecha y la situación geográfica. Generalmente, los procedentes de las plantas cosechadas durante o inmediatamente después de la floración, poseen una mayor actividad antimicrobiana. La composición de los aceites de diferentes partes de una misma planta, también puede variar ampliamente (Burt, 2004; Santamarina y col., 2015).

La actividad antifúngica de los AE no puede ser fácilmente correlacionada con un componente individual, sino con una mezcla de los compuestos presentes en ellos (Tzortzakis, 2009). La interacción de compuestos antimicrobianos cuando se aplican en una mezcla no se comprende todavía del todo y necesita de más investigación. Así, si un par de compuestos antimicrobianos con diferentes mecanismos de inactivación, son aplicados juntos, se podría conseguir un mejor control microbiano, si tienen lugar los efectos sinérgicos o aditivos (Davidson y col., 2005).

1.2.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.

Desde hace mucho tiempo se han reconocido las propiedades antibacterianas de algunos aceites esenciales. Además de propiedades antibacterianas, los aceites o sus componentes han mostrado también propiedades antivíricas, antifúngicas, herbicidas e insecticidas.

La capacidad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales de muchas especies de plantas han sido probadas por diferentes autores (Burt, 2004; Jamali, y col., 2012; Blázquez, 2014).

Existen numerosos estudios que revelan la actividad antimicrobiana, aunque no todos presentan la misma actividad y ésta dependería de sus componentes. En este sentido, Fisher y Phillips (2006) estudiaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de limón, naranja dulce y bergamota y de sus componentes principales.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los aceites de pimienta negra, clavo, orégano, geranio, nuez moscada y tomillo fue examinada por Dorman y Deans (2000), quienes además determinaron los componentes volátiles que podrían contribuir a su actividad. El aceite con un gran espectro de acción fue el de tomillo, seguido de orégano, clavo, nuez moscada, pimienta negra y geranio. La actividad de los aceites estaría relacionada con la composición de los volátiles de los aceites de las plantas y sus grupos funcionales, y una posible interacción sinérgica entre sus componentes. Los componentes con estructura fenólica como el carvacrol, el eugenol y el timol, fueron muy efectivos frente a los microorganismos.

Por otro lado, actualmente la industria alimentaria también está interesada en las propiedades de los aceites esenciales, y les están dando usos como conservantes, en el desarrollo de nuevos envases y en la lucha contra patógenos responsables de las intoxicaciones alimentarias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas putida* y *staphylococcus aureus* (Asbahani y col., 2015).

El uso de estos aceites parece prometedor en la agricultura orgánica, pero su actuación es muy rápida y poco persistente, debido a su fácil volatilización. Además, son degradados fácilmente por oxidación, calentamiento o exposición a luz, lo que representa un problema en su utilización (Dayan y col., 2009). Para corregir este defecto, se están desarrollando formulaciones alternativas que estabilicen el producto, como son la microencapsulación o nanoencapsulación, con el fin de aumentar la duración de su efecto, reducir su volatilización, simplificar su manejo, y ralentizar su degradación en el medio ambiente (Verdeguer, 2011; Armendáriz, 2016).

Muchos estudios ponen de manifiesto el alto poder antifúngico y antibacteriano de algunos aceites esenciales. Por esta razón, junto con lo beneficiosos y respetuosos que son con el medio ambiente, es cada vez más deseable la aplicación de estos aceites esenciales como medida preventiva-curativa frente a hongos y bacterias causantes del deterioro de los alimentos.

1.2.3 Aceite esencial de *Mentha longifolia*.

La *Mentha longifolia* destaca por sus usos medicinales, ya que esta especie posee propiedades antisépticas, antiasmáticas, carminativas y estimulantes para el aparato digestivo. Sus infusiones se emplean también para tratar fiebres, dolores de cabeza y problemas digestivos. Cabe destacar sus usos culinarios, ya que las hojas se emplean crudas o cocinadas, como aditivo a las comidas y como infusión. Asimismo, el aceite esencial de sus hojas se emplea como aditivo saborizante en repostería (López Castaño, 2012).

1.2.4 Aceite esencial de *Satureja montana*.

Las especies ibéricas del género *Satureja* se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades medicinales, así como por sus aplicaciones condimentarias, todas ellas derivadas en gran medida a la composición de sus aceites esenciales (López, 1982).

Debido al alto contenido de timol y carvacrol en distintas especies de *Satureja* y su fácil cultivo son muy apreciadas para el aliño de conservas en salmuera, condimentos, adobo de las carnes, elaboración de licores, así como en industrias farmacéuticas. Las especies de *S. montana* han sido tradicionalmente utilizadas para combatir dolores musculares, como tónico, carminativo y para tratar desórdenes estomacales o intestinales como náuseas, indigestión o diarrea (Zargari, 1990).

1.3 Los hongos.

1.3.1 Características generales.

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudos filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las 100.000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Sin embargo, más de las 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas (Agrios, 2005).

Los hongos son a la vez destructivos y beneficiosos para la agricultura. Por una parte, son los descomponedores primarios de materiales orgánicos, contribuyendo de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de nutrientes, pero por otro lado son responsables de las enfermedades que provocan en plantas. La contaminación fúngica de los productos agrícolas es un problema crónico y conlleva la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. También los hongos pueden degradar productos que son útiles para la economía humana, por ejemplo, los productos alimentarios cuando se almacenan mal, frecuentemente están expuestos al biodeterioro por hongos, con el resultado de que sus cualidades como alimentos se ven disminuidas. Además, los hongos con frecuencia producen compuestos tóxicos cuando crecen sobre alimentos almacenados (Agrios, 2004).

Respecto al efecto nocivo de los hongos, se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos, conocidos como biótrofos, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son necrótrofos, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Algunos hongos son simbioses facultativos, creciendo tanto libres como asociados a plantas, y otros son simbioses obligados, creciendo sólo si están asociados a plantas (Vichicela y Elisabeth, 2014).

Sin embargo, algunos hongos son utilizados en la industria agroalimentaria debido a su importancia en procesos de fabricación de vinos, pan y cervezas. También participan en la fermentación del cacao, preparación de queso, ácido orgánico, vitaminas, enzimas y son responsables de la fabricación de varios antibióticos (Mader y Windelspecht, 2013).

1.3.5 Género *Alternaria*.

Alternaria alternata

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Euascomycetes; Orden: Pleosporales; Familia: Pleosporaceae; Género: *Alternaria* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Alternaria alternata es un hongo filamentoso, saprofito, caracterizado por presentar una coloración oscura. Microscópicamente se observan conidióforos simples, tabicados, de forma alargada u ovoide. En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color pardo, con septos transversales y verticales (muriformes) de disposición irregular. La reproducción es por gemación de la célula apical, a partir de la cual genera un nuevo conidio, formándose así largas cadenas de conidios. Las colonias son de crecimiento rápido (tres o cuatro días) y macroscópicamente presentan un aspecto veloso, al principio de color gris, después adquieren tonos negros y oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia (Samson y col., 2004)

FISIOLOGÍA

El potencial hídrico óptimo para el crecimiento de *Alternaria alternata* es de actividades de agua (a_w) superiores a 0.90, pudiendo crecer con a_w mínimas entre 0.85-0.88 (a_w). También puede crecer en un amplio rango de temperaturas de 2,5 °C a 33°C, y amplio rango de pH entre 2-8 (Samson y col., 2004).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Las principales micotoxinas de *Alternaria alternata* contaminantes de cereales, aceites de semilla, vegetales y frutos son: alternariol, alternariol monometiléter, ácido tenuazónico (TA) y la tentoxina pueden causar enfermedades crónicas en la salud humana (Arcella y col., 2016).

ECOLOGÍA

Alternaria alternata se considera como el hongo subepidérmico más común del grano de trigo. El "escudete negro" (blackpoint) es un problema de aparición frecuente en la mayoría de las regiones trigueras del mundo. Se caracteriza por la presencia de una coloración parda o negra en la zona del germen del grano de trigo (Fernández, 2015). También es un hongo presente en una gran variedad de cultivos hortícolas como las fresas, tomates, zanahorias y espárragos. En los tomates afecta tanto en el campo como en la post-cosecha, puede comportarse como oportunista o infectar por sí solo y se manifiesta por cubrir al fruto con un moho negro (Guerrero y col., 2007).



Figura 3: Conidios de *Alternaria alternata*.

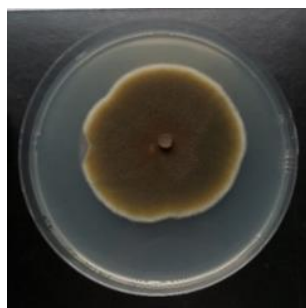


Figura 4: *Alternaria alternata* en medio PDA.



Figura 5: *Alternaria alternata* en tomate.

1.3.2 Género *Botryotinia*.

Botryotinia fuckeliana.

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Género: *Botryotinia* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Botrytis fuckeliana es un hongo fitopatógeno necrótrofo. Las colonias del hongo tienen un crecimiento moderado en medio artificial, pueden ser blancas o grises dependiendo del medio de cultivo y, además, estas pueden ser de tipo micelial o esporulante. El crecimiento micelial es abundante, algodonoso y de color pardo. El crecimiento esclerocial es lento, posee un micelio escaso de color blanco que luego se torna de color gris pardo con abundantes esclerocios de color negro distribuidos irregularmente en el medio. Sobre los órganos afectados de las plantas también se observa el micelio gris (Walker y col., 2015).

FISIOLOGÍA

Se ha registrado crecimiento a 0,93 y a 0,90 a_w y crece a una amplia gama de temperaturas, como mínimas 2-8°C, máximas 28-35°C, y óptimas de 22-25°C. Crece en pH entre 2-8 y a concentraciones de O₂ menores al 1%.

Hiberna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Los esclerocios germinan y forman micelio en una amplia gama de temperaturas formando conidias, y en óptimas condiciones (15 -18 °C, humedad relativa alta y luz), las conidias se pueden formar solo en 8 horas. La liberación de las conidias tiene lugar principalmente durante el día y está influenciada por cambios en la humedad relativa. Las conidias pueden ser transportadas a largas distancias por las corrientes de aire y en las gotas de agua. Los procesos de germinación e infección dependen mucho más de la humedad que de la temperatura. En general cuando más altas son las temperaturas, hasta un máximo de 15-20°C más corto es el periodo de humedad requerido. No es necesaria la lluvia si la humedad relativa es superior al 98%. El conidio invade y penetra a los tejidos y las células infectadas se colapsan y desintegran causando la pudrición del tejido (Vichicela y Elisabeth, 2014).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Son capaces de secretar ácido oxálico y diferentes toxinas, siendo la más estudiada el botridial. Algunas cepas pueden producir otras toxinas diferentes (Vichicela y Elisabeth, 2014).

ECOLOGÍA

Causa importantes daños en más de 200 especies vegetales, fundamentalmente en dicotiledóneas (Sánchez, 2017). A su vez ocasiona grandes pérdidas en uva, tanto en el campo como después de la cosecha, así como en otros frutos como frambuesas, arándanos, moras y fresas. También causa el deterioro de manzanas, peras, tomates, frutas de hueso y kiwis (Pitt y Hocking, 2009).

Los síntomas provocados por este patógeno, incluyen: pudrición en frutos y tubérculos ("podredumbre gris"), necrosis de tejido, manchas foliares, caída de plántulas, canchales en los tallos, y tizones en inflorescencias. Los síntomas conllevan una pérdida de coloración seguida de la aparición de zonas necróticas. Los tejidos pierden turgencia y adquieren una consistencia frágil. En el caso de la uva, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolla, penetra e invade al resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con moho

intrincado de color gris blanquizco o café claro. En caso de que algún fruto llegue a desarrollarse, el hongo se propaga desde los pétalos hacia los frutos verdes o maduros y ocasiona la pudrición basal del fruto, la cual puede destruir todo el fruto o bien se puede propagar hacia otros frutos que están en contacto con él (Agrios, 2005; Sánchez, 2017; Vichicela y Elisabeth, 2014).

Para penetrar en los tejidos vegetales, atravesando la cutícula, desarrolla una estructura denominada apresorio. Esta estructura genera una presión física sobre la cutícula, aunque no la suficiente como para poder penetrarla. La pared del apresorio no contiene suficiente melanina como para generar la presión de turgencia necesaria, como ocurre en otros hongos. Por tanto, para que la penetración sea posible, es necesaria la acción de enzimas, excretándose fundamentalmente cutinasas y lipasas. Además, durante el proceso se genera H_2O_2 , que actuaría como sustrato para las oxidasas.



Figura 6: Conidióforos y conidios de *Botryotinia fuckeliana*.



Figura 7: *Botryotinia fuckeliana* en medio PDA.



Figura 8: *Botryotinia fuckeliana* en uva.

1.3.3 Género *Curvularia*.

Curvularia hawaiiensis

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Dothideomycetes; Orden: Pleosporales; Familia: Pleosporaceae; Género: *Curvularia* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

El género *Curvularia* comprende un conjunto de hongos dematiáceos que engloba a más de 35 especies. En su mayoría, son patógenos facultativos de plantas y suelos de áreas tropicales y subtropicales (Alvarez y col., 2011).

El género *Curvularia* se caracteriza porque sus colonias cuando se desarrollan en Agar Patata Dextrosa (PDA) presentan un crecimiento moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 3-4 cm en una semana a 25°C, de color negro pardusco, aterciopeladas, llegando a ser, a veces, ligeramente algodonosas. El reverso es de color marrón. Los conidióforos son erectos, septados, pigmentados cada vez más cerca de la punta, a veces geniculados. Los conidios generalmente septados en 4, sobre todo más curvados unilateralmente en la célula central más amplia y más pigmentada, la célula adyacente menos pigmentada e hialina en las células finales, 18-35(37) x 8-14 μm .. La esporulación se induce con longitudes de onda próximas a las del ultravioleta (Samson y col., 2004).

FISIOLOGÍA

Su rango de temperatura de crecimiento óptima 24-30°C (Samson, y col., 2004).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

No existen estudios que hayan registrado la producción de micotoxinas para esta especie.

ECOLOGÍA

Es, principalmente, invasor de plantas monocotiledóneas. Los alimentos más comunes dónde podemos encontrar éste género son los cereales, entre los que se encuentran: el arroz, la cebada, el trigo, el maíz y el sorgo (Pitt y Hocking, 2009).

Pueden causar diferentes tipos de daños en hojas, tallos, flores y semillas, que abarcan desde pequeñas manchas hasta lesiones de mayor tamaño. Estas afectaciones abarcan un gran número de cultivos, muchos de ellos de gran importancia económica (Estrada y Sandoval, 2004).



Figura 9: Conidios de *Curvularia hawaiiensis*.



Figura 10: *Curvularia hawaiiensis* en medio PDA.



Figura 11: *Curvularia hawaiiensis* en mazorcas.

1.3.6 Género *Fusarium*.

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Sordariomycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Nectriaceae; Género: *Fusarium* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas. Algunas especies pueden causar infecciones oportunistas en el hombre y en los animales y algunas pocas producen toxinas que pueden afectar al hombre y a los animales (Torres, 2000).

Se caracteriza por producir colonia de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en media papa-dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado y pocas microconidias y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (De Granada y col., 2001).

FISIOLOGÍA

En cuanto a los factores ambientales que mayor influencia tienen en el desarrollo de la enfermedad y en la expresión de los síntomas: la temperatura óptima para el desarrollo está entre 25 y 30 °C; la esporulación óptima ocurre entre 20 y 25°C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; el pH óptimo es de 7.7 y puede desarrollarse entre 2.2 y 9.0 (De Granada y col., 2001).

Este patógeno se caracteriza por producir tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Respecto a las microconidias son unicelulares, sin septas, rectas o curvadas. Las macroconidias, son esporas con varias células y de tres a cinco septas transversales, de pared delgada y largas moderadamente curvadas. Por último las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracteriza por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes (Agrios, 2008)

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Son los tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas las toxinas más comunes originadas por especies del género *Fusarium*. Generalmente la contaminación se produce antes o durante de la cosecha, aunque también puede desarrollarse durante la etapa del almacenamiento (Soriano del Castillo, 2007).

ECOLOGÍA

Las enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas (Torres, 2000). En el caso del tomate, se manifiesta cuando aparece un penacho de pelo blanquecino, rosa o amarillento del moho y la infección se desarrolla con mayor rapidez (Soriano del Castillo, 2007).

Fusarium equiseti

Fusarium equiseti es un hongo de campo que aparece en zonas climáticas moderadas, se distribuye ampliamente en vegetales, frutas, árboles de coníferas y suelo. Junto con *Fusarium coeruleum* es la especie principal que causa la pudrición seca de tubérculos de patata en América del Norte y Europa (Jelén y col., 1995).



Figura 12: Conidios de *Fusarium equiseti*.



Figura 13: *Fusarium equiseti* en medio PDA.



Figura 14: *Fusarium equiseti* en calabacín.

Fusarium oxysporum lycopersici

Algunas de las características principales de *Fusarium oxysporum*, es su macroconidio que se forma en el esporodio, en codióforios bifurcados o en monofilides, que son abundantes de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con 3 septos transversales y con la célula basal alargada (Leslie y Summerell, 2006).

La mayoría de las formas especiales de *Fusarium oxysporum* están muy especializadas en los géneros de plantas hospedantes que pueden dañar. En este caso *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ataca solamente al tomate; muy conocido también *F. oxysporum f.sp. cubense* que ataca solamente a plantas de banano y plátano y algunas especies del género *Musa* (Torres, 2000).

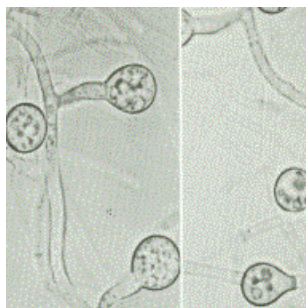


Figura 15: Conidio de *Fusarium oxysporum lycopersici*.



Figura 16: *Fusarium oxysporum lycopersici* en medio PDA.



Figura 17: *Fusarium oxysporum lycopersici* en tomate.

1.3.7 Género *Rhizoctonia*.

Rhizoctonia solani

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Basidiomycota; Clase: Hyphomycetes; Orden: Agonomycetales; Familia: Agonomycetaceae; Género: *Rhizoctonia* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

No produce esporas asexuales “conidios” y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales “basidiosporas”.

En la naturaleza, este hongo se reproduce asexualmente y existe como micelio vegetativo y persiste en el terreno formando estructuras de resistencia o esclerocios, que son masas de hifas estrechamente entretejidas con superficies duras y resistentes. Aunque también puede estar presente en las raíces de algunos hospedantes sin provocar efectos (Angulo y Ericson, 2014).

Se caracteriza por tener el micelio de color marrón oscuro y la formación de esclerocios a los 8-10 días de cultivo. Sobre la superficie de los tubérculos maduros se presentan costras pequeñas oscuras a manera de terrones de tierra difíciles de remover (Albán, 2015).

FISIOLOGÍA

Se desarrolla a temperaturas muy diversas en zonas cálidas, templadas y frías, ocasionando daño considerable en los brotes emergentes del tubérculo cuando las condiciones no favorecen su rápida emergencia; por ejemplo, en suelos húmedos, ácidos y fríos (Albán, 2015).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

No existen estudios que hayan registrado la producción de micotoxinas para esta especie.

ECOLOGÍA

En el cultivo de la patata, el hongo causa la enfermedad comúnmente llamada cáncer del tallo y costra negra de los tubérculos. Algunos autores consideran más apropiado identificarla como “rizoconiosis” (Escalona y col, 2011).

Los síntomas de la misma se caracterizan por lesiones necróticas de raíces, estolones y cuello de la planta, que conducen a la formación de tubérculos aéreos en las axilas de las hojas; sobre los tubérculos, además, se forman esclerocios aislados o en masa, lo cual se conoce como costra negra. Algunos aislamientos de *R. solani* tienen la capacidad de fusionar sus hifas, y si esto ocurre, se dice que las cepas son genéticamente similares y pertenecen al mismo grupo anastomósico (AG) (Escalona y col, 2012).



Figura 18: Conidio de *Rhizoctonia solani*



Figura 19: *Rhizoctonia solani* en medio PDA.



Figura 20: *Rhizoctonia solani* en patata.

1.3.8 Género *Verticillium*.

Verticillium dahliae

TAXONOMÍA

Reino: Fungi Filo: Ascomycota Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Icercetiae Género: *Verticillium* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Verticillium dahliae es la especie patógena más notoria que puede infectar a cientos de hospedadores dicotiledóneos. Los síntomas más frecuentes observados incluyen el enraizado, la marchitez, la clorosis, la necrosis, la decoloración vascular y la senescencia temprana.

FISIOLOGÍA

Según un estudio realizado por Santamarina y Roselló (2006) la actividad del agua óptima para el crecimiento de *Verticillium Dahliae* a una temperatura entre 15 y 25 °C se encuentra en un rango de 0.98-0.995 a_w .

Después de que el hospedante muere o la temporada de crecimiento termina, *V. dahliae* sobrevive como micelio, el cual hiberna en residuos vegetales muertos que se encuentran en el suelo; el hongo también puede vivir saprófitamente, exista o no un hospedante disponible. La supervivencia puede ocurrir en raíces de especies no hospedantes en las cuales no se produce infección sistémica. Los días fríos y nublados intercalados con días cálidos y luminosos son más propicios para el desarrollo de la marchitez por *V. dahliae*. La infección y el desarrollo de la enfermedad ocurren cuando las temperaturas del suelo están entre 12 y 30 °C, con un óptimo entre 21-24 °C. La marchitez por *Verticillium* se presenta principalmente en zonas de clima templado (Lázaro y col., 2008)

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

El hongo produce microesclerocios melanizados, que lo ayuda a sobrevivir condiciones ambientales adversas que puede encontrar dentro de sus huéspedes y en el suelo. (Tian y col., 2017).

ECOLOGÍA

Verticillium dahliae tiene un amplio rango de hospedantes, incluyendo plantas anuales y perennes, herbáceas y leñosas perennes. Afectando a más de 300 especies de plantas pertenecientes a diferentes géneros.

Se ha observado que los cultivos de fresa son muy susceptibles a la infección por *V. dahliae*; de tal forma que menos de 2 microesclerocios por gramo de suelo pueden ocasionar un 100% de incidencia de la enfermedad. Asimismo se ha indicado que la marchitez provocada por *Verticillium sp.* ocasiona pérdidas del 20-30% en el rendimiento de fresa.

En tallos, los síntomas provocados por *V. dahliae* en frambuesa, mora y zarzamora, aparecen al final de la temporada de crecimiento, los tallos se doblan y toman un color azulado. Debido a esta sintomatología, la enfermedad se conoce comúnmente como tallo azul. Se ha reportado que las frambuesas negras son más susceptibles que las rojas. Los tallos infestados generalmente mueren antes que los frutos maduren, lo que ocasiona frutos pequeños y sin sabor. En cuanto a las hojas, los síntomas provocados por *V. dahliae* en fresa incluyen: marchitez, clorosis, enanismo, necrosis, o aclaramiento de nervaduras (Lázaro y col., 2008).



Figura 21: Conidio de *Verticillium dahliae*.



Figura 22: *Verticillium dahliae* en medio PDA.



Figura 23: *Verticillium dahliae* en fresa.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

En el Instituto Agroforestal Mediterráneo y en el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Univesitat Politècnica de València se llevan a cabo diferentes estudios relacionados con aceites esenciales. Entre las líneas de investigación está la de evaluar el potencial de los aceites esenciales como agentes de control frente a distintos hongos patógenos de cultivos y/o de almacén.

En el presente trabajo se estudia:

- La composición química de los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha longifolia*.
- La capacidad antifúngica “*in vitro*” de los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha longifolia* frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*.
- La efectividad de ambos aceites a distintas concentraciones.

El objetivo final es conocer si los aceites esenciales de *Satureja montana* y *Mentha longifolia* podrían ser una alternativa para el control de los hongos anteriormente mencionados, con el fin último de obtener biofungicidas ecológicos que pudieran ser utilizados en cultivos en campo, productos almacenados, y en la conservación de alimentos y granos, ya que cada vez hay más productos químicos sintéticos prohibidos para el control de hongos patógenos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material vegetal.

El aceite esencial comercial *Satureja montana* fue suministrado por Esential l'arôme (Lote: 772B021005). En cuanto al aceite esencial de *Mentha longifolia* Quimiotipo A utilizado en los ensayos de la actividad antifúngica se obtuvo mediante hidrodestilación de planta cultivada en parcelas experimentales de la UPV.

3.2. Extracción del aceite esencial *Mentha longifolia*.

3.2.1 Materiales.

- Equipo Clevenger (Vidrafoc)
 - Mantas calefactoras (Ibs-Instruments)
 - Rotavapor y accesorios (Laborota 4001 HEIDOLPH) con equipo de refrigeración y vacío (SELECTA)
 - Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
 - Matraces balón (vidraFOC)
 - Viales cromatográficos de 2 mL (LABBOX)
 - Viales de inserto de 6 mm de sección y 350 microlitros de capacidad (LABBOX)
 - Tapones roscados con septum (LABBOX)
 - Parafilm (PARAFILM)
 - Vasos de precipitados (PYREX)
 - Filtro de jeringa (OlimPeak, teknokroma)
 - Guantes (Semperguard)
- Reactivos:
- Sulfato de sodio anhidro, Purísimo (PANREAC).
 - Diclorometano (Scharlau) para GC estabilizado con 50 ppm de amileno.

3.2.2 Fundamento (Equipo Clevenger).

La hidrodestilación es una técnica de destilación por arrastre con vapor de agua. La separación de los componentes más volátiles del material vegetal (que constituyen el aceite esencial) se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles, como lo son el agua y los compuestos que forman el aceite esencial. Dado que la ebullición tiene lugar cuando la presión de vapor es igual a la externa (en este caso la atmosférica), al calentar conjuntamente el agua y el material vegetal, los componentes volátiles de este pueden pasar a estado de vapor a una temperatura notablemente inferior (en torno a la temperatura de ebullición del agua) a la de su temperatura de ebullición como sustancias puras. De este modo, el vapor generado contiene pequeñas cantidades de aceite esencial que al condensar, por su inmiscibilidad, quedan separadas de la fase acuosa (normalmente en la parte superior ya que suelen ser menos densos que el agua). Este proceso desarrollado durante el tiempo adecuado, permite separar la práctica totalidad del aceite esencial (Barrow, 1972).

3.2.3 Metodología (Equipo Clevenger).

En cuanto a la obtención del aceite esencial para los ensayos de actividad antifúngica, se realizó mediante hidrodestilación con un equipo Clevenger, el cual se muestra en la figura 24.

El equipo está compuesto de un balón junto a una manta calefactora, donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura. Un condensador va acoplado al balón y una conexión, que permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada.

Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del hidrodestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable (Chávez, 2007).

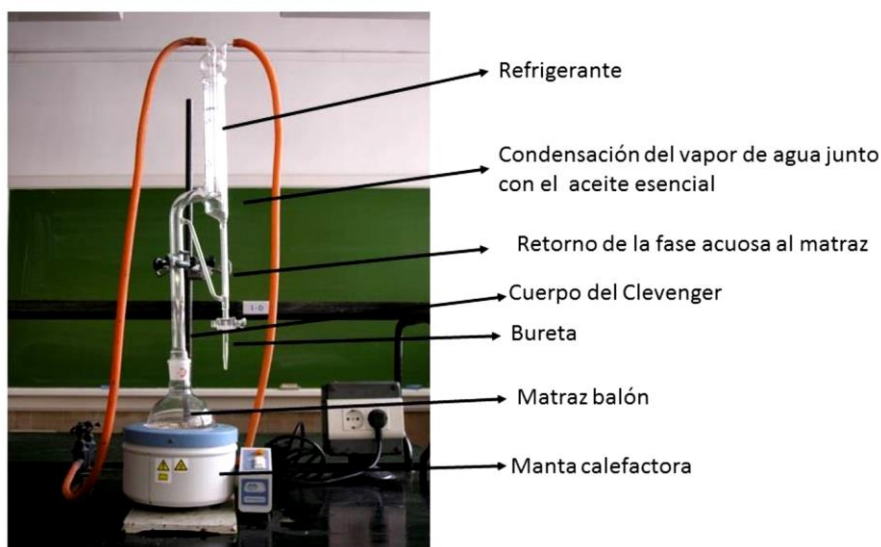


Figura 24: Equipo Clevenger.

3.3. Composición de los aceites esenciales.

3.3.1 Materiales y equipos.

En este trabajo, para realizar las determinaciones analíticas se ha utilizado la cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-EM) para la identificación inicial de los componentes de las muestras junto con detector de ionización de llama (GC-FID) para la cuantificación aproximada basada en el método de normalización de las áreas de los picos.

Se utilizó la cromatografía de gases para llevar a cabo el estudio cuantitativo de los distintos aceites esenciales obtenidos, por ser la técnica que permite predecir el grado de complejidad de un aceite esencial, la naturaleza química de sus componentes y sobre todo la proporción en que se encuentran, a pesar de que dichos compuestos no hayan sido identificados.

El equipo empleado consta de un cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 GC-MS (Perkin-Elmer Inc. Wellesley, EEUU) equipado con una columna capilar ZB-5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m; Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). La cuantificación de las muestras es realizada mediante un cromatógrafo de gases Clarus 500 GC de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, MA, EEUU), equipado con una columna capilar ZB-5 de las mismas características mencionadas anteriormente.

Material auxiliar utilizado:

- Guantes (Semperguard®).
- Viales de 1,5 mL (Technokroma).
- Diclorometano (Scharlau, nº CAS: 75-09-2), como reactivo.

3.3.2 Fundamento.

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil gaseosa, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria, produciéndose una separación de los diferentes componentes, de forma que puedan separarse y en cierta medida identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance, dando lugar a una diferencia en los denominados “tiempos de retención”. No solo la fase móvil ha de ser un gas, también debe serlo la mezcla a separar; por ello, la cromatografía de gases requiere la volatilización previa de la muestra. El factor más importante en la cromatografía de gases es la selección de la columna adecuada (fase estacionaria) para la separación particular sobre la que se desea experimentar (García y col., 1996).

Para la identificación de los componentes, la cromatografía de gases se utilizó con detector de espectroscopia de masas. Esta es una técnica en la que los iones obtenidos de una sustancia (en general orgánica), se separan según su relación masa-carga iónica por impacto electrónico con un haz de electrones a 70 eV, dando lugar al espectro de masas. Cuando se acopla con la espectrometría de masas como sistema de detección, es posible la identificación virtualmente positiva de los eluidos con una muy alta sensibilidad, creando un sistema analítico muy poderoso.

3.3.3 Metodología: parámetros de funcionamiento en el análisis cromatográfico.

En la espectroscopia de masas, la fase móvil es el gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector es de 250°C, mientras que la temperatura del horno se programó desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min. La detección se realizó en modo de ionización de impacto electrónico (método de impacto electrónico, 70 eV), siendo la temperatura de la fuente de ionización 200°C.

Los espectros se obtuvieron mediante el modo de escaneo total de iones (rango de masas m/z 45-500 uma). Los cromatogramas y espectros se procesaron con el software Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los datos obtenidos son registrados y comparados con los de la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU), de forma que las sustancias correspondientes a cada pico del cromatograma son identificadas según las coincidencias de alta probabilidad con los espectros de masas dados por la base de datos.

Cuando se utiliza el detector de ionización de llama (FID), el gas portador también es Helio, utilizando un flujo de 1.2 mL/min. La temperatura del inyector y del detector es de 250°C. La temperatura del horno se programa igualmente desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min. Los cromatogramas obtenidos se procesan con el software TotalChrom 6.2 (Perkin Elmer Inc.). Para llevar a cabo cada análisis se inyecta 1-2 μ L de muestra.

Tanto para los resultados del análisis cualitativo como el cuantitativo, la identificación ha sido realizada combinando el cálculo de los índices de retención lineales y el análisis mediante CG-EM. Mediante una sencilla hoja de cálculo, se puede aplicar la fórmula del índice lineal que se muestra a continuación:

$$IK=100 \cdot (n^{\circ} C HC_{n-1} + [(TR X - TR HC_{n-1}) / (TR HC_{n+1} - TR HC_{n-1})]).$$

Donde:

n es el número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del pico analizado.

tRx es el tiempo de retención del pico analizado.

tRn es el tiempo de retención del n-alcano anterior al pico analizado.

tRN es el tiempo de retención del n-alcano posterior al pico analizado.

El siguiente diagrama (figura 25) ilustra todo el proceso analítico llevado a cabo en esta parte del trabajo:

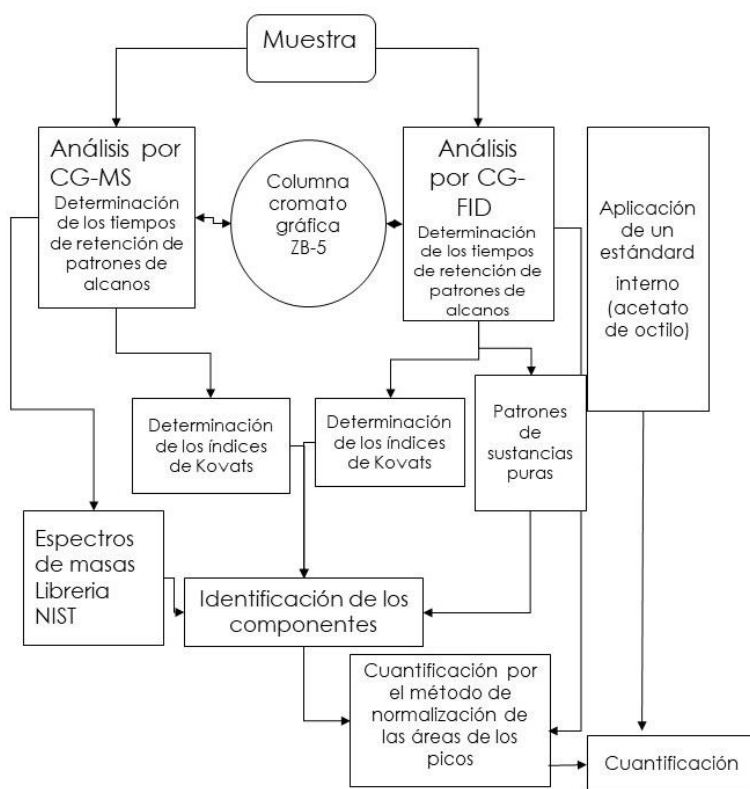


Figura 25: Diagrama del proceso analítico cromatográfico.

3.4. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales.

3.4.1 Materiales.

- Aceites esenciales
- Placas Petri
- Potato Dextrose Agar (Laboratorios Conda)
- Tween 80
- Agua destilada
- Lejía
- Placas Petri de 90 y 150 mm
- Matraz de Erlenmeyer de 1000 mL
- Probeta de 500 ml
- Varilla de vidrio
- Vaso de precipitado de 100 ml
- Algodón graso
- Mango Kolle con asa de siembra
- Sacabocados de 0,8 y 0,9 cm
- Papel de aluminio (Albal)
- Regla de 30 cm
- Guantes
- Rotulador Permanente
- Mechero Bunsen
- Equipo autoclave (Raypa)
- Equipo Orbital (Selecta)
- Balanza analítica (Kern)
- Cabina de Flujo Laminar (Indelab)
- Estufa de cultivo (Raypa)
- Frigorífico (Liebherr)

3.4.2 Hongos.

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes: *Alternaria alternata* CECT 20923 (AA), *Botrytis fuckeliana* CECT 20518 (BF), *Curvularia hawaiiensis* CECT 20934 (CH), *Fusarium equiseti* CECT 20925 (FE), *Fusarium oxysporum lycopersici* CECT 2715 (FOL), *Rhizoctonia solani* CECT 2819 (RS) y *Verticillium dahliae* CECT 2694 (VD). AA, CH y FE fueron aislados en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de carióspsides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la albufera de Valencia. Estos hongos se identificaron mediante métodos morfológicos y moleculares, y posteriormente se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Respecto a BF, FOL, RS y VD fueron suministrados por CECT.

3.4.3 Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI).

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20 (0.1%), previamente esterilizado. Cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL o 100 µg/mL y se repartió en placas Petri de 90x15 mm y 150x15 mm. El hongo se sembró a modo de explantes discoidales de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocados de una colonia de siete días de desarrollo, y se colocaron en el centro de las placas Petri conteniendo el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 7 días. El crecimiento micelial se evaluó midiendo a los 7 días los diámetros perpendiculares de la colonia. Las placas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%) y el hongo analizado. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento y especie fúngica.

La inhibición del crecimiento micelial (MGI) se calculó el día 7 utilizando la siguiente fórmula (Albuquerque y col., 2006):

$$\text{MGI} = \left[\frac{\text{Diámetro de la colonia control} - \text{Diámetro de la colonia aceite}}{\text{Diámetro de la colonia control}} \right] \times 100$$

Una vez transcurridos los 7 días, se midió el diámetro de cada colonia control no tratada con aceite y el diámetro de la colonia con aceite esencial y se obtuvo la inhibición del crecimiento micelial (MGI).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Caracterización química de los aceites esenciales.

A continuación en la tabla 1, se muestran la composición química para cada uno de los aceites esenciales estudiados: *Satureja montana* y *Mentha longifolia*.

En el aceite esencial de *S. montana* se identifican 36 compuestos entre ellos destacamos: carvacrol 24%, γ -terpinene 15,9%, p-cymene 14,2 %, beta-caryophyllene 9,1% y carvacrol methyl ether 7,3%.

Existen muchas referencias bibliográficas en cuanto a la composición del aceite esencial *Satureja L.* Generalmente en su aceite esencial tiene un 75,13% de monoterpenos de los cuales son componentes fundamentales (más del 10%), carvacrol (37,69%), p-cimeno (12,47%), componentes menores (entre 9,9% y 1%), borneol (8,8%), timol (5,55%) terpinen-4-ol (3,05%), limoneno cineol (1,28%), carvona (1,05%), γ -terpineno (1,01%) y el resto microcomponentes (de 0,99% a 0,1%). Los sesquiterpenos suman un 24,87% de los cuales damos como probables: cariofileno (1,85%), bisaboleno (8,67%), α -cadineno (4,08%), γ -cadineno (0,55%) y humuleno (0,50%) (Velasco, 1983).

En cuanto a la composición química de dicho aceite esencial, cabe destacar que son numerosos los factores ecológicos que influyen en la composición cualitativa y sobre todo cuantitativa de los aceites esenciales. El origen geográfico de las plantas, y como consecuencia el componente bioclimático y edáfico de las mismas, influyen notablemente en la composición de los aceites esenciales. (Rellán, 2013).

Respecto a la *Mentha longifolia* quimiotipo A se observan en el perfil cromatográfico como componentes mayoritarios el óxido de piperitenona (52,72%), seguido de óxido de piperitona (23,5%) y en menor cantidad de germacrene-D (3,8%).

La *Mentha longifolia*, cuyos componentes mayoritarios son los óxidos de piperitenona y de piperitona, concuerda notablemente con los descritos por Viljoen y col., (2006) y Pal Singh y col., (2008).

Tabla 1: Composición química de los aceites de *Satureja montana* y *Metha longifolia*. Compuestos en orden de elución en columna HP-1.

COMPUESTO ¹	IR (lineal) exp. ²	IR (lineal) ref. ³	<i>S. Montana</i>	<i>M. longifolia</i>
			ÁREA % ⁴	ÁREA %
Tricyclene	921	921	tr ⁵	- ⁶
α -tuyeno	925	924	1,1	-
α -pineno	930	932	1,7	1.0
Canfeno	945	946	0,5	tr
Sabineno	969	969	0,1	0.8
β -pineno	974	974	tr	1.3
Octen-2-ol	980	982	0,7	-
Mirceno	991	988	3,1	1.2
2-octanol	997	994	-	0.4
α -felandreno	1004	1002	0,2	tr
δ -3-careno	1010	1008	tr	-
α -terpineno	1016	1014	1,9	-
<i>p</i> -cimeno	1019	1020	14,2	-
Limoneno	1027	1024	1,8	1.4
1,8-cineol	1030	1026	0,7	1.8
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1038	1032	0,2	2.2
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1049	1044	0,2	0.2
γ -terpineno	1055	1054	15,9	2.4
(<i>Z</i>)-sabinen hidrato	1067	1065	0,6	-
Terpinoleno	1088	1086	0,3	-
2-metil butanoato de isopentilo	1099	1102	-	0.3
Linalool	1102	1095	3,2	-
Acetato de 3-octilo	1120	1120	-	tr
Alcanfor	1142	1141	0,1	-
Neomentol	1158	1161	-	tr
Borneol	1166	1165	3,6	-
δ -terpineol	1167	1162	-	0.2
terpinen-4-ol	1177	1174	2,7	tr
α -terpineol	1195	1186	0,2	0.9
Timol, metil éter	1235	1232	0,3	-
Pulegona	1236	1233	-	tr
Carvona	1241	1239	-	tr
Carvacrol metil éter	1246	1241	7,3	-
Óxido de piperitona	1248	1250	-	23.5
(<i>Z</i>)-óxido de carvona	1267	1259	-	0.1
Isopiperitenone	1272	1272	-	-
Formiato de nerilo	1275	1280	0,1	-
Timol	1299	1289	3	-
6-hidroxicarvotanacetona	1300	1300	-	0.1
Carvacrol	1321	1298	24	-

Piperitenona	1333	1340	-	tr
Acetato de timol	1357	1349	tr	-
Óxido de piperitenona	1359	1366	-	52.72
α -copaeno	1376	1374	tr	-
β -bourboneno	1384	1387	-	tr
β -elemeno	1387	1389	-	tr
(E)-jasmona	1400	1390	-	tr
(Z)-jasmone	1407	1392	-	0.1
β -cariofileno	1420	1417	9,1	3.0
(Z)-muurola-3,5-dieno	1447	1448	-	0.4
α -humulene	1452	1452	0,2	-
(E)- β -farneseno	1458	1454	-	-
Germacrene-D	1474	1484	-	3.8
Biciclogermacreno	1487	1500	-	0.2
α -muuroleno	1498	1500	-	0.1
β - bisaboleno	1508	1505	1,5	-
γ -cadineno	1512	1513	-	0.1
δ -cadinene	1522	1522	tr	-
Germacrene-D-4-ol	1568	1574	-	0.2
Óxido de cariofileno	1580	1582	0,4	tr
Muurolol epi- α	1647	1640	-	0.1
α -cadinol	1655	1652	tr	-

1. Compuestos en orden de elución en una columna ZB-5.
2. Índice de retención de Kovats experimental.
3. Índice de retención de Kovats de referencia (Adams, 2007).
4. Área normalizada a partir del cromatograma FID.
5. tr: trazas (% < 0.05).
6. – No detectado.

4.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento miceliar.

Aceite esencial *Satureja montana*.

En la tabla 2 se estudia el efecto del aceite esencial *S. montana* donde se muestra el diámetro medio del crecimiento (mm) de *Alternaria alternata*, *Botrytis fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* en los distintos tratamientos ensayados: PDA (control), PDA- 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PDA-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PDA-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En esta tabla se observa que el crecimiento a la dosis de PDA-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue nulo en la mayoría de los casos, exceptuando *Botrytis fuckeliana* y *Fusarium oxysporum*. Respecto al medio PDA-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el crecimiento micelar aumentó también en *Alternaria alternata*. Y por último, en medio PDA-100 μg *Rhizoctonia solani* muestra un crecimiento mayor respecto al resto y siendo *Verticillium dahliae* el de menor crecimiento.

Tabla 2: Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA-*Satureja montana* a distintas dosis a los 7 días de incubación.

<i>Satureja montana</i>				
HONGOS	PDA-CONTROL	300µg/mL	200µg/mL	100µg/mL
AA	75,5	0	15,1	24,2
BF	108,3	7,8	19,1	41,3
CH	24	0	0	12,1
FE	87,6	0	0	25,7
FOL	86,1	2,1	9,6	43,4
RS	113,4	0	0	51,3
VD	22,6	0	0	5,4

Aceite esencial *Mentha longifolia*.

En la tabla 3 se estudia el efecto del aceite esencial *Mentha longifolia* donde se muestra el crecimiento medio miceliar (mm) de *Alternaria alternata*, *Botrytis fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* en los distintos tratamientos ensayados: PDA (control), PDA- 400 µg/mL, PDA-300 µg/mL, PDA-200 µg/mL y PDA-100 µg/mL. Se observa que el crecimiento entre el medio PDA-400 µg/mL y PDA-300 µg/mL disminuyó significativamente, mostrándose, solamente, una ligera desviación en *Curvularia hawaiiensis* y *Alternaria alternata*. *Botrytis fuckeliana*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Rhizoctonia solani* experimentan un crecimiento miceliar notable. Respecto a los medios PDA-200 µg/mL y PDA-100 µg/mL *Verticillium dahliae* aumentó su crecimiento micelar visiblemente pero en menor medida.

Tabla 3: Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA-*Mentha longifolia* a distintas dosis a los 7 días de incubación.

<i>Mentha longifolia</i>					
HONGOS	PDA-CONTROL	400µg/mL	300µg/mL	200µg/mL	100µg/mL
AA	85,5	32,3	47,5	63	72,6
BF	108,3	33,2	37,5	45,5	50,5
CH	26	10,3	12,1	15	18
FE	89,5	18	34,8	48,7	54,8
FOL	74,3	4,9	17,1	45,4	64,6
RS	113,4	59,4	49,9	74	82,8
VD	28,6	0	0	8,3	10,8

4.3 Cálculo de la inhibición del crecimiento miceliar (MGI).

Aceite esencial *Satureja montana*.

A continuación, se calcula y se representa la inhibición del crecimiento miceliar (MGI) del hongo creciendo en cada medio de cultivo con aceite esencial de la *S. montana* (Tabla 4 y Figura 26) donde se observan unos excelentes resultados, ya que a 300 µg/mL inhibió el crecimiento de todos los hongos objeto de estudio, con valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) del 100% en todas las especies fúngicas, a excepción de *Botrytis fuckeliana* y *Fusarium oxysporum lycopersici* que muestran un 92,8% y 97,6%, respectivamente. A la dosis de 200 µg/mL, inhibió totalmente el crecimiento de cuatro de las siete especies fúngicas estudiadas, y a la dosis de 100 µg/mL mantuvo la capacidad antifúngica, con resultados de inhibición que oscilaron del 50% al 80% sobre los hongos ensayados, siendo valores nada despreciables teniendo en cuenta la baja concentración de aceite esencial utilizada. Cabe destacar el escaso crecimiento de VD y la gran efectividad del aceite *S. montana* sobre este hongo incluso a dosis muy bajas.

Tabla 4: Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con *Satureja montana*.

Conc.µg/mL	AA	BF	CH	FE	FOL	RS	VD
300	100	92,80	100	100	97,56	100	100
200	80	82,36	100	100	88,82	100	100
100	67,95	61,87	49,58	70,66	49,62	54,70	79,23

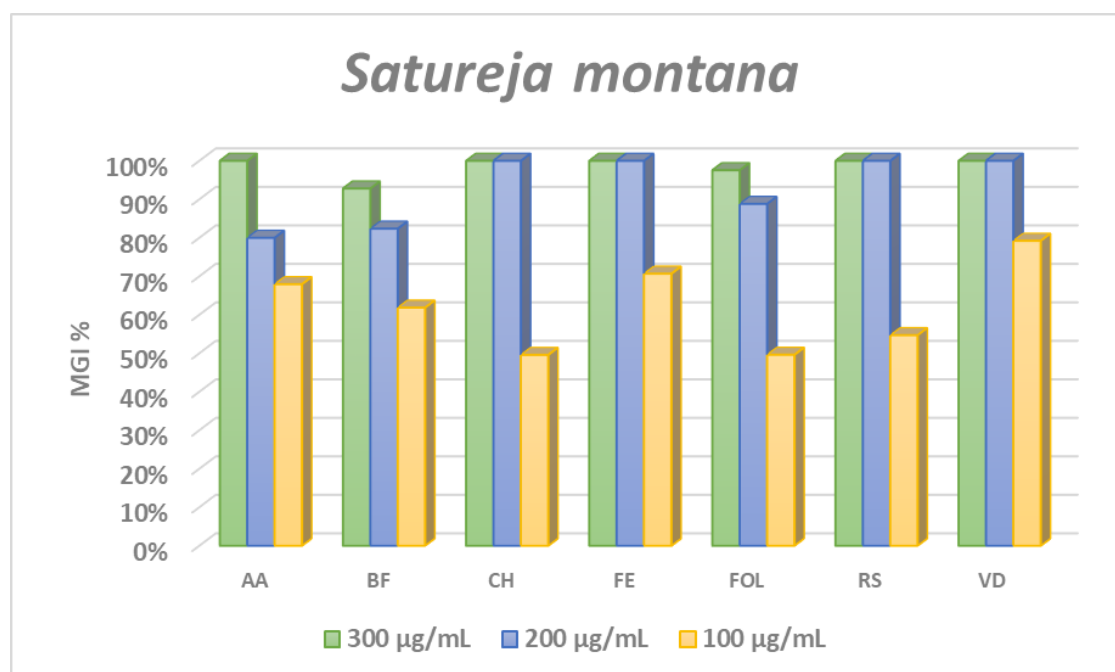


Figura 26: Representación gráfica del MGI (%) de *Satureja montana* a las dosis de 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL para las distintas especies ensayadas.

Aceite esencial *Mentha longifolia*.

Seguidamente se calcula y representa la inhibición del crecimiento micelial para el medio de cultivo con aceite esencial de *Mentha longifolia* (Tabla 5 y Figura 27) donde se observan unos resultados bastante satisfactorios. Con este aceite se utilizaron cuatro concentraciones diferentes, siendo la mayor de ellas 400 µg/mL y la menor 100 µg/mL. En primer lugar destacando la inhibición del crecimiento micelial de *Verticillium dahliae*, con un valor de MGI del 100%, a la dosis de 400 µg/mL y 300 µg/mL, y con una inhibición del 70,98 % y 62,24 % a la dosis de 200 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente. Respecto al resto de hongos ensayados, a la dosis de 400 µg/mL, *Fusarium oxysporum lycopersici* alcanza una inhibición del 93,41 % y a la dosis de 300 µg/mL, se observa una inhibición del 60 al 80% del crecimiento micelial en los hongos BF, FE y FOL.

Tabla 5: Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con *Mentha longifolia*.

Conc.µg/mg	AA	BF	CH	FE	FOL	RS	VD
400	62,22%	69,34%	60,38%	79,89%	93,41%	56,00%	100%
300	44,44%	65,37%	53,46%	61,12%	76,99%	47,62%	100%
200	26,32%	58%	42,31%	45,59%	38,93%	34,74%	70,98%
100	15,09%	53,37%	30,77%	38,69%	13,02%	26,98%	62,24%

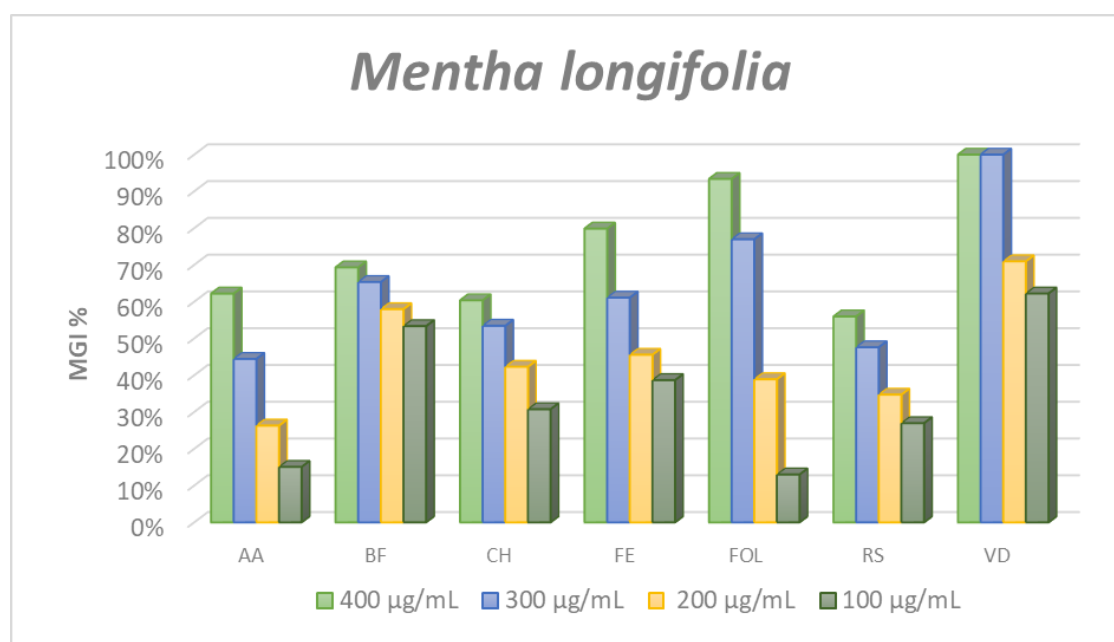


Figura 27: Representación gráfica del MGI (%) de *Mentha longifolia* a las dosis de 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL para las distintas especies ensayadas.

En las siguientes figuras se observa el crecimiento miceliar de los hongos que han sido objeto de estudio para los distintos aceites y dosis ensayadas en el presente trabajo. Se compara el crecimiento del hongo en medio PDA, sin adicionar aceite esencial en el medio, con el crecimiento del hongo crecido en PDA a las distintas concentraciones de aceite esencial tanto de *S. montana* (Figura 28) como de *Mentha longifolia* (Figura 29). Los hongos *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* se caracterizan por un crecimiento rápido, ya que a los 7 días de inoculación ocupan la totalidad, o gran parte, de la placa. En cambio, los hongos *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae* presentan un crecimiento más lento, teniendo poco desarrollo a los 7 días de inoculación.

El medio PDA conteniendo el aceite esencial de *Satureja montana* (Figura 28) inhibió completamente el crecimiento para la concentración de 300 µg/mL de todos los hongos: *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporu*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*. A una concentración menor, 200 µg/mL, sigue inhibiendo totalmente el crecimiento en cuatro de ellos: *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*. En cambio se observa un ligero crecimiento en *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana* y *Fusarium oxysporum*. Por último, en cuanto a la concentración de 100 µg/mL, destacamos la inhibición del crecimiento de *Verticillium dahliae*. Respecto al cambio morfológico que experimentan todas las especies fúngicas, se atenúa la intensidad de tonalidad y varía la apariencia en su textura.

En el caso del medio PDA con aceite esencial *Mentha longifolia* (Figura 29), resultó altamente efectivo frente a *Verticillium dahliae*, ya que es el hongo cuyo valor MGI es el más alto respecto al resto (100%). Por el contrario, *Alternaria alternata* presentó el valor de MGI más bajo. *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* experimentan un cambio de color, disminuyendo la intensidad de tonalidad; un cambio de apariencia en su textura; y una variación en la forma de desarrollo, siendo más uniforme y circular en su escaso crecimiento.

Figura 28: Crecimiento de AA, BF, CH, FE, FOL, RS Y VD en PDA (control) y en PDA con el aceite esencial de *S. montana* a las dosis de 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL, a los 7 días de incubación.

Satureja montana


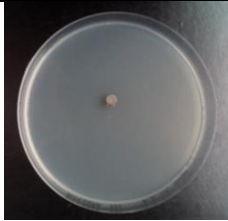



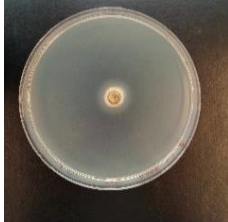



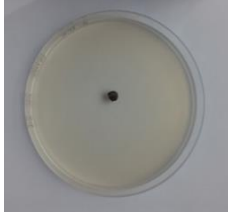

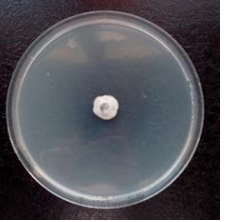

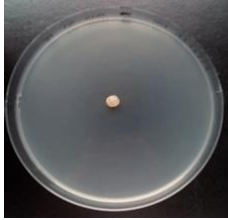



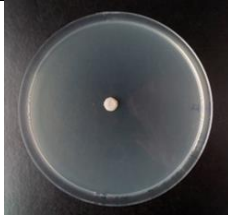



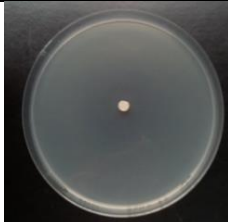
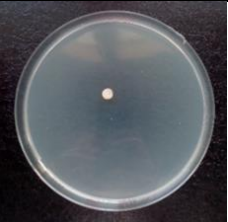
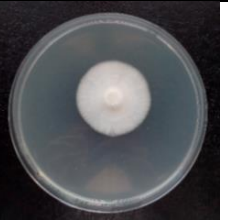








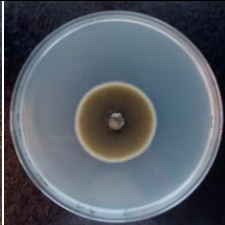

















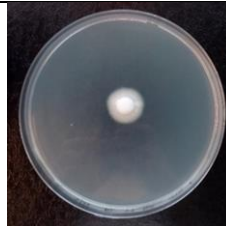
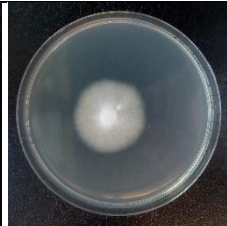
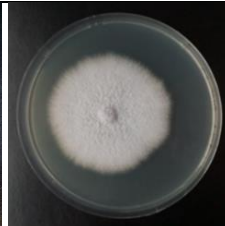










	CONTROL-PDA	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL
AA				
BF				
CH				
FE				
FOL				
RS				
VD				

Figura 29: Crecimiento de AA, BF, CH, FE, FOL, RS Y VD en PDA (control) y en PDA con el aceite esencial de *M. longifolia* a las dosis de 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL , a los 7 días de incubación.

Mentha longifolia

	CONTROL-PDA	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL
AA					
BF					
CH					
FE					
FOL					
RS					
VD					

4.4 Determinación del efecto fungicida y/o fungistático.

Una vez realizada la determinación de la actividad antifúngica de ambos aceites esenciales, cuyos resultados mostraron inhibiciones del 100%, procedimos a comprobar el efecto fungicida y/o fungistático de los mismos.

De las placas que dieron el 100% de inhibición del crecimiento fúngico a los 7 días de incubación, se tomó el mismo disco fúngico de inoculación (8 mm) y se sembró en el centro de placas Petri conteniendo únicamente PDA. El experimento se incubó a 25°C durante 7 días y una vez transcurrido el periodo de incubación se midió el diámetro de crecimiento de cada hongo.

En el caso del aceite esencial *Satureja montana* a la concentración de 300 µg/mL el efecto fue fungicida en *Rizhoctonia solani* y a 200 µg/mL todos los hongos ratificaron un efecto fungistático. Destacamos el cambio de efecto que experimenta RS, ya que a 300 µg/mL su efecto es fungicida y a 200 µg/mL el efecto es fungistático siendo su crecimiento medio menor al crecimiento estándar (crecimiento en PDA 113,4 mm). Por otra parte, *Fusarium equiseti* es un hongo más sensible una vez tratado con aceite, su crecimiento es menor al crecimiento estándar. Lo que nos hace pensar que probablemente al aumentar la concentración el efecto sería fungicida.

Tabla 6: Crecimiento medio (mm) de los hongos AA, CH, FE, RS y VD, cuyo MGI fue 100% a 300 µg/mL con aceite de *S. montana*, en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.

<i>Satureja montana</i>					
Tratamiento/ Hongos	AA	CH	FE	RS	VD
Diámetro medio (mm) 300 µg/mL → PDA	76	30	78	0	21,5
PDA	75,5	24	87,6	113,4	22,6

Tabla 7: Crecimiento medio (mm) de los hongos CH, FE, RS y VD, cuyo MGI fue 100% a 200 µg/mL con aceite de *S. montana*, en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.

<i>Satureja montana</i>				
Hongos	CH	FE	RS	VD
Diámetro medio (cm) 200 µg/mL → PDA	25	70,5	81	26,5
PDA	24	87,6	113,4	22,6

Por otra parte, en el caso de la *Mentha longifolia* el efecto se estudió en el hongo *Verticillium dahliae* cuyo MGI fue del 100%. Como podemos ver en la siguiente tabla el efecto, a la dosis de 300 µg/mL, fue fungistático.

Tabla 8: Crecimiento medio (mm) del hongo VD, cuyo MGI fue 100% a 300 µg/mL con aceite de *M. longifolia*, en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.

<i>Mentha longifolia</i>	
Hongo	VD
Diámetro medio (cm) 300 µg/mL → PDA	23,3
PDA	22,6

4.5 Discusión.

En la revisión realizada acerca de la actividad antifúngica de los aceites esenciales parece indicar que la actividad no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que, al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. Algunos autores indican que los aceites esenciales son significativamente más efectivos que sus componentes mayoritarios, mientras que otros muestran resultados contrarios (Santamarina y col., 2015).

Los resultados obtenidos en la composición del aceite esencial de *S. montana* coinciden con estudios previos realizados sobre la composición de dicha especie en diferentes países de la cuenca mediterránea. Así, distintos autores obtuvieron el compuesto carvacrol como el mayoritario del aceite esencial de *S. montana* (Angelini y col., 2003; Skočibušić y Bezić, 2004; Fraternali y col., 2007; Grosso y col., 2010; Serrano y col., 2011), recolectadas todas ellas en la época de floración. Otros autores también obtuvieron una composición semejante en muestras comerciales (Giordani y col., 2004; Silva y col., 2009). Otros autores obtuvieron el compuesto timol (isómero del carvacrol) como componente mayoritario en el aceite esencial (Mastelić y Jerković, 2003; Coutinho de Oliveira y col., 2012).

También existen muchas referencias bibliográficas que corroboran la actividad antifúngica del aceite esencial de *S. montana* sobre diferentes hongos. En Francia Giordani y col., (2004), estudiaron la actividad antifúngica de *S. montana* sobre *Candida albicans* y su composición química, cuyo componente mayoritario en el aceite esencial fue el carvacrol (31.43%). Estos autores obtuvieron resultados igual de satisfactorios que los nuestros pero a concentraciones mucho más elevadas.

En Croacia (Skočibušić y Bezić, 2004; Bezić y col., 2005), se llevaron a cabo ensayos de actividad antifúngica del aceite esencial de *S. montana* sobre dos levaduras (*C. albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*) y el hongo *Aspergillus fumigatus*, resultando el componente mayoritario del aceite esencial de *S. montana* el carvacrol (45.7%). En el primer trabajo (Skočibušić y Bezić, 2004), se determinó la concentración mínima inhibitoria que osciló entre 5000 µg/mL y 600 µg/mL de aceite esencial. En el segundo trabajo (Bezić y col., 2005), se determinó la inhibición del crecimiento micelial de *A. fumigatus*, *C. albicans* y *S. cerevisiae* estudiando distintas concentraciones del aceite. Ambos estudios comparten con nuestra investigación el gran poder de inhibición frente a diferentes hongos y levaduras, aunque a diferencia de nuestro trabajo, las concentraciones utilizadas por estos autores son mayores.

En Italia Tampieri y col., (2005) ensayaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *S. montana* (con carvacrol como compuesto mayoritario, 27.06%) sobre el crecimiento de *C. albicans*, inhibiendo completamente el crecimiento fúngico a una concentración de 0.5 µL/mL. También en Italia (Fraternali y col., 2007) se realizó un ensayo con el aceite esencial de *S. montana* (nuevamente carvacrol como componente mayoritario, 18.0%) con el objetivo de evaluar su actividad antifúngica contra nueve hongos fitopatógenos: *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cryptogea* y *Botrytis cinerea*. Se determinó en este caso la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial sobre estos nueve patógenos. También en estos estudios se demuestra una vez más el gran poder de inhibición del aceite esencia *S. montana* frente a diferentes hongos, siendo una concentración superior a la utilizada en este trabajo.

Por otra parte, en Italia Lopez y col., (2010) aplicaron el aceite esencial *S. montana* como agente antifúngico (*p*-cimeno 40.59% y carvacrol 36.19%) para el control de dos hongos de poscosecha: *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. En este caso el ensayo consistió en inocular sobre heridas realizadas en frutos de cuatro variedades de manzana, Golden Delicious, Granny Smith, Red Chief y Royal Gala, el agente patógeno y añadir distintas concentraciones del aceite esencial (1 y 10 %) sobre ellas, midiendo a los 15 y 30 días el diámetro de la podredumbre que había causado el hongo. La inhibición y reducción de la podredumbre de los frutos tratados con aceite esencial fue en todos los casos estadísticamente significativa.

En el presente estudio el aceite esencial de *S. montana*, ha mostrado una potente actividad antifúngica frente a: *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*, con valores de inhibición del crecimiento micelial (MGI) del 100% en todas las especies fúngicas, a excepción de dos de los hongos ensayados que fue de más del 90%.

Teniendo en cuenta la composición química de dicho aceite esencial, parece claro que existe una relación entre su elevada actividad fungicida y la presencia de compuestos fenólicos en el aceite esencial como el carvacrol y sus precursores *p*-cimeno y α -terpineno, tal y como se ha confirmado en numerosos estudios previos de esta misma especie u otras con idéntica composición.

Respecto al aceite esencia *Mentha longifolia*, los resultados obtenidos concuerdan con diferentes investigaciones acerca de la composición de dicho aceite en diferentes países. En Italia según Maffei y col. (1988), los componentes mayoritarios fueron: óxido de piperitenona (77.4%), germacreno D (3.7%), 1,8-cineol (1.6%). En India fueron Óxido de piperitenona (54.2%), óxido de trans- y cis- piperitona (24.1% y 7%), β - cariofileno (3%), dl-limoneno (1.4%), eucaliptol (1.2%) los componentes identificados (Pal Singh y col., 2008). Por último, un estudio realizado en Pakistán por Hussain y col. (2010), se obtuvo como componentes principales: óxido de piperitenona (40.1-64.6%), piperitenona (2-16.4%), borneol (4.4-13.3%), germacreno D (5.1-6%), β -cariofileno (2.5-4.2%), pulegona (2.1-3.9%).

En la investigación realizada por Hajlaoui y col., (2010), reportan la composición y propiedades antibacterianas de aceite esencial de *Mentha longifolia*. *Ssp longifolia*, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y señalan que el análisis químico del aceite esencial mostró la presencia de 34 compuestos.

Gracias a la sinergia de todos los componentes del aceite esencial de la menta, los resultados también fueron bastante satisfactorios a la dosis de 300 µg/mL, mostrando valores de inhibición del crecimiento micelial (MGI) entre el 45 y el 60%, siendo del 77% sobre *Fusarium oxysporum lycopersici*, alcanzando el 100% de inhibición del crecimiento micelial sobre *Verticillium dahliae*.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

Aceite esencia *Satureja montana*

- Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *S. montana* pertenecen al grupo de los monoterpenos, que representan el 75% del total.
- En el aceite esencial de *S. montana* el compuesto mayoritario es el carvacrol que aparece en una proporción del 24 %.
- A 300 µg/mL inhibió el crecimiento de todos los hongos objeto de estudio, con valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) del 100% en todas las especies fúngicas, a excepción de *Botrytis fuckeliana* y *Fusarium oxysporum lycopersici* que muestran un 92,8% y 97,6%, respectivamente. A la dosis de 200 µg/mL inhibió totalmente el crecimiento de cuatro de las siete especies fúngicas estudiadas.
- El valor más bajo del MGI lo encontramos a concentración de 100 µg/mL para los hongos *Curvularia hawaiiensis* y *Fusarium oxysporum* con una inhibición entre el 40-50%, valores nada despreciables.
- En el caso de los hongos *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium equiseti*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* las dosis de 200 y 300 µg/mL de aceite esencial *S. montana* son igualmente efectivas, siendo la inhibición de su crecimiento del 100%.
- El aceite esencial de *S. montana* presentó una excelente inhibición del crecimiento miceliar en los hongos ensayados, por lo que este aceite y/o sus componentes podrían ser una alternativa para el control de estos hongos, y para alargar la vida útil de los productos agrícolas en post-cosecha y almacenados.

Aceite *Mentha longifolia*

- En el aceite esencial de *M. longifolia* el compuesto mayoritario es el óxido de piperitenona con una proporción del 52,72%.
- En cuanto a la actividad antifúngica del aceite esencial de *M. longifolia* alcanzó el 100% de inhibición del crecimiento miceliar sobre *Verticillium dahliae* a una concentración de 300 µg/mL.
- Para el aceite esencial de *M. longifolia* el valor más bajo del MGI lo encontramos a concentración de 300 µg/mL para los hongos *Alternaria alternata* y *Curvularia hawaiiensis* con una inhibición entre 40-60%, valores nada despreciables.
- La mayor actividad antifúngica de *M. longifolia*, se debe a su elevado contenido en cetonas monoterpénicas, concretamente, la carvona y sus derivados, pulegona, mentona e isomentona.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA.

- AGRIOS, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant Pathology. Elsevier Academic Press, California*, 385-614.
- AGRIOS, G.N. (2004). *Plant pathology. Elsevier Academic Press.*
- AGRIOS, G.N. (2008). *Fitopatología*. Editorial Limusa. México.
- ALBÁN MÉNDEZ, A. P. (2015). *Identificación, aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad de infección en tubérculos Rhizoctonia Solani de suelos paperos de la provincia de Carchi* (Bachelor's thesis, Universidad de las Fuerzas Armada ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.).
- ALVAREZ, V. C., GUELFAND, L., PIDONE, J. C., SOLOAGA, R., ONTIVERO, P., MARGARI, A., & DANERI, G. L. (2011). Rinosinusitis alérgica fúngica causada por *Curvularia* sp. *Revista iberoamericana de micología*, 28(2), 104-106.
- ANGELINI, L.G., CARPANESE, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCHIA, M. Y FLAMINI, G., (2003). Essential Oils from Mediterranean *Lamiaceae* as Weed Germination Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6158-6164.
- ANGULO, C., & ERICSON, R. (2014). Efecto de *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*/*Trichoderma pseudokoningii* nativas del distrito de Huamachuco sobre *Rhizoctonia solani*.
- ARCELLA, D., ESKOLA, M., GOMEZ, J.A. (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. European Food Safety Authority. Doi: 10.2903. *EFSA Journal* 2016; 14: 32pp.
- ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN, B., ÁLVAREZ-ROMÁN, R., & GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A. (2016). Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro-y nanoparticulados. *OmniaScience Monographs*.
- ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., ADDI, E. A., CASABIANCA, H., & ELAISSARI, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1), 220-243.
- BARROW, G. (1972). *Química Física*, vols. 1 e 2. Ed. Reverté S.A., Barcelona, 491 pp.
- BEZIĆ, N., SKOČIBUŠIĆ, M. Y DUNKIĆ, V., (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica* 64: 313-322.
- BLÁZQUEZ, M.A. (2014). Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. *Journal of Scientific Research & Reports*, 3(14), 1843-1860.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

- CASTROVIEJO, B. S. (2010) (eds.). *Flora iberica. [...] Vol. 12. Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae*,
- CHÁVEZ, M. G. C. (2007). *Hidrodestilacion de aceites esenciales: modelado y caracterizacion* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Tese).
- COUTINHO DE OLIVEIRA, T.L., MALFINATO DE CARVALHO, S., DE ARAUJO SOARES, R., APARECIDA ANDRADE, M., DAS GRAÇAS CARDOSO, M., MENDES RAMOS, E. Y HILSDORF PICCOLI, R., (2012). Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology* 45: 204-212.
- DAVIDSON, P., PALOU, E., PARISH, M. E., & LOPEZ-MALO VIGIL, A. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. In P. Michael Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in Food*, Third Edition (pp. 659-680). CRC Press.
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., & DUKE, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- DE GRANADA, E. G., DE AMEZQUITA, M. C. O., MENDOZA, G. R. B., & ZAPATA, H. A. V. (2001). Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25.
- DORMAN, H. J. D., & DEANS, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- ESCALONA, Y., RODRÍGUEZ, D., & HERNÁNDEZ, A. (2011). Rhizoctonia solani Kühn aislado de papa (Solanum tuberosum L.) en los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. I. Caracterización cultural. *Bioagro*, 23(3).
- ESCALONA, Y., RODRÍGUEZ, D., & HERNÁNDEZ, A. (2012). Estudio de Rhizoctonia solani Kühn aislado de papa (Solanum tuberosum L.) En los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. II. Virulencia y caracterización molecular. *Bioagro*, 24(1).
- ESTRADA, G., & SANDOVAL, I. (2004). Patogenicidad de especies de Curvularia en arroz. *Fitosanidad*, 8(4).
- FAO. (2001). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2000 – informe principal. Estudio FAO: Montes Núm. 140. Roma, Italia.
- FERNÁNDEZ, M. V. (2015). *Identificación y caracterización de grupos de especies de Alternaria y Pithomyces asociados a enfermedades del trigo en Argentina* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales).
- FISHER, K., & PHILLIPS, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240.
- FLORA IBERICA, 2010. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol XII Verbenaceae – Labiatae – Callitrichaceae. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid, pp. 414-421.

- FRATERNALE, D., GIAMPIERI, L., BUCCHINI, A., RICCI, D., EPIFANO, F., GENOVESE, S. Y CURINI, M., (2007). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from central Italy. *Chemistry of Natural Compounds* 43: 622-624.
- GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M. Y VIVANCO F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. SÍNTESIS, SA. Madrid. 398 pp.
- GIORDANI, R., REGLI, P., KALOUSTIAN, J., MIKAÏL, C., ABOU, L. Y PORTUGAL, H., (2004). Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research* 18: 990-995.
- GROSSO, C., COELHO, J.A., URIETA, J.S., PALAVRA, A.M.F. Y BARROSO, J.G., (2010). Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender, and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 11007-11013.
- GUERRERO-RODRÍGUEZ, E., SOLÍS-GAONA, S., HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D., FLORES-OLIVAS, A., SANDOVAL-LÓPEZ, V., & JASSO-CANTÚ, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc.* y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48-53.
- HAJLAOUI HAFEDH, BEN ABDALLAH FETHI, SNOUSSI MEJDI. (2010). Efecto de la *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* aceite esencial sobre la morfología de cuatro bacterias patógenas visualizado por microscopía de fuerza atómica. Borj-Cedria, BP273 -Soliman8020,Túnez
- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci Food Agric*, 90: 1827-1836.
- INDEX FUNGORUM. (2016). www.indexfungorum.org.
- JAMALI, C. A., EL BOUZIDI, L., BEKKOUCHE, K., LAHCEN, H., MARKOUK, M., WOHLMUTH, H.,... & ABBAD, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chemistry & biodiversity*, 9(6), 1188-1197.
- JELÉN, H. H., MIROCHA, C. J., WASOWICZ, E., & KAMIŃSKI, E. (1995). Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3815-3820.
- KOTAN, R., F. DADASOGLU, K. KARAGOZ, A. CAKIR, H. OZER, S. KORDALI, R. CAKMAKCI, N. DIKBAS, (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Sci. Hortic.*, 153, 34-41.
- KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., & SATYA, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802-817.
- LESLIE, J. F., & SUMMERELL, B. A. (2006). *Fusarium* laboratory workshops—A recent history. *Mycotoxin research*, 22(2), 73-74.

- LÓPEZ CASTAÑO, S., (2012). Estudio de la Variabilidad Química de dos Poblaciones de *Mentha longifolia* L. Procedentes de Calamocha (Teruel). Trabajo Fin de Carrera. Univ. Politècnica de València, 157 pp.
- LÓPEZ GONZÁLEZ, G., (1982). Compendio de las Saturejæ ibéricas con las noticias más notables referentes sobre todo a algunas de ellas. Anales Jardín Botánico de Madrid 38(2): 361-415.
- LOPEZ-REYES, J.G., SPADARO, D., GULLINO, M.L. Y GARIBALDI, A., (2010). Efficiency of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. Flavour and Fragrance Journal 25: 171-177.
- LÁZARO-DZUL M.O. DR., QUEZADA-SALINAS A. DR., GARCÍA-AVILA C. J., (2008) Ficha Técnica marchitez por Verticillium Verticillium dahliae Klebahn.
- MADER, S.; WINDELSPECHT, M. (2013). Biología. Ed. Mc Graw-Hill. México.
- MAFFEI, M. (1988). A chemotype of *Mentha longifolia* (L.) hudson particularly rich in piperitenone oxide. Flavour and Fragrance Journal, 3: 23-26.
- MASTELIĆ, J. Y JERKOVIĆ, I., (2003). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry 80: 135-140.
- MOLINA, J. A. L., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2012). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales: algunos experimentos para la introducción a la química orgánica. ENSEÑANZA Y DIVULGACIÓN, 283.
- MUÑOZ CENTENO. L.M., (2003). Plantas medicinales españolas: *Satureja montana* L. (*Lamiaceae*, ajedrea silvestre). *Lazaroa* 24: 19-23.
- PAL SINGH, H.; BATISH, D. R. MITTAL, S.; DOGRA, K. S.; YADAV, S; KOHLI, R.K. (2008). Constituents of leaf essential oil of *Mentha longifolia* from India. Chemistry of Natural Compounds, 44 (4).
- PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- Ramírez, L. S., Isaza, J. H., Ingela Veloza, L., Stashenko, E., & Marín, D. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. *Ciencia*, 17(4).
- RELLÁN, D. G. (2013). *Ecología química y actividad biológica de las especies perennes de satureja l. en la península ibérica* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- RIVAS, M. (1982). *Datos nomenclaturales y ecológicos sobre taxones españoles del género satureja, labiatae*. Anales Edafología Agrobiológica 41: 1513-1516.
- ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., SANZ-BERZOSA, I., CHIRALT, A., & SANTAMARINA, M. P. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), 359-367.
- SAEIDI, S., HASSANPOUR, K., GHAMGOSHA, M., HEIAT, M., TAHERI, R. A., MIRHOSSEINI, A., & FARNOOSH, G. (2014). Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of *Mentha longifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important human pathogens. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S186-S189.

- SAMSON, R. A., HOEKTRA, E. S., & FRISVAD, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed.7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- SÁNCHEZ, S. P. (2017). Evaluación de las propiedades fungicidas del ácido salicílico frente a hongos patógenos.
- SANTAMARINA, M. P., & ROSELLO, J. (2006). Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. *Crop Protection*, 25(10), 1130-1134.
- 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. *Natural product research*, 29(23), 2215-2218.
- SERRANO, C., MATOS, O., TEIXEIRA, B., RAMOS, C., NENG, N., NOGUEIRA, J., NU-NES, M.L. Y MARQUES, A., (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of Science Food Agriculture* 91: 1554-1560.
- SILVA, F.V.M., MARTINS, A., SALTA, J., NENG, N., NOGUEIRA, J.M.F., MIRA, D., GASPAR, N., JUSTINO, J., GROSSO, C., URIETA, J.S., PALAVRA, A.M.S. Y RAUTER, A.P., (2009). Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 11557-11563.
- SITTE, P., WEILER, E.W., KADEREIT, J.W., BRESINSKY, A. Y KÖRNER, C., (2004). Strasburger. *Tratado de botánica*. Ed. Ediciones Omega, S.A. ISBN: 978-84-282-1353-0.
- SKOČIBUŠIĆ, M. Y BEZIĆ, N., (2004). Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Re-search* 18: 967-970.
- SORIANO DEL CASTILLO, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L. y Morelli, I., 2005. The inhibition of *Candida albicans* by se-lected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 159: 339-345.
- TAMPIERI, M.P., GALUPPI, R., MACCHIONI, F., CARELLE, M.S., FALCIONI, L., CIONI, P.L. Y MORELLI, I., (2005). The inhibition of *Candida albicans* by se-lected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 159: 339-345.
- TIAN, L., YU, J., WANG, Y., & TIAN, C. (2017). The C2H2transcription factor VdMsn2 controls hyphal growth, microsclerotia formation, and virulence of *verticillium dahliae*. *Fungal Biology*, 121(12), 1001-1010.
- TORRES, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1-3), 11-16.
- TZORTZAKIS, N. G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 97-102.
- VELASCO NEGUERUELA, A., & ALONSO, M. J. P. (1983). Estudio químico del aceite esencial de diversas " *Saturejae*" ibéricas. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 40, No. 1, pp. 107-118). Real Jardín Botánico.

- VERDEGUER SANCHO, M. M. (2011). *Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses*(Doctoral dissertation).
- VICHICELA, B., & ELIZABETH, P. (2014). *Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de mora de castilla (rubus glaucus benth) sector Huachi Chico-Ambato-Tungurahua, 2014*(Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2015).
- VILJOEN, A. M.; PETKAR, S.; VAN VUUREN, S. F.; FIGUEREIDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. (2006). The Chemo-Geographical Variation in Essential Oil Composition and the Antimicrobial Properties of “Wild Mint” – *Mentha longifolia* subsp. *polyadena* (Lamiaceae) in Southern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 60-65.
- WALKER, A. S., GLADIEUX, P., DECOGNET, V., FERMAUD, M., CONFAIS, J., ROUDET, J.,... & FOURNIER, E. (2015). Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management. *Environmental microbiology*, 17(4), 1261-1274.
- ZARGARI, A., (1990). *Medicinal plants*. 4th edition 42-45, Tehran University Publications, Iran.

