

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA.



Escuela Superior de Ingeniería.

Ingeniería Agrícola.

Mención en Hortofruticultura y Jardinería.

Trabajo Fin de Grado.

Efectividad *in vivo* e *in vitro* de aceite y extractos de geranio (*Pelargonium graveolens*) en el control de hongos fitopatógenos.

Alumno:

María Elena Raya Torres

Directores:

Dra. Milagrosa Santos Hernández

Dr. Fernando José Diánez Martínez

ALMERÍA, JULIO 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas que me han prestado ayuda para hacer posible el desarrollo de este proyecto, especialmente a la directora del mismo, Milagrosa Santos Hernández, por su atención y dedicación.

A mis padres, Valentín y Luci los cuales son el pilar fundamental en mi vida. Gracias por transmitirme todos los valores y enseñarme a vivir cada minuto con amor, alegría y gratitud, todo lo que soy es gracias a vosotros.

A mi hermano Valentín por darme tanta energía y cariño pero sobretodo a mi hermana, mi amiga y mi gran tesoro, gracias por ser mi guía en el camino.

A Pablo por hacer que mis palabras tengan forma y sentido, gracias por haber hecho que este proyecto salga adelante dándome todo tu ánimo y ayuda durante todo el tiempo.

A Carbelo y Fran, mis mejores amigos y el gran descubrimiento de esta etapa. Gracias por conseguir que este tiempo haya sido inolvidable, habéis hecho que cada día sea una nueva aventura.

Y por último quisiera agradecer a Germán, por su paciencia y espera cada día, por su apoyo para lograr todos mis propósitos, sacando siempre lo mejor que hay en mí. A ti te debo mi alegría e ilusión. Gracias por hacerme sentir la persona con más suerte del mundo.

A todas las personas que durante esta etapa, de una forma u otra me han acompañado y empujado a conseguirlo. Porque me recordaron que una gota de agua que perfora una roca no lo hace por su fuerza si no por su constancia.

INDICE GENERAL

1	INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
1.1	Interés.....	1
1.2	Objetivos.....	2
1.2.1	Objetivo general.	2
1.2.2	Objetivos específicos.	2
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1	Control biológico.	3
2.1.1	Historia y definiciones del control biológico.	3
2.1.2	Características del control biológico.	5
2.1.3	Métodos de control biológico.	6
2.1.4	Objetivos del control biológico.....	6
2.2	Manejo Integrado de Plagas.....	6
2.2.1	Definiciones del Manejo Integrado de Plagas.....	6
2.2.2	Desarrollo del Manejo Integrado de Plagas.	7
2.3	Cultivo del tomate.....	8
2.3.1	Importancia del cultivo del tomate.....	8
2.3.2	La problemática en el manejo de las diversas plagas y enfermedades en el cultivo del tomate.....	9
2.3.2.1	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	10
2.3.2.2	<i>Phytophthora nicotianae var. parasitica (Phytophthora parasitica)</i>	11
2.4	Extractos y aceites esenciales.....	13
2.4.1	Extractos vegetales.....	13
2.4.2	Aceites esenciales.....	14
2.4.3	Geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>).....	16
2.4.4	El uso de extractos y aceites esenciales en la agricultura.....	17
3	MATERIALES Y MÉTODOS.	21
3.1	Situación y emplazamiento.	21
3.2	Ensayo <i>in vivo</i>	21
3.2.1	Diseño experimental en campo.....	21
3.2.2	Preparación de extractos.....	22

3.2.3	Preparación del aceite.....	23
3.2.4	Aplicación en campo.....	23
3.2.5	Preparación del inculo.....	24
3.2.6	Aplicación del fungicida.....	24
3.2.7	Evaluación del ensayo.....	24
3.3	Ensayo <i>in vitro</i>	25
3.3.1	Diseño experimental en laboratorio.....	25
3.3.2	Preparación de los extractos <i>in vitro</i>	26
3.3.3	Preparación de los aceites <i>in vitro</i>	26
3.3.4	Preparación del medio de cultivo.....	27
3.3.5	Preparación de las placas de siembra.	27
3.3.6	Siembra de discos de micelio.	27
3.3.7	Evaluación del ensayo.....	28
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	29
4.1	Resultados.	29
4.1.1	Introducción.....	29
4.1.2	Ensayo <i>in vivo</i>	29
4.1.2.1	Efecto <i>in vivo</i> de aceite esencial de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre el desarrollo de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> en un cultivo de tomate.....	29
4.1.2.2	Efecto <i>in vivo</i> de aceite esencial de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre el desarrollo de <i>Phytophthora nicotianae var. parasitica (Phytophthora parasitica)</i> en un cultivo de tomate.	31
4.1.2.3	Efecto <i>in vivo</i> de extractos de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre el desarrollo <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> en un cultivo de tomate.....	33
4.1.2.4	Efecto <i>in vivo</i> de extractos de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre el desarrollo de <i>Phytophthora nicotianae var. parasitica (Phytophthora parasitica)</i> en un cultivo de tomate.....	35
4.1.2.5	Efecto de extractos y aceite de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	37

4.1.2.6 Efecto de extractos y aceite de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) sobre <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (<i>Phytophthora parasitica</i>)....	38
4.1.2.7 Resultado global <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	39
4.1.2.8 Resultado global <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (<i>Phytophthora parasitica</i>).	41
4.1.3 Ensayo <i>in vitro</i>	42
4.1.4 Efecto <i>in vitro</i> de diferentes concentraciones de extracto y aceite esencial sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	42
4.1.4.1 Efecto <i>in vitro</i> de diferentes concentraciones de extracto y aceite esencial sobre el crecimiento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (<i>Phytophthora parasitica</i>).	44
4.2 Discusión.....	46
5 CONCLUSIONES.....	49
5.1 Ensayo <i>in vivo</i>	49
5.2 Reflexión.....	49
6 BIBLIOGRAFÍA.....	49

INDICE DE FIGURAS:

IMÁGENES:

Imagen 1: Localización del ensayo	21
Imagen 2: Detalle de la distribución de los tratamientos en el invernadero.....	22
Imagen 3: Descripción del proceso de obtención de los extractos.	23
Imagen 4: Fungicida empleado.	24
Imagen 5: Tratamientos realizados.....	26
Imagen 6: Micro filtración y preparación de concentraciones.	26
Imagen 7: Vertido de medio de cultivo con extractos y aceite esencial.....	27

GRÁFICAS:

Gráfica 1: Control de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> mediante el uso de aceite de geranio.....	30
Gráfica 2: Control de <i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (<i>Phytophthora parasitica</i>) mediante el uso de aceite de geranio.....	32
Gráfica 3: Control de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> mediante el uso de extractos de geranio.....	34

Gráfica 4: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos de de geranio..... 36

Gráfica 5: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 37

Gráfica 6: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 38

Gráfica 7: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT. 40

Gráfica 8: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT. . 41

Gráfica 9: Inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 43

Gráfica 10: Inhibición de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 45

TABLAS:

Tabla 1: Listado de los diez principales productores de tomate (FAOSTAT, 2016). 8

Tabla 2: Fechas relevantes en la aplicación de extractos y aceites. 23

Tabla 4: Fechas de muestreo..... 24

Tabla 5: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de aceite de geranio..... 31

Tabla 6: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de aceite de geranio. 32

Tabla 7: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos de geranio..... 34

Tabla 8: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos de geranio..... 36

Tabla 9: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 38

Tabla 10: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 39

Tabla 11: Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT. 40

Tabla 12: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT. . 42

Tabla 13: Inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 44

Tabla 14: Inhibición de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio. 45

INTERÉS Y OBJETIVOS

1 INTERÉS Y OBJETIVOS.

1.1 Interés.

El sector agrícola almeriense es de vital importancia a nivel provincial, regional y nacional (Valera, 2016). Hablar de agricultura en la provincia de Almería es hablar de la producción hortícola en cultivos intensivos, lo que popularmente se conoce como “la huerta de Europa” (Camacho, 2003). El sector hortícola almeriense, debido a la actual evolución de los mercados, se encuentra ante uno de sus mayores retos, continuar siendo competitivo. Algunos aspectos relevantes a tener en cuenta para conseguir dicho objetivo son la implantación total de la producción integrada, que en su amplio sentido incluye, entre otros, el control biológico. (Beltrán *et al.*, 2010).

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo y la de mayor valor económico (Ferratto y Mondino, 2008). La provincia de Almería tiene 10.232 ha, con una producción de 958.462 toneladas (Junta de Andalucía, 2010). Las enfermedades causadas por hongos son factores limitantes en cultivo del tomate, y la presencia de resistencias es fundamental en el manejo y gestión de estas enfermedades (Janssen *et al.*, 2016). Según la Sociedad Española de Fitopatología en su libro publicado “Patógenos de plantas descritos en España” se describen 18 especies de hongos capaces de producir enfermedades en los cultivos de tomate en España (SEF, 2016). Algunos de estos patógenos pueden resultar factores limitantes para la producción (Janssen *et al.*, 2016).

El control de hongos fitopatógenos a través de fungicidas sintéticos continúa siendo la medida fitotécnica más utilizada para aumentar los rendimientos de los cultivos (Bernal *et al.*, 2005). El marco de una agricultura sostenible ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos para el control de enfermedades cuya actividad y seguridad ambiental sea adecuada (Wilson *et al.*, 1999; Bautista *et al.*, 2004; Boyraz y Ozcan, 2006, Hernández *et al.*, 2007). Se ha abierto un amplio campo de investigación en torno al uso de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios presentes en plantas, que constituyen hoy en día una alternativa promisoriosa para contrarrestar el efecto negativo de algunos microorganismos fitopatógenos, por su bajo costo, por ser amables con el medioambiente y la salud en general (Villa *et al.*, 2015).

1.2 Objetivos.

1.2.1 Objetivo general.

Debido al creciente interés y desarrollo del uso de productos naturales, lo que se persigue con este trabajo es determinar la capacidad antifúngica de extractos vegetales y aceite esencial frente a hongos fitopatógenos del tomate para así conseguir diferentes alternativas al control con fungicidas sintéticos.

1.2.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto *in vivo* de extractos y aceite esencial de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*).
- Evaluar el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de extracto y aceite esencial sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Control biológico.

2.1.1 Historia y definiciones del control biológico.

El control biológico es una técnica ancestral cuyo conocimiento científico ha evolucionado con el transcurso del tiempo (Teruel, 2011). El registro escrito más antiguo conocido sobre el uso de un organismo para controlar la población de otro era el uso de gatos para el control de los roedores en las tiendas de alimentos en el antiguo Egipto alrededor 3.000 a.C. (Lavandero *et al.*, 2006).

En la antigua China, agricultores observaron el fenómeno natural del control biológico cuando las hormigas se comportaban como depredadores efectivos de muchas plagas de cítricos (Nicholls, 2008).

Ya en el siglo XIX, Charles Valentine Riley (1875), considerado como el padre del control biológico de plagas en la agricultura contemporánea observó como la lucha contra la cochinilla acanalada (*Icerya purchasi*) fue uno de los mayores éxitos contra las plagas. Debido a este descubrimiento las importaciones de *Rodolia cardinalis* a los Estados Unidos entre 1888-1889 produjeron una importante reducción de las poblaciones de *I. purchasi*, salvando a la floreciente industria de los cítricos de California.

Las definiciones de control biológico han sido varias a lo largo del tiempo, la primera referencia acerca de la denominación de "Control Biológico" fue utilizada por Smith en agosto de 1919 en la reunión de la Rama Pacific Slope de la Asociación Estadounidense de Entomólogos Económicos en el Mission Inn en el centro de Riverside.

A su vez Balachowsky (1951) veía la lucha biológica como el "conjunto de métodos que aseguran la destrucción de insectos mediante la utilización racional de sus enemigos naturales pertenecientes tanto al reino animal como al reino vegetal". Cuatro décadas después en 1964 un estudiante del Dr. Harry S. Smith, Paul DeBach lo definió "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1964).

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) en 1973 la definió como "la utilización de organismos vivos o de sus productos para impedir o reducir las pérdidas o daños causados por organismos nocivos", apoyándose en la definición de Balachowsky (1951).

En 1974 Baker y Cook definen como "la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o dormante, por uno o más organismos, que se logra de manera natural o a través de manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista, o por introducción en masa de uno o más antagonistas".

Tiempo después la definición fue cambiada a "la reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno que se logra mediante la acción de uno o más organismos además del hombre" (Baker, 1980).

Van den Bosch *et al.*, (1982) utilizan la expresión "control biológico" con dos acepciones: la introducción de los enemigos naturales por el hombre y el manejo que éste hace de ellos para controlar las plagas, al que llaman control biológico aplicado, y el control espontáneo en la naturaleza, sin la intervención del hombre, que denominan control biológico natural.

Gabriel y Cook (1990) mencionaron que el control biológico debe incluir organismos (hiperparásitos y antagonistas) naturales o genéticamente modificados por recombinación genética y genes o productos de genes, así como hospederos resistentes.

Entre las definiciones más recientes del control biológico, Wilson y Wisniewski (1994) lo contemplan como "todo tipo de control que no involucre el uso de plaguicidas de síntesis química". Van Driesche y Bellows (1996), haciendo referencia al "uso de organismos vivos para controlar plagas cuando el control es logrado exclusivamente por los organismos liberados.

Erwin y Ribeiro (1996) lo definieron como "el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) y favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales e insectos y microorganismos benéficos".

Pérez Consuegra (2004) hace referencia a una definición enunciada por Van Driesche y Bellows (1996) que expresa que "el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo esta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de éstos", considerando esta definición bastante amplia y que incluye todos los grupos de organismos con capacidad para mantener y regular densidades poblacionales de

organismos plaga a un nivel bajo, por lo tanto todos pueden considerarse agentes de control biológico y estar incluidos en la categoría de enemigo natural.

Desde el punto de vista de sanidad vegetal el control biológico comprende un conjunto de técnicas que no solo incluyen la aplicación de organismos vivos si no también algunas otras técnicas denominadas parabiológicas donde se encuentran incluidas el uso de feromonas, trampas y extractos vegetales (Martínez, 2008).

Según Santos (2010), el control biológico se puede definir como la reducción de la incidencia o severidad de una enfermedad. En la naturaleza este control se da de forma espontánea y natural siendo el equilibrio lo normal, de tal forma que el control es la regla y la enfermedad la excepción.

En 2011 la fundación Cajamar en su informe técnico del estado del control biológico en España lo define como “la utilización de organismos vivos o productos que los contengan a fin de reducir los daños económicos que causan plagas, patógenos y malas hierbas en los cultivos. De este modo, se debe distinguir entre control biológico de plagas, enfermedades y malas hierbas”.

2.1.2 Características del control biológico.

El control biológico tiene características propias que lo distinguen de otras formas de control de plagas, ajustándose a diferentes tipos de agricultura. El control biológico en la naturaleza tiende a ser permanente, presentando un equilibrio entre parasitoides y hospedadores, claramente influenciados por las variaciones del medio ambiente (Cisneros, 1995).

Entre las ventajas del control biológico se encuentran: la inocuidad sobre las plantas ya que los enemigos naturales no producen residuos tóxicos, despliegan más de un mecanismo de control, las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos biológicos, la relación entre planta-patógeno es absolutamente única por lo que las posibilidades de control biológico son ilimitadas y desde un punto de vista económico, la relación que existe entre beneficios y costos es favorable (Grondona *et al.*, 1994).

Como desventajas en el control biológico se encuentran: el tiempo transcurrido hasta la obtención de resultados, los problemas de instalación de los parasitoides con respecto a las plagas que atacan, por lo que no consiguen eliminar la enfermedad. La influencia de las

condiciones climáticas como en cualquier proceso biológico determina el éxito del control de plagas (Grondona *et al.*, 1994, Cisneros, 1995).

2.1.3 Métodos de control biológico.

Para la implantación del control biológico se deben llevar a cabo una serie de medidas previas como son: partir de material vegetal sano, práctica de labores y técnicas adecuadas (Densidad de siembra, nutrición o riego), uso de elementos de protección, aumento de la diversidad de plantas y sanidad y limpieza del entorno (Nicholls, 2008; Aparicio *et al.*, 1995). Según Schroth y Hancock (1981), existen un conjunto de estrategias fundamentales para efectuar el control biológico en el medio, mediante la introducción o liberación de agentes de control biológico, aprovechamiento de control natural y manipulación del ambiente en beneficio de aquellos posibles antagonistas presentes en el ecosistema, que controlen la interacción del patógeno con su hospedadora.

2.1.4 Objetivos del control biológico.

El objetivo del control biológico es reducir las enfermedades y plagas de las plantas, reduciendo la severidad del ataque, disminuyendo el inoculo y difusión del patógeno y minorando la infección del hospedador del patógeno, restableciendo los niveles de control natural auto-sostenido propio de los ambientes nativos (Grondona *et al.*, 1994). Además de restringir o eliminar los riesgos de residuos proporcionando una seguridad alimenticia y cumpliendo las exigencias de los mercados de explotación (Lomeli, 2014).

Es necesario enfatizar, que desde el punto de vista económico se pretende mantener un sistema rentable y de alto rendimiento (Altieri, 2009).

2.2 Manejo Integrado de Plagas.

2.2.1 Definiciones del Manejo Integrado de Plagas.

La estrategia de control integrado se puede definir como "una combinación de métodos de control (biológico, químico, cultural) que se utilizan en el orden y tiempo correctos, mantienen la población de patógenos por debajo del umbral de daño económico" (Raven *et al.*, 1993). Según Lewis y Papavizas (1991), "se trata de un control flexible, con la aplicación multidimensional, que integra distintos tipos de control tales como, control biológico, físico y labores culturales apropiadas junto con estrategias de control químico para la restricción de enfermedades, teniendo como finalidad la eliminación de los daños

económicos manteniendo la viabilidad económica sin dañar el agroecosistema" (Viñuela y Jacas, 1993).

Este fenómeno natural de regulación de plagas y enfermedades ha sido utilizado por el hombre con el fin último de controlar poblaciones y disminuir el impacto que generan en los cultivos con algún aprovechamiento o interés económico. En la década de los 70 del siglo pasado surge la definición de Manejo Integrado de Plagas (MIP) la cual es una estrategia que tiene como objetivo controlar las plagas, enfermedades y malezas que afectan la agricultura, con un enfoque sostenible y un uso responsable de productos agroquímicos y productos biotecnológicos (van des Boshch *et al.*, 1982).

Finalmente la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) define la Producción Integrada como "sistema de producción sostenible de alimentos de alta calidad mediante métodos respetuosos con el Medio Ambiente y manteniendo los ingresos de la explotación" (Salmerón, 2001).

Según Salmerón la OILB se basa para la elaboración de los Reglamentos de Producción Integrada de acuerdo a los siguientes principios:

- Conservación de recursos (edafológicos, hidráulicos y genéticos).
- Uso racional de insumos (energético, fitosanitarios y fertilizantes).
- Gestión adecuada de residuos (sólidos y líquidos).
- Conservación y mejora del medio (paisaje, ecosistemas, seguridad e higiene de la población rural).

2.2.2 Desarrollo del Manejo Integrado de Plagas.

Los inicios de la producción integrada en Europa datan de mediados de los años 70 del siglo pasado, cuando un grupo de entomólogos perteneciente a la OILB expusieron en Ovronnaz (Suiza) su experiencia de más de 30 años de investigación en este campo, y crearon las bases de una nueva agricultura basada en el control integrado y en el manejo racional de todos los componentes del agrosistema (Miret, 2004).

En España, la aplicación de control y manejo integrado ha avanzado mucho en las últimas décadas. Particularmente destacan Cataluña y Andalucía por ser pioneras en los programas de protección a partir de la creación de ATRIAS (Agrupaciones para el Tratamiento Integrado en Agricultura), que han conducido al desarrollo de diversas técnicas con el objetivo del progreso de dicho programa (Aparicio *et al.*, 2000). Es necesario enfatizar,

que la normativa por la cual se rige este sistema es el Real Decreto 1201/2002, siendo su ámbito de aplicación los productos vegetales y sus transformados.

Según se desprende de las cifras aportadas por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, la superficie de Producción Integrada en España se ha multiplicado cada año alcanzando 832.991 ha en 2014. Particularizando para la comunidad autónoma de Andalucía, que cuenta con el 63,4% del total de su superficie cultivada dentro de este tipo de control, traduciéndose en el territorio que ostenta la mayor extensión bajo estas condiciones (Teruel, 2011).

Dicho plan se ha desarrollado gradualmente en Almería desde su comienzo entre los años 1980-1985, lustro donde surgió la necesidad de buscar unos métodos de control alternativos a los existentes (Aliaga *et al.*, 2012). Aunque, fue a partir de la campaña 2007/2008 cuando la superficie bajo este tipo de control aumentó notoriamente, conociéndose como la revolución verde almeriense (Beltrán *et al.*, 2012).

2.3 Cultivo del tomate.

2.3.1 Importancia del cultivo del tomate.

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una de las hortalizas más demandadas por los consumidores a nivel mundial, desencadenando en ser una de las verduras con mayor superficie cultivada y producción, con lo que se logró una producción global de 170.886.876 t para el año 2014, donde España ocupó el octavo lugar con una cantidad de 4.888.880 t (Tabla 1) obtenidas a partir de una superficie de 54.750 ha (FAOSTAT, 2016).

Posición	País	Producción (t)
1º	China	52.722.967
2º	India	18.735.910
3º	EEUU	14.516.060
4º	Turquía	11.850.000
5º	Egipto	8.288.043
6º	Irán	5.973.275
7º	Italia	5.624.245
7º	Italia	5.624.245
8º	España	4.888.880
9º	Brasil	4.302.777
10º	México	3.536.305

Tabla 1: Listado de los diez principales productores de tomate (FAOSTAT, 2016).

Según el MAPAMA (2016) en España hay un total de 19.894 ha dedicadas al cultivo del tomate bajo invernadero, de las cuales más de la mitad se encuentran en la provincia de Almería (concretamente 10.836 ha), representando un 20 % de la superficie total bajo plástico cultivada, siendo la hortaliza más exportada en este sistema, con una cuantificación de 534.577 t para la campaña 2015/2016 (Cajamar, 2016), llegando a obtener un valor económico de 540 millones de euros a lo largo del año 2016 (Cabrera *et al.*, 2017).

2.3.2 La problemática en el manejo de las diversas plagas y enfermedades en el cultivo del tomate.

La industrialización de la agricultura, ha conllevado diversos problemas de índole ambiental debido al abuso en el uso de productos fitosanitarios tales como: contaminación de la atmosfera, el agua y el suelo e incluso introduciéndose en las cadenas tróficas alcanzando a los seres humanos y provocando condiciones adversas (Suárez, 1991).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública, alerta acerca sobre el riesgo que suponen los pesticidas para la salud humana. Estas investigaciones han sido trasladadas a la sociedad con el resultado de una concienciación en el consumo de productos más respetuosos con el medio ambiente, e inocuos para el hombre. Reflejo de este comportamiento el aumento en la superficie de cultivo de frutas y hortalizas ecológicas (Bertolote *et al.*, 2004).

Por otro lado y continuando con la problemática que ocasionan los productos fitosanitarios cabe destacar la aparición de resistencias debido al uso continuado de sustancias químicas que provocan la necesidad de ir incrementando las dosis. Este hecho provoca que la agricultura se encuentre ante una de las situaciones más difíciles de afrontar (Jiménez, 2008; Brechelt, 2004).

Desde el Parlamento Europeo se han desarrollado diferentes normativas con las que se puedan hacer frente a este tipo de problemas, siendo más restrictiva aún a partir del 2009, cuando se prohibieron el 80% de las materias activas que había en ese momento en el mercado (Benllonch, 2009).

Debido a toda la problemática presentada anteriormente, los agentes de control biológico se postulan como una alternativa viable, tanto económica, como ambientalmente para el control de enfermedades y plagas en los diversos cultivos estudiados (Enya, 2015), por

lo que gracias al manejo integrado de plagas las pérdidas de producción por enfermedades y plagas son mínimas.

El crecimiento y la productividad de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Se enfrentan con diferentes desafíos debido a la aparición de plagas y enfermedades. Entre las principales enfermedades a las que se enfrenta el tomate las que provocan mayores daños son las causadas por virus, hongos, insectos, nematodos y bacterias (Martínez *et al.*, 2016).

2.3.2.1 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici es uno de los hongos que más daño producen al cultivo de tomate a nivel mundial (Brayford 1996; Jarvis 1988), siendo altamente destructivo, produce la fusariosis o marchitez vascular en las plantas tanto en invernadero como en campo (Girhepuje y Shinde, 2011; Bawa, 2016).

Este hongo produce clamidosporas, microconidios y macroconidios. La diseminación aérea se vinculado con los macroconidios, lo que alude a una fase policíclica, excepcional en patógenos habitantes del suelo (Katan *et al.*, 1997). Las clamidosporas permiten al hongo sobrevivir durante largos periodos de tiempo, produciéndose a partir de la modificación de hifas o células conidiales. Según Smith, 2007 la formación de clamidosporas está relacionada con factores de estrés como el agotamiento de nutrientes o ambientes adversos. El micelio sobrevive en residuos vegetales, como saprófito y en hospedantes alternos. Se ha demostrado que las clamidosporas resisten temperaturas altas y sobreviven más tiempo en el suelo que los conidios, causando síntomas más severos que los microconidios (Mc Govern, 2015).

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección, penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.*, 1994). Concretamente *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* produce una enfermedad diferente, conocida como «podredumbre del cuello y las raíces del tomate», que fue descrita por primera vez por Jarvis y Shoemaker en 1978 y por Tello y Lacasa en España en 1988.

El patógeno mediante esporas o micelio penetra directamente por el ápice de las raíces o ingresa en éstas, a través de heridas o de los puntos de formación de las raíces laterales. El micelio avanza por medio del córtex alcanzando los vasos del xilema,

introduciéndose por los extremos y extendiéndose a través de la planta (Agrios, 2005). Una vez en los vasos el micelio avanza y se ramifica produciendo microconidios. La combinación de estos procesos, llamado taponamiento de los vasos por micelio, esporas, gel, gomas y tálides y el aplastamiento de los vasos por proliferación de células adyacentes de parénquima, es la responsable de la marchitez general (Yadeta y Thomma, 2013).

Los primeros síntomas que se aprecian con el amarilleamiento de las hojas basales seguido de podredumbres en las raíces y un chancro oscuro en la base del tallo. Si se realiza un corte longitudinal del tallo se puede percibir necrosis vascular y parte de la medula oscura desde la parte basal hasta unos 50 centímetros como máximo, tanto a lo ancho como a lo largo (Aparicio *et al.*, 1995).

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici es un hongo de temperatura cálida, su desarrollo óptimo se encuentra a 20°C con un rango de 12 a 28°C. Estas temperaturas seguidas de alta humedad relativa y días cortos de alta intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Existen otros factores que pueden influir como suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobre en nitrógeno y alto suministro de potasio. Las heridas originadas a las raíces aumentan la sensibilidad al marchitamiento y favorece el desarrollo del hongo (Anaya y Romero, 1990).

El control de la enfermedad del marchitamiento del tomate es un desafío debido a la capacidad de este hongo para permanecer latente en el suelo como saprofito o en restos vegetales, donde se mantiene viable has 10 años (Zeller *et al.*, 2003; Kant *et al.*, 2011).

Manejar esta enfermedad mediante el uso de fungicidas puede causar varias complicaciones, como la toxicidad en organismos no objetivo (Ramaiah y Garampalli, 2015).

2.3.2.2 *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*).

El género *Phytophthora*, creado en el año 1876, engloba a más de 90 especies, un gran número de ellas patógenas, causando grandes pérdidas en la producción mundial y por ende con una repercusión en pérdidas económicas. Estas especies son responsables de distintas enfermedades devastadoras (Agrios, 2005). Entre los cultivos hortícolas afectados se encuentran tomate, pimiento, ají, poroto y cucurbitáceas (Paz, 2017).

Phytophthora nicotianae var. parasitica (*Phytophthora parasitica*) (Erwin y Ribeiro 1996), también denominado *P. nicotianae* (Breda de Haan, 1896), responsable de la podredumbre de las raíces del cuello del tomate y del pimiento es un problema poco

estudiado en el caso del pimiento en invernadero pero lo es mucho menos en el caso del tomate en España (Pérez, 2011).

Phytophthora parasitica presenta hifas hialinas y asépticas, a veces con hinchamiento hifal, caracterizándose por formar colonias densas y sin patrón de crecimiento. Presentan un buen crecimiento a 35°C, y una parada de este a los 40°C. Este hongo produce esporangios asexuales, zoosporas y clamidosporas (Ko, 1981). Los esporangios se producen tanto en luz como en oscuridad, con formas muy variadas y una prominente papila. Suelen aparecer solitarios y ramificados de una forma irregular, presentando dificultad para ser liberados de la hifa (García, 2013). Waterhouse en 1974 (citado por Erwin y Ribeiro, 1996) indicó que los esporangios de la variedad parasitica eran caducos con cortos esporangióforos. Las clamidosporas son terminales o intercalares y con un diámetro medio de 28 micras. Se caracterizan por presentar una forma esférica, pared gruesa con un contenido homogéneo y un septo que delimita la hifa somática. Usualmente se encuentra de forma abundante.

En el caso del cultivo de tomate afecta principalmente a los que se encuentran plantados en suelos compactados o con mal drenaje en el período post-trasplante, ya que este patógeno se puede encontrar en el suelo o en el agua de riego infectando las raíces y el cuello de la planta o frutos en contacto con el suelo (Paz, 2017).

Los síntomas más comunes de esta especie son podredumbres de cuello y raíces, sin embargo, también infecta flores, frutos y hojas. Su infección comienza con la podredumbre de las raíces, retraso del crecimiento y decoloración de las hojas. En plantas jóvenes se extiende hasta el cuello, produciendo la podredumbre del cuello del tomate. En plantas adultas se producen lesiones acuosas a nivel de cuello y de raíces, que gradualmente se secan y se tornan marrón oscuro. El xilema de la raíz se vuelve marrón y la decoloración se extiende hasta la parte baja de los tallos. Infecciones severas estrangulan los tallos causando marchitez generalizada y muerte de la planta. Los frutos que se quedan en contacto con el suelo húmedo y que contraen la enfermedad presentan los síntomas más característicos de la enfermedad como son las manchas pardas en forma de anillos concéntricos que pueden llegar a cubrir más de la mitad de fruto. Cuando nos encontramos en condiciones de alta humedad sobre estas manchas aparece moho blanco y algodonoso que pertenece al micelio del patógeno (Meng *et al.*, 2014).

Las temperaturas mínimas necesarias para su crecimiento varían entre 5 y 7 °C, presentando un óptimo de temperatura entre 27 y 32 °C y un máximo a los 37 °C. Cuando la

humedad relativa es alta este hongo se ve favorecido (Bernal, 2010). Las descripciones de Erwin y Ribeiro (1996), insisten en la relación estrecha existente entre el exceso de agua en el suelo y la gravedad de la micosis, hecho que demostraron algunos autores al comprobar cómo el ajuste del agua de riego, reduce la gravedad de la enfermedad.

Existen estudios que indican que los medios basados exclusivamente en la lucha química son insuficientes para contrarlar dicha enfermedad (Tuset, 1973; García *et al.*, 1981 y Palazón *et al.*, 1981; citado por Bartual y Campos, 1984).

2.4 Extractos y aceites esenciales.

2.4.1 Extractos vegetales.

Los extractos vegetales son una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Pardo, 2002).

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios producidos en la planta como resultado de su evolución y adaptación al medio, las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas (Wilson *et al.*, 1999). Estas sustancias son agrupadas en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides (Harborne, 1993), proporcionándole importantes características a los extractos, como son antiapetitivos, antivirales, antimicrobianos o repelentes (Dominí *et al.*, 1995). Por lo que forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, fortaleciéndolas en condiciones de estrés (Villalobos, 1996).

Los extractos vegetales tienen una serie de cualidades fundamentales como son baja o ninguna toxicidad, presentan una eficacia probada, biodegradabilidad y mínima persistencia. La ausencia de residuos de sustancias prohibidas o restringidas es una gran ventaja que ofrecen este tipo de insumos. Además proporcionan seguridad e inocuidad, garantizando su pureza y ausencia de microorganismos. Estos productos presentan una gran estabilidad y vida útil, conservando sus propiedades físico-químicas y eficacia durante largos periodos. Lo que les hace manifestar un mínimo impacto sobre la salud humana y el medio ambiente (Bravo *et al.*, 2000; Funes, 1997; Philogenet *et al.*, 2004).

Los principios activos que contienen estas sustancias son los componentes químicos de la planta a que le dan las propiedades sanitarias. Los principales principios activos de las

plantas que han mostrado un efecto microbiano son los alcaloides, taninos, resinas, mucílagos, aceites esenciales, heterósidos, vitaminas, sales minerales y oligoelementos (Cowan, 1999).

El proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al.*, 2002) o polvos (Bautista *et al.*, 2003), o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

2.4.2 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son un conjunto de sustancias químicas que han sido biosintetizadas por las plantas, resultado de su metabolismo secundario. Les proporcionan un aroma característico a flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal.

Las características físicas que sobresalen de estas sustancias es que son altamente volátiles, livianas y no grasas, es decir, se evaporan rápidamente, no se enrancian y son poco densos. Son insolubles en agua aunque le transfiere su perfume, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Son líquidos a temperatura ambiente, translucidos o ligeramente amarillos y poseen una densidad normalmente inferior a la del agua. Los aceites esenciales se oxidan por exposición al aire y refractan la luz polarizada, también presentan un poder rotatorio característico, debido a que en su composición existen numerosos productos ópticamente activos. Estas dos propiedades son de gran importancia en la detección de adulteraciones en las esencias (Stevens, 2002; Bandoni, 2000).

Los aceites esenciales se caracterizan por tener 2 ó 3 tipos de compuestos mayoritarios los cuales determinan las propiedades biológicas del aceite. Entre ellos se encuentran los terpenos, principalmente monoterpenos que pueden ser oxigenados (ej. 1,8-cineol, linalol, alcanfor, carvacrol), hidrocarbonados (ej. α - pineno, β -pineno, limoneno, p-cimeno) o ésteres monoterpénicos (ej. acetato de linalilo) y sesquiterpenos (Guillen *et al.*, 1996; Pierozan *et al.*, 2009). Los demás grupos están compuestos por sustancias aromáticas y alifáticas, con grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas (Bakkali *et al.*, 2008).

Estos compuestos tienen importantes funciones vitales, ya que forman parte en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, también representan una defensa contra herbívoros, insectos, hongos y patógenos (Blázquez, 2014), actúan como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Theis y Lerda, 2003; Müller y Buchbauer, 2011).

Las plantas aromáticas son la principal fuente de aceites esenciales, éstas pertenecen generalmente a las familias *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cupressaceae*, *Gentianaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae* y *Zingiberaceae* (Lahlou, 2004).

Los aceites esenciales se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las plantas: hojas, flores, tallos, raíces, corteza, frutos y semillas (Parry, 1992; Bandoni, 2000; Jirovetz y Buchbauer, 2005). El aceite del jazmín y las rosas por ejemplo procede de una flor, en los cítricos como la naranja los aceites están contenidos en el pericarpio de los frutos (De León, 2008). La mayoría de plantas contienen de 0,01 a 10% de contenido de aceite esencial. La cantidad media que se encuentra en la mayoría de las plantas aromáticas es alrededor de 1 a 2% (SENA).

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios cualitativos como, origen, consistencia, y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Bandoni, 2000).

Según su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas, su rendimiento es muy bajo por lo que son muy costosas de extraer. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol (SENA).

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias, bálsamos y resinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos tienen un alto contenido de ácido benzoico, cinámico y ésteres, con una alta consistencia y poco volátiles. Las resinas destacan por su capacidad para formar combinaciones o mezclas como las oleorresinas (Stashenko y Combariza, 1998).

Los aceites esenciales sintéticos son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (Bandoni, 2000).

Son muchos los factores que influyen en la composición de un aceite. Entre ellos lo más importante sería el origen, la especie y el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, tierras de cultivo etc.), así como la destilación y la forma de almacenamiento del aceite. Se ha descrito incluso un cierto efecto de la madurez de la planta en el momento de producir el aceite.

2.4.3 Geranio (*Pelargonium graveolens*).

La familia *Geraniaceae* se caracteriza por contener plantas herbáceas anuales o perennes, arbustos, con pubescencia de pelos glandulares que contienen aceites esenciales. Hojas simples o compuestas, enteras o aserradas, opuestas o alternas (Zomlefer, 2004). Sus flores son solitarias, hermafroditas, con simetría radial (Villarreal, 1991).

El geranio es nativo de Sudáfrica, y cultivado en Madagascar, Marruecos, Francia y España (Muñoz, 1994). Es una de las plantas ornamentales con más relevancia y popularidad en los cultivos que se producen en el mundo. Son utilizados para ornamentar jardineras, balcones y terrazas, existiendo gran número de géneros, los cuales se han extendido por todas partes y son valoradas por su floración y agradable olor (Albouy y Devergne, 2000).

Las hojas del geranio son de color verde oscuro, con un envés más claro. Son alternas, pecioladas y lobuladas. Sus flores, muy pequeñas, se encuentran conglomeradas en falsas umbelas, con colores que varían entre rosados, blancos o violáceos. Los frutos se presentan como una envoltura donde encontramos semillas muy pequeñas (Muñoz, 1994).

El aceite de geranio se obtiene de las distintas especies de geranio que existen, como por ejemplo del *Pelargonium graveolens*, *Pelargonium odoratissimum*, *Pelargonium capitatum* y *pelargonium fragrans*. Este aceite es ocupado en el norte de África y sur de Europa. El color del aceite de geranio va de diversos rangos, dorado, amarillo-dorado, amarillo, café y verde esmeralda. Se cree que la coloración del aceite dependerá del origen de la planta. Las plantas originadas de California son verde esmeralda mientras que aquellas producidas en China darán aceites de color dorado, amarillo o café (Rose, 2000).

Dentro de su composición química, presenta flavonoides tales como quercetina, kaempferol y miricetina. El aceite esencial de sus hojas es rico en citronelol (26,7%), geraniol (13,4 %), mirceno (12%), nerol (8,7%), formiato de citronelilo (7,1%), isomentona (6,3%), linalool (5,2%), además de alfa-pineno, limoneno, mentona, acetato de geranilo, y geranilo butirato (22%). El geraniol, es el componente primordial del aceite de geranio (Schery, 2000).

2.4.4 El uso de extractos y aceites esenciales en la agricultura.

Los extractos de origen vegetal han sido utilizados desde la antigüedad por los hindúes, chinos, griegos y romanos con fines rodenticidas, insecticidas y conservación de víveres almacenados (Kagale *et al.*, 2004).

Desde la edad media, los aceites esenciales han sido ampliamente utilizados como bactericidas, fungicidas, antiparasitidas e insecticidas; también han sido empleados en medicina, en la industria farmacéutica, cosmética, sanitaria, agrícola, y de alimentos (Medina, 2011).

Su uso fue restringiéndose puesto que a partir de los años 50 del siglo pasado, la mayor eficacia, acción prolongada, persistencia y facilidad de empleo de los fitosanitarios de síntesis propició la generalización todavía vigente (Tello y Camacho, 2010).

Ante la incesante búsqueda de alternativas más confiables y benéficas para el control de plagas y enfermedades en cultivos, se ha abierto un amplio panorama de investigación en torno al uso de extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios presentes en plantas, que constituyen hoy en día una alternativa promisoría para contrarrestar el efecto negativo de algunos microorganismos fitopatógenos, por su bajo costo, por ser amables con el medio ambiente y la salud en general (Villa *et al.*, 2015). Debido a la mezcla de componentes presentes en los aceites esenciales, son considerados de bajo riesgo en el desarrollo de resistencia en patógenos, ya que cada uno de los componentes tiene su propia contribución a la actividad biológica (Daferera *et al.*, 2003), y es difícil correlacionar la acción de un único compuesto o clases de compuestos, debido que los efectos antimicrobianos, antimicóticos y el potencial fungitóxico son el resultado del actuar sinérgico de los constituyentes (Isman, 2000).

Los extractos vegetales y aceites esenciales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas (Montes, 2009). La actividad antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales en orden decreciente es el siguiente: fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres e hidrocarburos (García *et al.*, 2010).

Aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en este la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen (Schelz *et al.*, 2006), y estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen danos sobre estructuras como conidias,

macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas (Park *et al.*, 2009).

La capacidad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales de muchas especies de plantas han sido probadas por diferentes autores:

Necha y Barrera, (2008) estudiaron el efecto de diversos aceites sobre el *control in vitro* de *Fusarium sp.*. De entre los aceites que se hallaron el aceite de canela (*C. zeylanium*), clavo (*S. Aromaticum*) y tomillo (*T. vulgaris*) fueron los que obtuvieron un mejor resultado inhibiendo el crecimiento del hongo.

Ospina *et al.*, (2016) midieron *in vitro* la actividad antimicrobiana del geranio (*Pelargonium odoratissimum*) pertenece a la familia *Geraniaceae*. Entre los microorganismos estudiados se encontraban *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Aspergillus brasiliensis*. Los resultados que se obtuvieron desvelaron que este aceite presento una gran capacidad inhibitoria frente a los microorganismos estudiados.

Scalvenci *et al.*, (2016) evaluaron el efecto de aceites esenciales extraídos de plantas amazónicas para el control *in vitro* de hongos como *Fusarium solani* y *Phytophthora sp.*. El resultado obtenido fue un comportamiento similar al del aceite esencial de tomillo con un 94% de inhibición para el caso de *Phytophthora*.

Dan *et al.*, (2010) dedicaron su estudio al aceite esencial de ásaro europeo (*Asarum heterotropoides var. Mandshuricum*) y su actividad antimicrobiana frente a cinco hongos fitopatógenos, *Alternaria Humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* y *Fusarium solani*. En este estudio se concluye con que este aceite tiene una gran capacidad antifúngica sobre dichos hongos.

Rodríguez *et al.*, (2000) trabajaron con extractos de aroma amarilla (*Acacia farnesiana*), escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*) y salvia cimarrona (*Pluchea carlinensis*), frente a cuatro hongos. Se encontró que los tres extractos tienen elevada actividad antifúngica sobre el hongo *Pyricularia grisea* y *Phytophthora parasitica var. nicotianae* y la actividad para el resto de los hongos depende del tipo de extracto y el tiempo de evaluación.

Faria *et al.*, (2006) investigaron sobre la actividad antifúngica tanto del extracto como del aceite esencia de albahaca (*Ocimum gratissimum*). Los resultados revelaron que el aceite esencial inhibió el crecimiento de todos los hongos probados, incluyendo los fitopatógenos, *Botryosphaeria rhodina*, *Rhizoctonia sp.* Y dos cepas de *Alternaria sp.*, siendo el eugenol el

compuesto responsable de la actividad antifúngica, mientras que el extracto no tuvo buenos resultados.

Alzate *et al.*, (2009) trabajaron en la actividad antifúngica de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) y cascara de naranja, (*Citrus sinensis*) a diferentes concentraciones frente a *Trichoderma harzianum*, *Absidia sp.* y *Fusarium oxysporum*. El aceite esencial de *Eucalyptus tereticornis* mostro tener un buen espectro de actividad fungicida a concentraciones moderadas. Sin embargo es necesario realizar ensayos sobre otras cepas de interés.

En el trabajo fin de grado realizado por Carmena en 2015 trabajaron en la evaluación *in vitro* de la capacidad antifúngica de las esencias de tomillo (*Thymus zygis*) y lavanda (*Lavandula angustifolia*) sobre hongos como *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici*. Los resultados que obtuvieron fueron muy satisfactorios para el caso del tomillo, inhibiendo el crecimiento micelial casi en su totalidad. El aceite de lavanda no presento resultados de inhibición significativos.

Mohammadi *et al.*, (2016) en su estudio informa de la eficacia de la combinación de *Zataria multiflora* y aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) para inhibir *Phytophthora drechsleri in vitro*. El aceite esencia de la canela resulto ser el mejor inhibidor.

Taborda, (2015) valoró el efecto inhibitorio de extractos y aceites esenciales tanto *in vitro* como *in vivo* de orégano (*Lippia origanoides*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa. Las dos especies resultaron ser promisoras y eficientes en el control de ambos hongos, aunque destacando que el orégano presentó unos porcentajes más altos.

Seseni *et al.*, (2015) estudiaron 10 aceites esenciales de los que seleccionaron 5 en función de su precio y disponibilidad en Sudáfrica, naranja dulce (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*), mandarina (*Citrus reticulata*), toronja (*Citrus paradise*) y alcanfor (*Cinnamomum camphora*) de los cuales hicieron un estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de estos frente a cuatro cepas de *Fusarium* (*F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. circinatu*, *F. circinatum*). Solamente el clavo y el tomillo que se encontraban entre los diez estudiados lograron controlar el crecimiento micelial.

Vitoratos *et al.*, (2013) trabajaron sobre la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de orégano (*Origanum vulgare L. ssp. hirtum*), tomillo (*Thymus vulgaris L.*) y limón (*Citrus limón L.*), contra algunos patógenos postcosecha importantes (*Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*

y *P. digitatum*). Los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* indicaron que los aceites esenciales de limón, tomillo y orégano inhibieron el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de los patógenos postcosecha. En ambos experimentos, se observó un efecto de dosis, con un aumento antifúngico a medida que aumentaba la concentración de aceites esenciales.

Sharma *et al.*, (2017) analizaron la actividad antifúngica de cuatro aceites esenciales, clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) fueron evaluados contra la marchitez causante de hongos, *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*. Esta investigación reveló que todos los aceites esenciales evaluados tuvieron una actividad antifúngica de moderada a alta en el siguiente orden de efectividad, clavo, menta, limoncillo y eucalipto.

Zacaroni *et al.*, (2009) trabajaron con aceite esencial de pimienta (*Piper hispidinervum*) *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* obteniendo que el resultado para el control de *Fusarium* necesitaba unas concentraciones de aceite más altas que para el control de otros hongos fitopatógenos.

Suleiman y Emua, (2009) analizaron tanto *in vitro* como *in vivo* extractos y aceites esenciales procedentes del jengibre (*Zingiber officinale*), aloe (*Aloe vera* (L.) Burm.f.), cola amarga (*Garcinia Kola*) y neem (*Azadirachta indica*) sobre *Pythium aphanidermatum*. Concluyendo con que todas las sustancias utilizadas mostraron una inhibición del crecimiento siendo el neem el menos eficiente.

Vaillant *et al.*, (2015) se proponen evaluar el efecto fungicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* L., sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium solani*, *Stemphiliium solani*, *Corynespora cassicola* y *Oidium lycopersicum*. Comprobaron que *Phytophthora nicotianae* fue el hongo más sensible ante este aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Situación y emplazamiento.

El ensayo se realizó en la campaña 2017/2018, en las instalaciones pertenecientes a la universidad de Almería (Cañada de San Urbano). El ensayo de campo tuvo lugar en el polígono 58, parcela 9.000, recinto 2 y superficie 1.845 m². El trabajo *in vitro* se realizó en el laboratorio 2.03 de la Escuela Superior de Ingeniería.

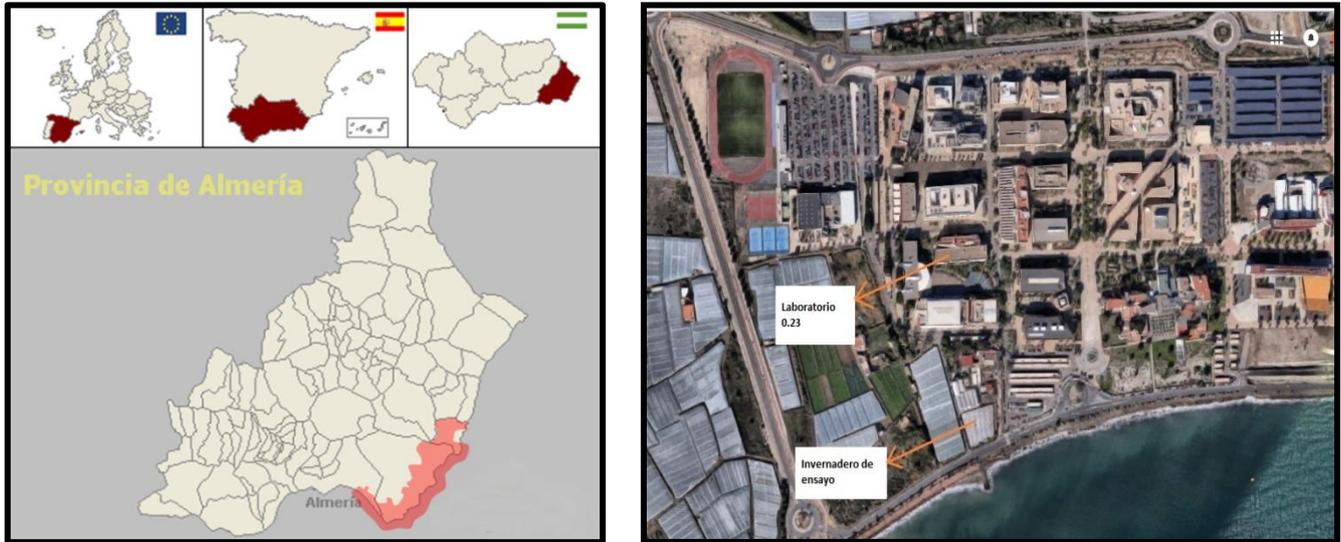


Imagen 1: Localización del ensayo.

3.2 Ensayo *in vivo*

3.2.1 Diseño experimental en campo

El diseño experimental estuvo conformado por 70 plantas trasplantadas en maceteros de 1L que se distribuyeron de forma aleatoria y en los que se inocularon diferentes hongos. Con el objetivo de controlar las enfermedades se le aplicaron los preparados realizados con extractos vegetales y aceite esencial. Este ensayo se realizó en un invernadero de características representativas del entono, perteneciente a la universidad de Almería.

Los distintos preparados de extracto vegetal y aceite esencial procedían de plantas de geranio (*Pelargonium graveolens*), estos fueron utilizados frente a *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* con distintos procesos de extracción, el proceso de extracción se detallará posteriormente.

Los tratamientos realizados son los descritos a continuación:

- T0: Testigo sin inoculación de hongo y sin aplicación de extractos o aceites.
- T1: Testigo inoculado con hongo *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T2: Testigo inoculado con *Phytophthora parasitica*.

- T3: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + Mancozeb (0,30%).
- T4: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + Mancozeb (0,30%).
- T5: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio caliente.
- T6: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio caliente.
- T7: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio frío
- T8: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio frío.
- T9: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + aceite esencial de geranio.
- T10: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + aceite esencial de geranio.

Los tratamientos de T0, T1, T2, T3, y T4 contaron con ocho repeticiones, mientras que el resto de tratamientos estaban formados por 10 repeticiones. El tratamiento T0 (testigo) nos permitió comprobar el desarrollo en condiciones normales de las plántulas de tomate, el T1 y T2 nos mostraron el desarrollo de la enfermedad en plantas sanas, el T3 y T4 determinaron la eficacia de un fungicida (Mancozeb) con respecto a los preparados vegetales. El resto de los tratamientos nos ayudaron a precisar la capacidad antifúngica del extracto y aceite de geranio frente a ambos hongos.



Imagen 2: Detalle de la distribución de los tratamientos en el invernadero

3.2.2 Preparación de extractos.

Para la obtención del extracto se comenzó con la recolección de hojas de geranio que se depositaron sobre papel de filtro (Whatman Nº1) e introdujeron en la estufa a 25°C durante 3 días (Imagen 3 A y B). Transcurrido este tiempo se pasó a su trituración con un molinillo eléctrico hasta alcanzar un tamaño de partícula lo más fino posible (Imagen 3C). Para preparar la solución que contaría con una concentración de 1:10 (g/mL) se pesaron 20g para la obtención de 200 mL de solución. Una vez obtenidos la cantidad necesaria para preparar dos soluciones fueron vertidos en un matraz Erlenmeyer, llenando uno de ellos con agua fría (temperatura ambiente) y el otro con agua calentada hasta alcanzar una temperatura por debajo del punto de ebullición, este procedimiento es conocido como método de extracción por infusión (Imagen 3D).

Cuando la solución alcanza a temperatura deseada retiramos de la placa calefactora y junto con el matraz que contiene la solución fría introducimos en un agitador a 25°C con una velocidad de 140 rpm durante 24 horas (Imagen 3E y 3F).

Una vez que las dos soluciones han pasado 24 horas de agitación son retiradas para la filtración de las mismas. Esta filtración se hace utilizando tubos de plástico de 50 mL embudos de vidrio y papel de filtro, la filtración continua hasta que se completan los 50 mL de solución filtrada (Imagen 3 G y H).

Los 50 mL obtenidos de cada preparación son vertidos en botellas de vidrio de 1L y completados hasta conseguir una solución de 1L (Imagen 3I).

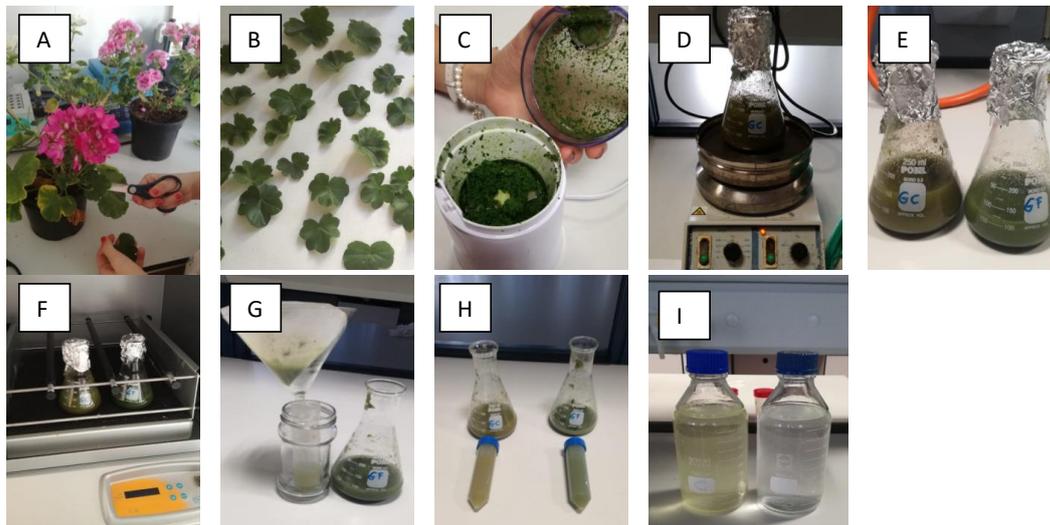


Imagen 3: Descripción del proceso de obtención de los extractos.

3.2.3 Preparación del aceite.

El aceite de geranio empleado fue un preparado comercial de la marca Biover, el cual fue obtenido por el método tradicional (destilación de vapor). La destilación por arrastre de vapor consiste en llevar a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros no volátiles. Esto se logra por la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla (Peredo, 2009).

El aceite fue vertido en una botella de cristal, disolviéndolo en agua a la concentración de 0,25%, y aplicado a continuación en campo.

3.2.4 Aplicación en campo.

Los extractos y aceite anteriormente preparados fueron aplicados en campo en las fechas descritas a continuación, Tabla 2. La aplicación se realizó por riego al sustrato, vertiendo en todos los casos una dosis por maceta de 100 mL.

La primera aplicación se realizó con carácter preventivo, antes de la inoculación del hongo, el resto de las aplicaciones se realizaron con carácter reactivo para controlar o inhibir el desarrollo de la enfermedad.

Tabla 2: Fechas relevantes en la aplicación de extractos y aceites.

Fecha	DDT	Aplicación	Comentario
20/10/2017	4	Extractos + aceite	Pre-inoculación
3/11/2017	18	Extractos + aceite	Post-inoculación

22/11/2017	37	Extractos + aceite	Post-inoculación
------------	----	--------------------	------------------

3.2.5 Preparación del inoculo.

Para la preparación del inoculo primeramente los hongos fueron repicados a partir de placas madre que los contenían. Estos hongos se obtuvieron de la micoteca del grupo GR-200. Transcurridas dos semanas los hongos habían crecido hasta ocupar la totalidad de la placa por lo que estaban listos para ser usados. Posteriormente se realizó un triturado de la totalidad de las placas de cada hongo obteniendo una suspensión de macroconidios de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* comprendida entre 10^4 y 10^5 UFC y de *Phytophthora nicotianae var. parasitica* de 10^4 y 10^5 UFC. Estos fueron llevados a una solución de 1L para su posterior aplicación en campo.

3.2.6 Aplicación del fungicida.

El fungicida utilizado en este estudio fue el Vondozeb GD[®], este es un fungicida a base de mancozeb (75%), materia activa multi-diana y altamente eficaz contra numerosas enfermedades, incluso controla hongos resistentes a otras materias activas.

Este producto fue aplicado el 6/11/2017 mediante el sistema de riego con una dosis del 0,30%, recomendada en el registro de productos fitosanitarios del ministerio de agricultura.

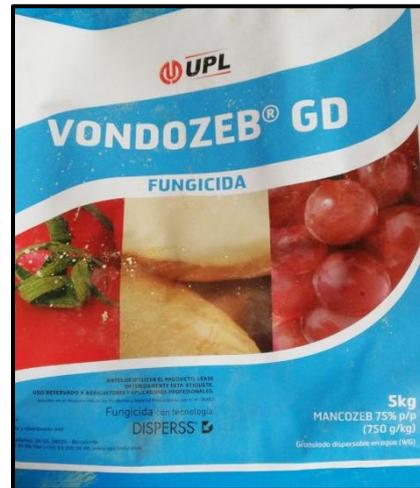


Imagen 4: Fungicida empleado.

3.2.7 Evaluación del ensayo.

Durante el desarrollo del cultivo se evaluó la presencia de enfermedad en las plantas de tomate periódicamente. La Tabla 3 detalla todas las fechas de muestreo que se realizaron.

Se utilizó una escala de daños comprendida entre 0-4, siendo 0 una planta sana, 1 una planta decaída sin síntomas de pudrición, 2 comienzo de la pudrición y 4 planta caída.

Tabla 3: Fechas de muestreo.

Fecha	DDT
14/11/2017	25
18/11/2017	29
24/11/2017	35
29/11/2017	40
1/12/2018	42
12/12/2018	54
14/12/2018	56

3.3 Ensayo *in vitro*.

3.3.1 Diseño experimental en laboratorio.

El ensayo se realizó en el laboratorio 2.03 de patología vegetal de la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Almería. Este estudio estuvo formado por 22 tratamientos compuestos de 5 placas cada tratamiento (repeticiones). El objetivo fue determinar la capacidad antifúngica en condiciones controladas de extractos y aceite esencial de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre diversos hongos como *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica*. Para complementar los estudios de campo descritos anteriormente.

El diseño experimental estuvo conformado por los siguientes tratamientos:

- T0: testigo sin inoculación de hongo y sin extracto
- T1: extracto frio (25)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T2: extracto frio (50)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T3: extracto frio (75)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T4: extracto frio (100)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T5: extracto caliente (25)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T6: extracto caliente (50)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T7: extracto caliente (75)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T8: extracto caliente (100)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T9: aceite geranio (1%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T10: aceite geranio (2.5%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T11: aceite geranio (4%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.
- T12: extracto frio (25)+ *Phytophthora parasitica*.
- T13: extracto frio (50) + *Phytophthora parasitica*.
- T14: extracto frio (75)+ *Phytophthora parasitica*.
- T15: extracto frio (100)+ *Phytophthora parasitica*.
- T16: extracto caliente (25)+ *Phytophthora parasitica*.
- T17: extracto caliente (50)+ *Phytophthora parasitica*.
- T18: extracto caliente (75)+ *Phytophthora parasitica*.
- T19: extracto caliente (100)+ *Phytophthora parasitica*.
- T20: aceite geranio (1%)+ *Phytophthora parasitica*.
- T21: aceite geranio (2.5%)+ *Phytophthora parasitica*.
- T22: aceite geranio (4%)+ *Phytophthora parasitica*.



Imagen 5: Tratamiento realizados.

3.3.2 Preparación de los extractos *in vitro*.

Se partió de los extractos utilizados en el ensayo *in vivo*, para su utilización se realizó una micro filtración, con un tamaño de poro de 0,22 micras y con el objetivo de purificar el extracto lo máximo posible. A continuación se realizaron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones del ensayo 25%, 50%, 75% y 100%, con la ayuda de una micro pipeta.



Imagen 6: Micro filtración y preparación de concentraciones.

3.3.3 Preparación de los aceites *in vitro*.

El aceite de geranio empleado fue un preparado comercial de la marca Biover, el cual fue obtenido por el método tradicional (destilación de vapor). La destilación por arrastre de vapor consiste en llevar a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros no volátiles. Esto se logra por la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla (Peredo, 2009).

En este trabajo se analizaron diferentes concentraciones del aceite para determinar cuál es la mínima concentración necesaria para la inhibición del hongo. Se utilizaron concentraciones crecientes de 1%, 2,5% y 4%.

3.3.4 Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado en el ensayo fue agar malta (AM). Para la preparación de 1 L de medio se pesaron en una balanza de precisión 20 g de agar y 20 g de extracto de malta y se introdujeron en botella de vidrio, que se llenó hasta enrasar a 1 L con agua y se agitó para conseguir una mezcla homogénea. Se introdujeron las botellas y dos dosificadores en la autoclave durante 21 minutos a 120°C de temperatura para esterilizar el medio de cultivo. Una vez finalizado el proceso de esterilización en la autoclave, se sacaron las botellas y los dosificadores con un guante y se dejaron enfriar hasta que el medio estuvo a unos 40°C.

Mientras tanto se fueron marcando las placas con un rotulador para organizarlas, de tal forma que no hubiera confusiones a la hora de adicionar los aceites esenciales o los fungicidas y sembrar los discos de micelio.

3.3.5 Preparación de las placas de siembra.

Una vez que las distintas concentraciones estaban separadas en recipientes y el medio estuvo atemperado (40°C) se procedió con la ayuda de un dosificador a verter el medio de cultivo en los recipientes que contenían las diferentes concentraciones de extractos y aceites. Finalmente se agitó cada solución y se vertieron 10 mL en cada placa de petri, obteniendo así cinco repeticiones por tratamiento.

Después de esto se dejó enfriar para proceder con la siembra de micelio en cada placa.



Imagen 7: Vertido de medio de cultivo con extractos y aceite esencial.

3.3.6 Siembra de discos de micelio.

Para la siembra del disco de micelio previamente se replicaron *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* en placas madre. Pasada una semana, el desarrollo de los microorganismos era el adecuado para la inoculación en los medios de cultivo.

Una vez estuvieron listas las placas madres para la inoculación en el nuevo medio de cultivo se pasó a sembrar un disco de micelio en el centro de la placa. El disco se obtuvo de la zona de crecimiento de la placa madre. Con el sacabocados previamente introducido en alcohol y flameado en la llama se perforó el medio de cultivo con micelio de la placa de Petri; el diámetro del sacabocados y por tanto del micelio es de 0,5 cm. Una vez marcados los círculos en el medio se cogió la lanceta se flameó y una vez enfriada se cogió el fragmento de medio con micelio y se puso invertido en el centro de la placa. El hecho de que el disco fuera invertido es para que el micelio entrara en contacto directo con el medio de cultivo.

Para la realización de cada uno de estos pasos descritos se precisó del uso de un mechero Bunsen, de manera que se pudiera trabajar en condiciones asépticas y así evitar el contagio de las placas.

3.3.7 Evaluación del ensayo.

Se hicieron cinco repeticiones por aislado. Una vez selladas las placas se pusieron a incubar en la estufa a 25°C y se midió el crecimiento micelial radial cada día hasta el borde diametralmente opuesto de la placa.

Para calcular el porcentaje de inhibición se hizo uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Crecimiento radial del testigo} - \text{Crecimiento radial del patógeno}}{\text{Crecimiento radial del testigo}} \times 100$$

El análisis estadístico de los datos obtenidos, se ha realizado utilizando Microsoft Excel y Stagraphic Centurion versión 17.2.04®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Resultados.

4.1.1 Introducción.

En los siguientes apartados se exponen los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro*, donde se observan el desarrollo de la enfermedad en plantas del cultivo de tomate en campo con los distintos tratamientos aplicados y el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones y tratamientos utilizados en el laboratorio.

Como se comentó anteriormente los hongos utilizados en el ensayo son *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*), los cuales fueron tratados con preparaciones naturales de geranio (*Pelargonium graveolens*).

Las gráficas mostradas a continuación están formadas por el eje X donde se mide los días después del trasplante (DDT) y por el eje Y donde se mide el grado de enfermedad en una escala de 0-4.

4.1.2 Ensayo *in vivo*.

4.1.2.1 Efecto *in vivo* de aceite esencial de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en un cultivo de tomate.

En la Gráfica 1 se representa el desarrollo de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones de invernadero, con aplicación de aceite de geranio y con el fungicida utilizado (Mancozeb).

El tratamiento T1 se corresponde con el testigo de *Fusarium* en ausencia de algún tipo de agente de control (químico o biológico). Al encontrarse en condiciones óptimas de humedad y temperatura, el hongo crece de manera sostenida durante el desarrollo del ensayo, pudiendo infectar las plantas susceptibles de tomate, lo que sirve de base para comparar con el resto de tratamientos. El desarrollo de la enfermedad se produjo de manera previsible en el caso del testigo, alcanzando niveles de enfermedad entre 3-3,5 sobre 4 durante los últimos muestreos lo que significa que las plantas estaban prácticamente muertas.

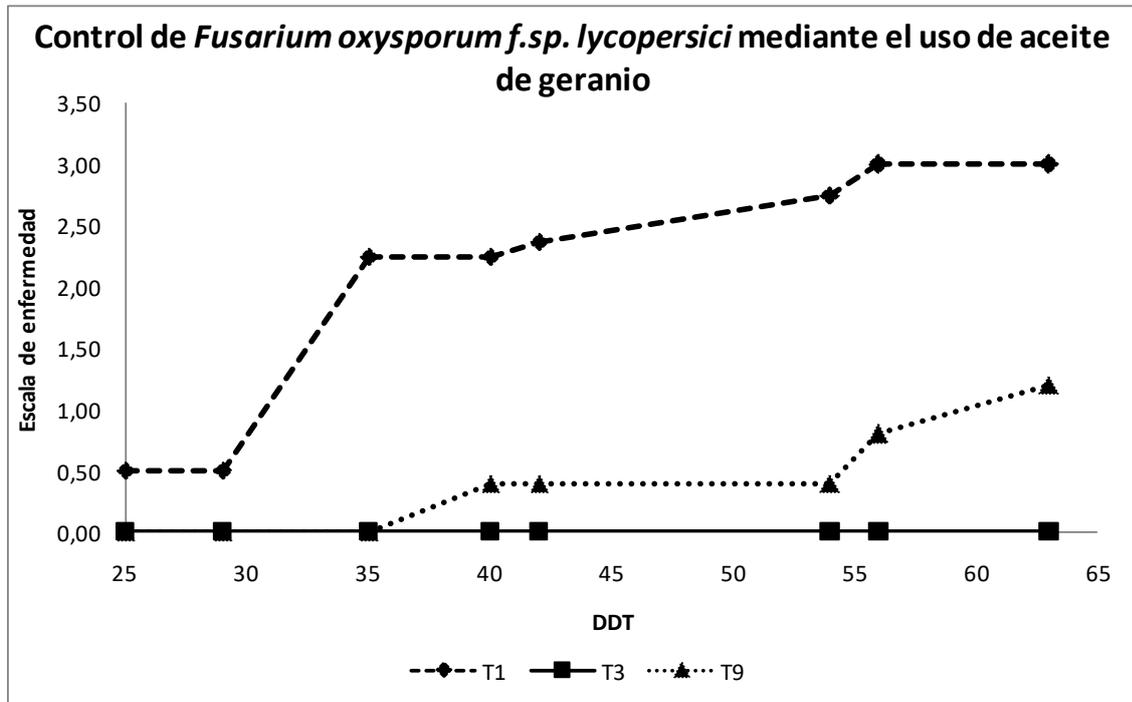
Si seguimos la línea de evolución del tratamiento T9 compuesto por la inoculación de *Fusarium* y la aplicación del aceite esencial de geranio comprobamos que hasta los 35 DDT se produce una inhibición completa del desarrollo de la enfermedad. En este momento se comienzan a apreciar los primeros signos, manteniéndose estable durante la mayor parte del estudio. Durante los últimos muestreos el crecimiento aumenta alcanzando un nivel de enfermedad 1, en este grado de enfermedad las plantas se encontraban con las hojas decaídas sin síntomas de pudrición.

El tratamiento T3 al que se le aplicó Voncozeb[®] la inhibición ha sido completa durante todo el desarrollo.

Al comparar el tratamiento aplicado a base del aceite esencial con el desarrollo normal de la enfermedad se observa como este consigue la inhibición de la enfermedad en un 75%, sin presentar grandes diferencias con el tratamiento a base de fungicida. Con estos resultados podemos afirmar que el aceite esencial puede ser una alternativa eficaz para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en las condiciones del ensayo realizadas.

En la Tabla 4 se muestra el análisis estadístico realizado a los datos obtenidos durante el ensayo. El primer muestreo realizado a los 25 DDT no existieron diferencias estadísticas entre los datos, es a partir del día 29 después del trasplante cuando empieza a parecer las primeras diferencias, que se mantienen hasta el final del ensayo. Los resultados obtenidos en la Tabla 4 corroboran lo comentado anteriormente en la Gráfica 1.

Gráfica 1: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de aceite de geranio.



T1: Testigo inoculado con hongo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*.

T3: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + Mancozeb (0,30%).

T9: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + aceite esencial de geranio.

Tabla 4: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de aceite de geranio.

DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T1	0,50±0,50	0,50±0,75 ab	2,25±1,90 a	2,25±1,90 a	2,37±1,76 a	2,75±1,75 a	3,00±1,51 a	3,00±1,51 a
T3	0,00±0,00	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 d
T9	0,00±0,00	0,00±0,00 bc	0,00±0,00 b	0,40±0,54 bc	0,40±0,54 bc	0,40±0,54 c	0,80±1,09 bc	1,20±1,09 bc
p-Valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor $\leq 0,05$.

4.1.2.2 Efecto *in vivo* de aceite esencial de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*) en un cultivo de tomate.

En la Gráfica 2 se plasman los datos obtenidos correspondientes al tratamiento de aceite esencial de geranio con *Phytophthora parasitica* y al desarrollo de la misma sin aplicación alguna, así como el uso del fungicida sobre este mismo hongo.

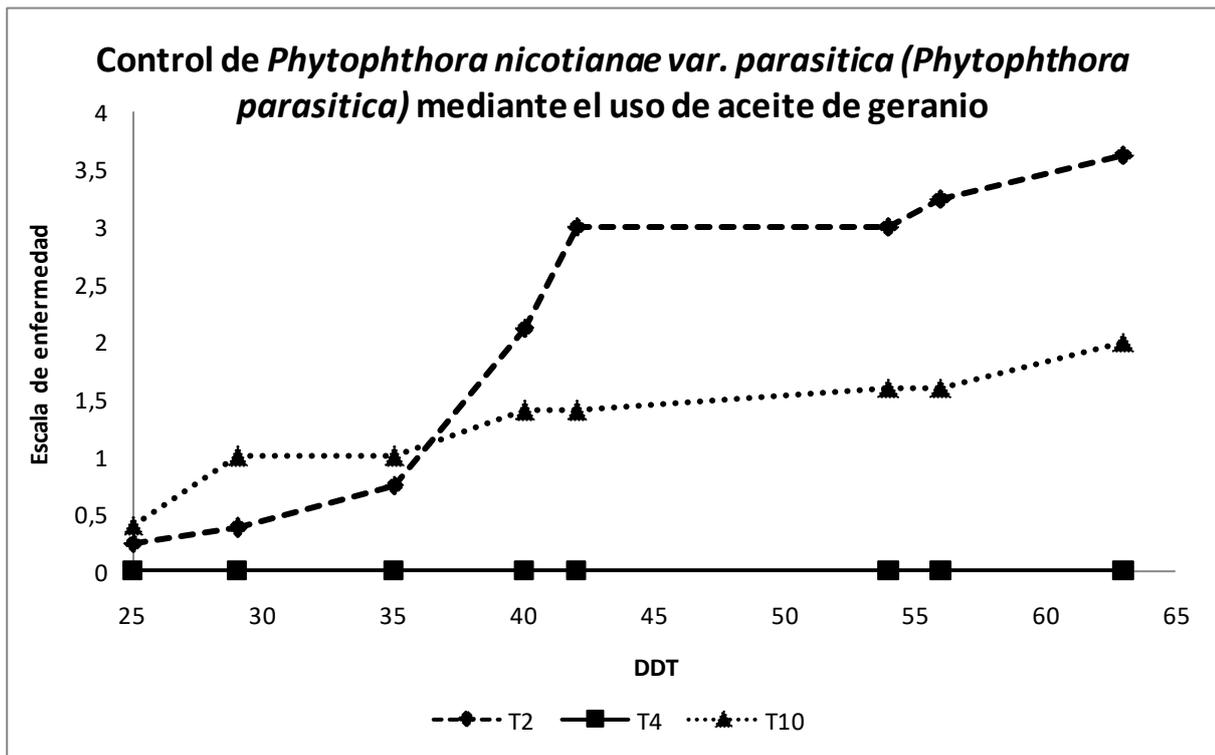
El testigo inoculado con *Phytophthora parasitica* (T2), se caracteriza por no contener aplicación de sustancias para el control del hongo. *Phytophthora parasitica* se encuentra en condiciones favorables para su desarrollo y evolución, por lo que como observamos en la Gráfica 2 crece de forma continuada, aumentando el grado de enfermedad en las plantas, alcanzando niveles entre 3,5-4 sobre 4, resultando en plantas completamente muertas. Este tratamiento será el apoyo para el estudio del desarrollo de la enfermedad con la aplicación del aceite esencial de geranio.

El tratamiento T10 compuesto por el hongo y la aplicación del aceite esencial de geranio comienza con un crecimiento de *Phytophthora* por encima del resto de tratamientos. Durante todo el proceso de estudio la enfermedad continua desarrollándose, alcanzando un grado entre 1,5-2, los cuales se corresponden con plantas decaídas con primeros síntomas de pudrición.

Para *Phytophthora parasitica* el fungicida consiguió su inhibición durante todo el estudio. Aunque la inhibición no es completa y dista de la eficacia del Mancozeb el aceite consigue la inhibición parcial disminuyendo los síntomas y daños causados. Entre el testigo y este tratamiento existen 2 niveles dentro de la escala de enfermedad, lo que significa que se produce un 50% de inhibición, encontrándose el tratamiento en un punto intermedio de control.

La Tabla 5 está compuesta por los datos obtenidos a partir de los tratamientos descritos anteriormente. Donde se muestra el análisis estadístico realizado a los mismos. En la primera toma de datos realizada no existieron diferencias estadísticas, apareciendo en el segundo día de muestreo y que continúan durante todo el último muestreo.

Gráfica 2: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de aceite de geranio.



T2: Testigo inoculado con *Phytophthora parasitica*.

T4: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + Mancozeb (0,30%).

T10: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + aceite esencial de geranio.

Tabla 5: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de aceite de geranio.

DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T2	0,25±0,70	0,37±1,06B	0,75±1,16	2,12±1,45	3,00±0,92	3,00±0,92	3,25±0,88	3,62±0,74
		c	b	a	a	a	a	a
T4	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		c	b	c	c	c	c	d
T10	0,40±0,54	1,00±0,00	1,00±1,73	1,40±1,51	1,40±1,51	1,60±1,34	1,60±1,34	2,0±1,22
		a	b	ab	b	b	b	b
p-Valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor ≤ 0,05.

4.1.2.3 Efecto *in vivo* de extractos de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre el desarrollo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en un cultivo de tomate.

La Gráfica 3 muestra la evolución de la enfermedad que afecta a las plantas que fueron inoculadas con *Fusarium* (testigo), tratadas con extracto de geranio, tanto con el método de infusión (geranio caliente) como el extracto en solución fría (geranio frío), y el tratamiento con Mancozeb.

El tratamiento T1 que se observa en la Gráfica 3 estuvo compuesto únicamente por el inóculo de *Fusarium*. Su desarrollo al encontrarse en condiciones normales se produce de forma ascendente, presentando una mayor infección durante los primeros muestreos, sin detenerse hasta el final del ensayo donde la enfermedad alcanza la categoría de 3 sobre un máximo de 4. En esta categoría las plantas presentan un alto grado de pudrición.

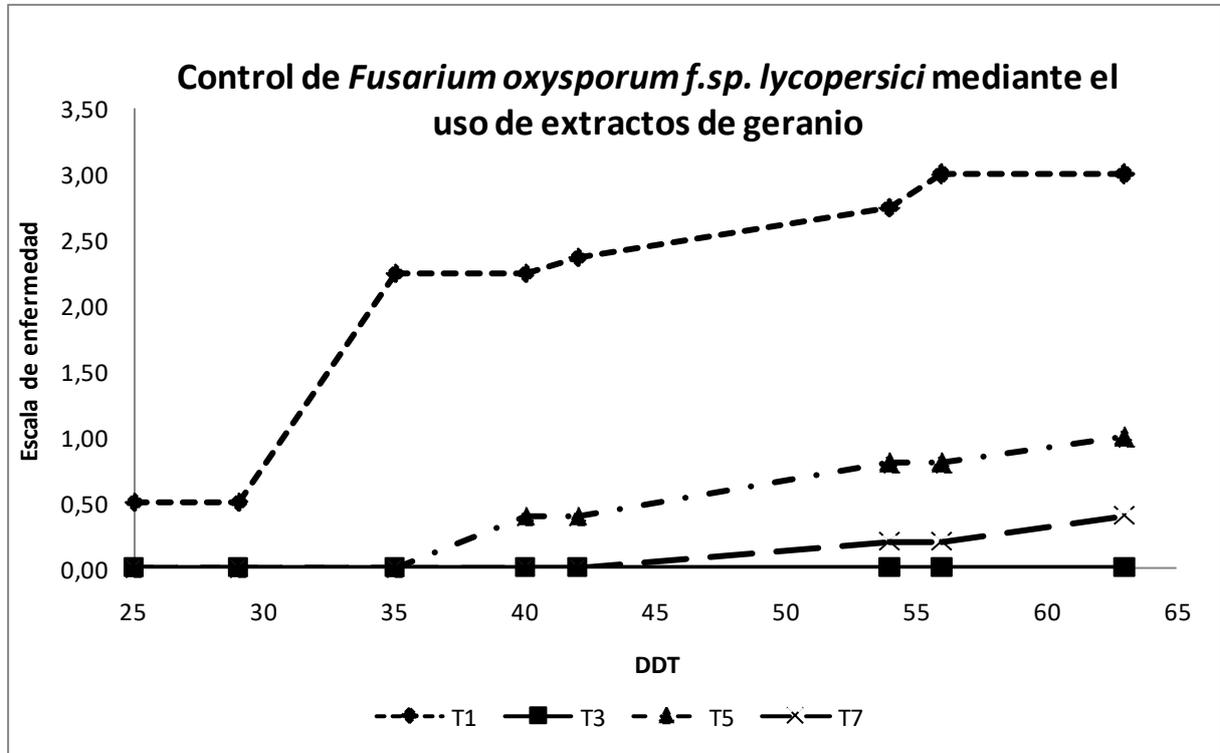
Los tratamientos que sí contenían aplicación de agentes de control biológico, son el T5 formado por la inoculación de *Fusarium* y extracto de geranio preparado mediante el método de infusión (geranio caliente) y el T7 compuesto por *Fusarium* y extracto de geranio preparado por solución sin temperatura (geranio frío).

El tratamiento T5 proporciona un retraso de la enfermedad de 10 días aproximadamente, a partir de este momento comienzan las primeras muestras de enfermedad que crecen de forma continua sin alcanzar el nivel 1 de enfermedad, en el último muestreo realizado estas plantas se presentan decaídas sin síntomas de pudrición, con un porcentaje de inhibición del 75%.

El tratamiento T7 provoca un retraso en la aparición de la enfermedad durante aproximadamente 45 DDT. Después de este muestreo comienza el desarrollo de la enfermedad que no alcanza un nivel superior al 0,3, esto se traduce en plantas sanas e inhibición de la enfermedad en un 92,5%, obteniendo un efecto semejante al fungicida aplicado.

La Tabla 6 está formada por los datos obtenidos de los tratamientos descritos anteriormente así como el análisis estadístico de los mismos. En el primer muestreo no aparecen diferencias estadísticas, estas se muestran desde el segundo muestreo y en adelante. Entre el tratamiento T3 y T7 no existen diferencias significativas durante la mayor parte del desarrollo del estudio, a diferencia del tratamiento T5 que presenta unos valores de control intermedios entre el testigo de *Fusarium* y el resto de tratamientos.

Gráfica 3: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos de geranio.



T1: Testigo inoculado con hongo *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T3: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + Mancozeb (0,30%).

T5: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio caliente.

T7: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio frío.

Tabla 6: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos de geranio.

DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T1	0,50±0,75	0,50±0,75	2,25±1,90	2,25±1,90	2,37±1,76	2,75±1,75	3,00±1,51	3,00±1,51
		ab	a	a	a	a	a	a
T3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		c	b	c	c	c	c	d
T5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±0,54	0,40±0,54	0,80±0,44	0,80±0,44	1,00±0,70
		bc	b	bc	bc	bc	bc	bc
T7	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,44	0,20±0,44	0,40±0,54
		c	b	c	c	c	c	cd
p-valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor ≤ 0,05.

4.1.2.4 Efecto *in vivo* de extractos de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) en un cultivo de tomate.

La Gráfica 4 muestra la interacción entre los agentes de control biológico compuestos por: extracto de geranio obtenido por el método de infusión caliente (T6), el extracto de geranio preparado en frío (T8) y el tratamiento testigo (T2) frente al desarrollo de *Phytophthora parasitica* en un cultivo de tomate.

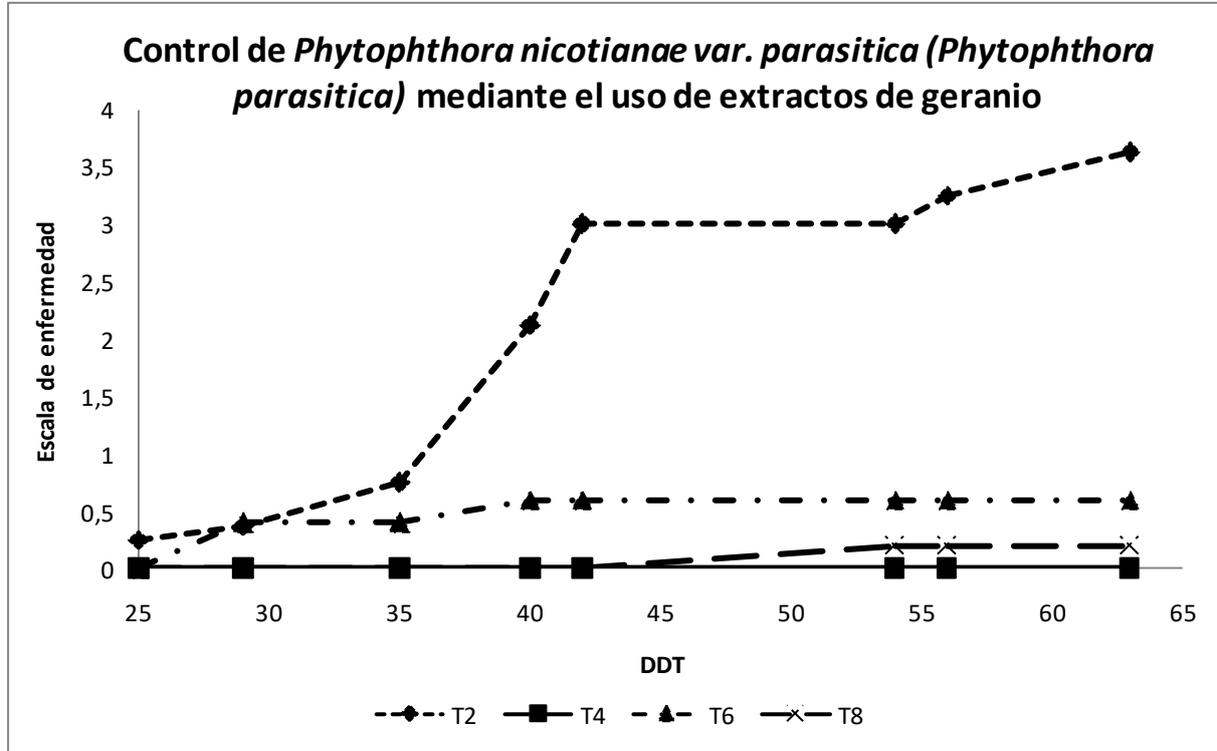
El tratamiento T2 (testigo) al encontrarse en las condiciones adecuadas para la evolución del hongo se produce un avance de la enfermedad como se observa en la Gráfica 4 de izquierda a derecha. Este proceso alcanza un nivel de 3 en el punto intermedio del ensayo, donde las plantas ya se encontraban con una elevada pudrición, a partir de este momento se produce una estabilidad en el desarrollo de la enfermedad que se prolonga durante 15 días y finalmente aumentado el grado de enfermedad en 3,5-4 durante los últimos días de ensayo. Como resultado se obtienen plantas completamente muertas. Este tratamiento será utilizado de referencia para analizar el resultado de los demás tratamientos.

El primer día de muestreo (25 DDT) se observaron en el tratamiento a base de geranio caliente (T6) los primeros signos de enfermedad que se desarrolla equilibradamente en todo el estudio manteniendo los niveles de enfermedad por debajo del 0,5. Esto significa que el porcentaje de inhibición que proporcionó fue de un 87,5%.

El tratamiento preparado con extracto de geranio y agua a temperatura ambiente (T8) produjo un retraso en la aparición de la enfermedad de 25 días a partir del primer muestreo donde ya había comenzado la enfermedad en el testigo de *Phytophthora*. El grado de enfermedad que se alcanza al final del estudio no superó el 0,1 dentro de la escala de enfermedad lo que supone un 97,5% de control de la misma. Con un resultado comparable al que proporciona el uso del fungicida químico utilizado que aportó una inhibición del 100%.

La Tabla 7 muestra los datos obtenidos de los tratamientos anteriormente descritos y su análisis estadístico. El primer y tercer día de toma de datos no se mostraron diferencias estadísticas, estas aparecen en el resto de muestreos, como indica el resultado obtenido por el P-valor. Durante todo el estudio el tratamiento T4 y T8 presentan valores estadísticos semejantes en la mayoría de los muestreos realizados, mientras que el tratamiento T6 mostró un comportamiento intermedio entre el testigo de *Phytophthora* y los demás tratamientos.

Gráfica 4: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos de geranio.



T2: Testigo inoculado con *Phytophthora parasitica*.

T4: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + Mancozeb (0,30%).

T6: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio caliente.

T8: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio frío.

Tabla 7: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos de geranio.

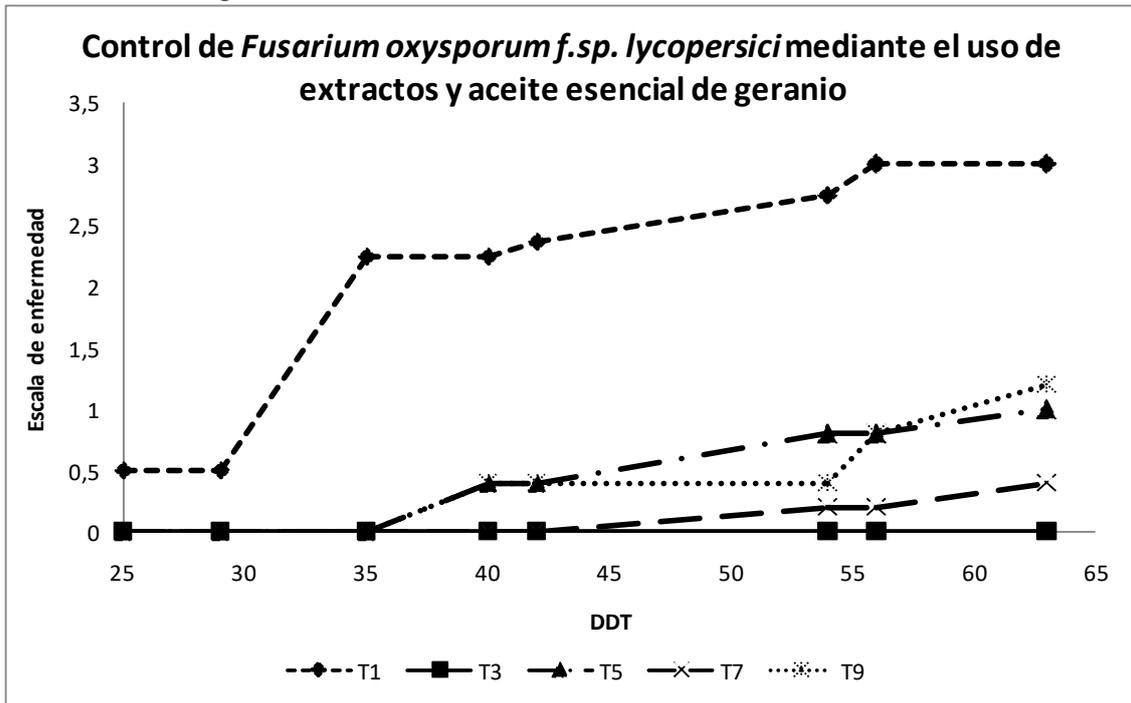
DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T2	0,25±0,70	0,37±1,06 bc	0,75±1,16 b	2,12±1,45 a	3,00±0,92 a	3,00±0,92 a	3,25±0,88 a	3,62±0,74 a
T4	0,00±0,00	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 d
T6	0,00±0,00	0,40±0,54 bc	0,40±0,54 b	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 cd
T8	0,00±0,00	0,00±0,00 bc	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,20±0,44 c	0,20±0,44 c	0,20±0,44 cd
p-Valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor ≤ 0,05.

4.1.2.5 Efecto de extractos y aceite de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

Finalmente en la Gráfica 5 y la Tabla 8 se muestran a modo de resumen y de manera conjunta todos los datos correspondientes al control de FOL descritos anteriormente.

Gráfica 5: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.



T1: Testigo inoculado con hongo *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T3: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + Mancozeb (0,30%).

T5: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio caliente.

T7: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + extracto de geranio frío.

T9: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* + aceite esencial de geranio.

Tabla 8: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.

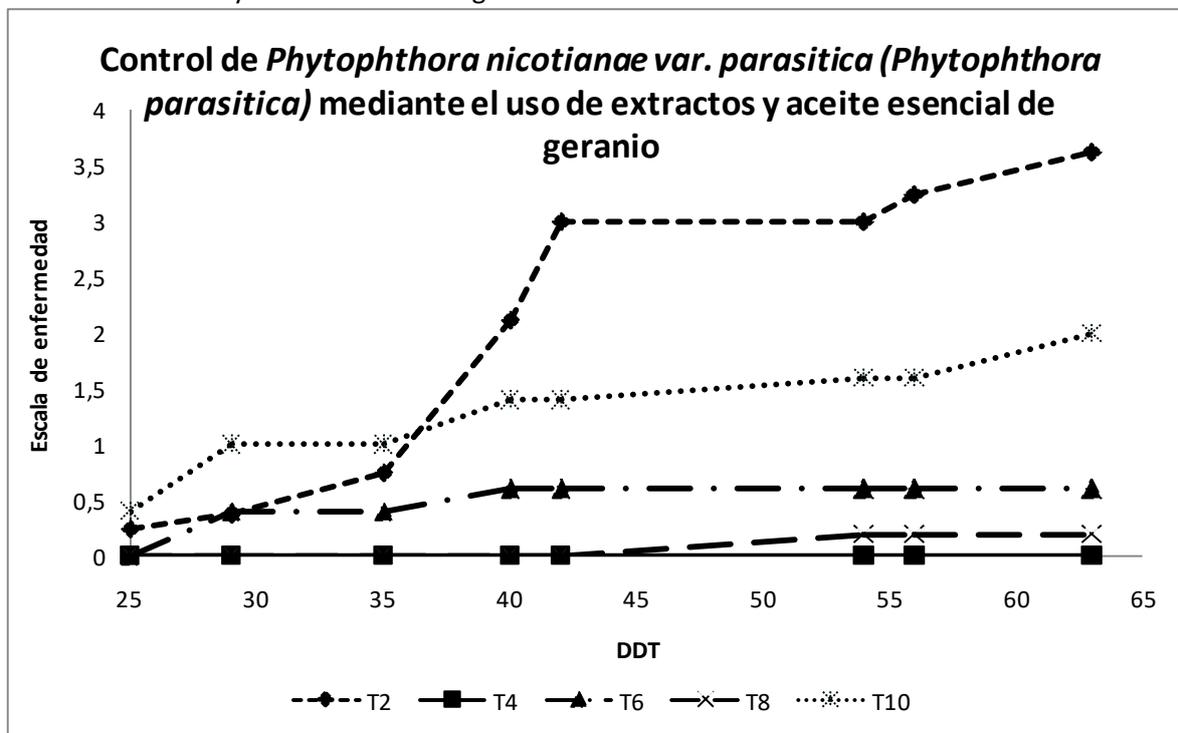
DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T1	0,50±0,75	0,50±0,75	2,25±1,90	2,25±1,90	2,37±1,76	2,75±1,75	3,00±1,51	3,00±1,51
		ab	a	a	a	a	a	a
T3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		c	b	c	C	c	c	d
T5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±0,54	0,40±0,54	0,80±0,44	0,80±0,44	1,00±0,70
		bc	b	bc	bc	bc	bc	bc
T7	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,44	0,20±0,44	0,40±0,54
		bc	b	c	c	c	c	cd
T9	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±0,54	0,40±0,54	0,40±0,54	0,80±1,09	1,20±1,09
		bc	b	bc	bc	c	bc	bc
p-Valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor ≤ 0,05.

4.1.2.6 Efecto de extractos y aceite de geranio (*Pelargonium graveolens*) sobre *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*).

Finalmente en la Gráfica 6 y la Tabla 9 se muestran a modo de resumen y de manera conjunta todos los datos correspondientes al control de FOL descritos anteriormente.

Gráfica 6: Control de *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.



T2: Testigo inoculado con *Phytophthora parasitica*.

T4: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + Mancozeb (0,30%).

T6: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio caliente.

T8: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio frío.

T10: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + aceite esencial de geranio.

Tabla 9: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.

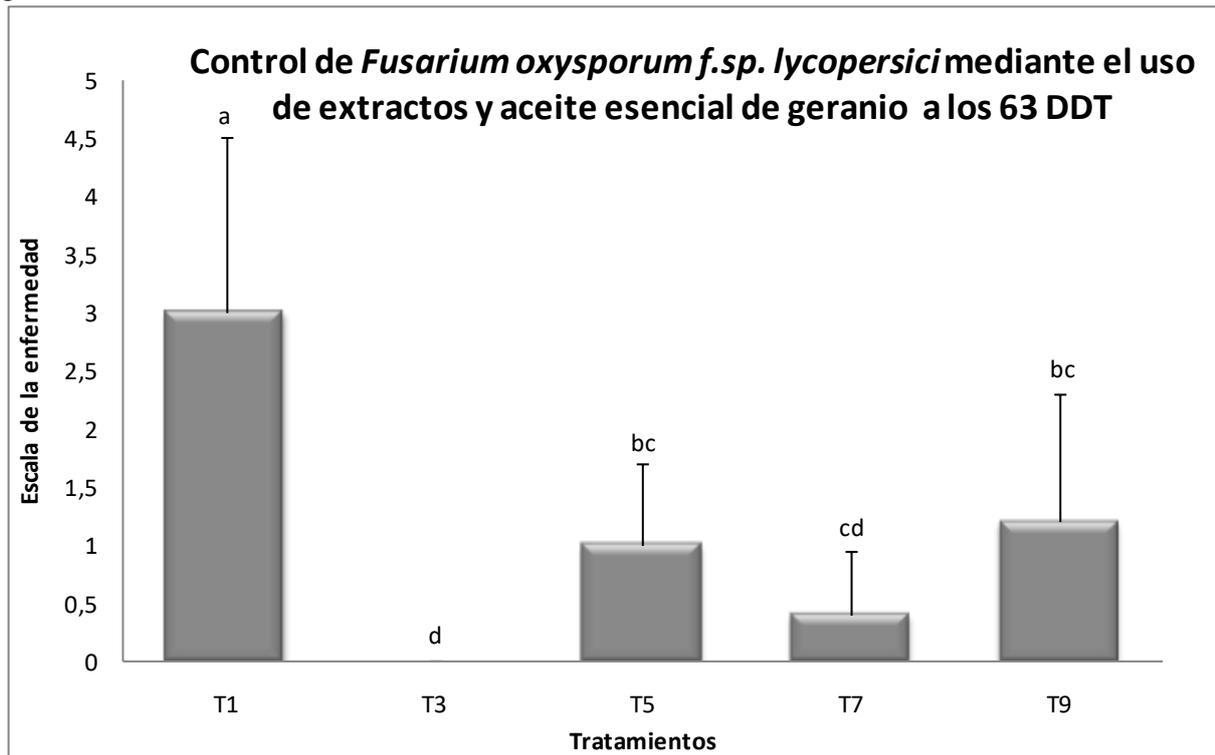
DDT	25	29	35	40	42	54	56	63
T2	0,25±0,70	0,37±1,06 bc	0,75±1,16 b	2,12±1,45 a	3,00±0,92 a	3,00±0,92 a	3,25±0,88 a	3,62±0,74 a
T4	0,00±0,00	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 d
T6	0,00±0,00	0,40±0,54 bc	0,40±0,54 b	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 bc	0,60±0,54 cd
T8	0,00±0,00	0,00±0,00 bc	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,20±0,44 c	0,20±0,44 c	0,20±0,44 cd
T10	0,40±0,54	1,00±0,00 a	1,00±1,73 b	1,40±1,51 ab	1,40±1,51 b	1,60±1,34 b	1,60±1,34 b	2,0±1,22 b
p-Valor	0,1238	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor \leq 0,05.

4.1.2.7 Resultado global *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La Gráfica 7 muestra a modo de síntesis los datos tomados durante el último muestreo para los tratamientos con los que se pretendía hacer frente a *Fusarium*: el tratamiento T5 formado por geranio caliente, el tratamiento T7 al que se le aplicó geranio frío, y el tratamiento T9 con aceite de geranio, además del testigo de *Fusarium* (T1) y el fungicida utilizado (T3).

Gráfica 7: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT.



T1: Testigo inoculado con hongo *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*.

T3: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + Mancozeb (0,30%).

T5: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + extracto de geranio caliente.

T7: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + extracto de geranio frío

T9: Inoculación de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* + aceite esencial de geranio.

La Tabla 10 contiene los datos recogidos el último día de muestreo con el análisis estadístico correspondiente, como indica el p-valor existen diferencias estadísticas relevantes entre tratamientos, exceptuando el tratamiento T5 y T9.

Tabla 10: Control de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT.

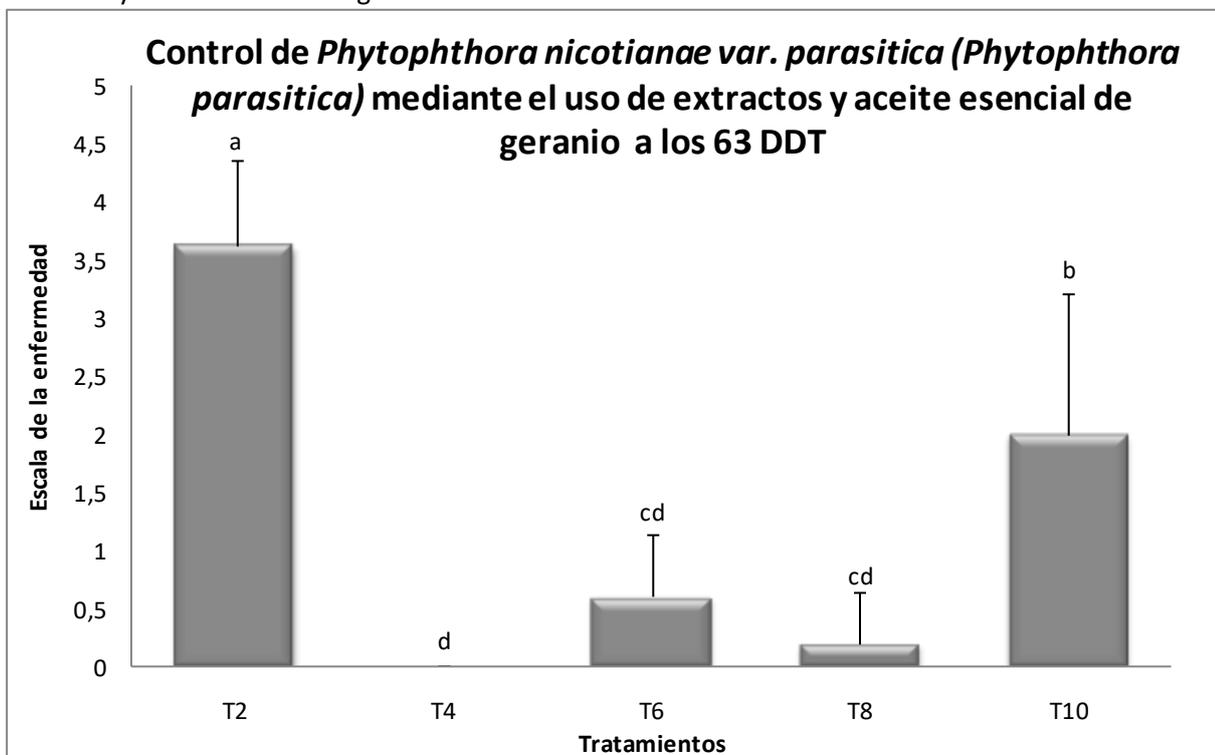
DDT	63
T1	3,00±1,51 a
T3	0,00±0,00 d
T5	1,00±0,70 bc
T7	0,40±0,54 cd
T9	1,20±1,09 bc
p-Valor	0,0000

*Dentro de cada columna valores seguidos por la misma letra(s) muestran diferencias significativas con un p-valor $\leq 0,05$.

4.1.2.8 Resultado global *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*).

El resultado mostrado en la Gráfica 8 determina de forma sintetizada la eficacia mostrada por los tratamientos en los que se aplicó agentes naturales obtenidos del geranio frente a *Phytophthora*. El tratamiento T6 y T8 se corresponden con los extractos de geranio y el tratamiento T10 hace referencia al uso del aceite esencial de geranio. Como se describió anteriormente estos tratamientos han seguido un proceso que termina en este punto.

Gráfica 8: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT.



T2: Testigo inoculado con *Phytophthora parasitica*.

T4: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + Mancozeb (0,30%).

T6: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio caliente.

T8: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + extracto de geranio frío.

T10: Inoculación de *Phytophthora parasitica* + aceite esencial de geranio.

La Tabla 11 presenta los datos tomados 63 DDT. El análisis estadístico que se obtuvo muestra como entre los datos existen diferencias estadísticas significativas como nos indica el p-valor resultante, a excepción de los tratamientos T6 y T8.

Tabla 11: Control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio a los 63 DDT.

DDT	63
T2	3,62±0,74 a
T4	0,00±0,00 d
T6	0,60±0,54 cd
T8	0,20±0,44 cd
T10	2,0±1,22 b
P-valor	0,0000

4.1.3 Ensayo *in vitro*.**4.1.4 Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de extracto y aceite esencial sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

En el ensayo realizado en laboratorio en condiciones controladas de humedad y temperatura se obtuvieron los resultados que se muestran en la Gráfica 9 y Tabla 12, se representan los tratamientos en los que se ensayaron el control sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El tratamiento T0 se corresponde con el testigo el cual no contenía ningún tipo de aplicación. En este tratamiento se produce un crecimiento micelial que ocupó la totalidad la placa, presentando por tanto un porcentaje de inhibición del 0%.

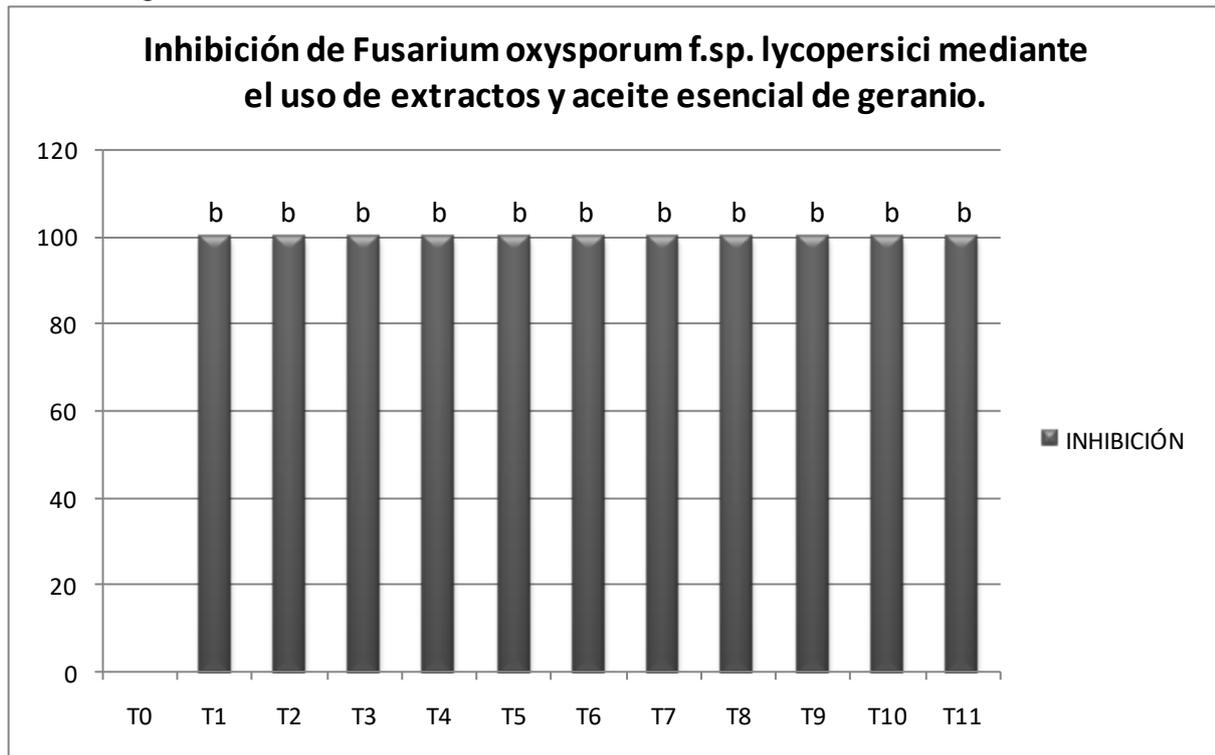
Los tratamientos T1, T2, T3 y T4 estuvieron formados por el fragmento del hongo y extracto de geranio diluido a temperatura ambiente con diferentes concentraciones, 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente.

Los tratamientos T5, T6, T7 y T8 se componían del fragmento del hongo y extracto de geranio preparado mediante el método de infusión con diferentes concentraciones, 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente.

Los tratamientos T9, T10 y T11 contenían aceite de geranio con diferentes concentraciones, 1%, 2,5% y 4% y el fragmento del hongo.

Los resultados obtenidos como se aprecia en la Gráfica 9 y Tabla 12 proporcionaron una inhibición completa del crecimiento micelial, lo que se corresponde con un 100% de inhibición. Las concentraciones más bajas de cada tratamiento presentaron el mismo resultado que las concentraciones más altas por lo que el uso de bajas concentraciones de estos extractos y aceites es igualmente efectivo.

Gráfica 9: Inhibición de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.



T0: testigo sin inoculación de hongo y sin extracto.

T1: extracto frio (25)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T2: extracto frio (50)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T3: extracto frio (75)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T4: extracto frio (100)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T5: extracto caliente (25)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T6: extracto caliente (50)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T7: extracto caliente (75)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T8: extracto caliente (100)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T9: aceite geranio (1%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T10: aceite geranio (2.5%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

T11: aceite geranio (4%)+ *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

Tabla 12: Inhibición de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.

TRATAMIENTO	INHIBICIÓN (%)
T0	0 a
T1	100 b
T2	100 b
T3	100 b
T4	100 b
T5	100 b
T6	100 b
T7	100 b
T8	100 b
T9	100 b
T10	100 b
T11	100 b

4.1.4.1 Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de extracto y aceite esencial sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*).

En la Gráfica 10 y Tabla 13 se recogen los datos obtenidos *in vitro* a partir del ensayo realizado para *Phytophthora*, al que se le aplicaron diferentes concentraciones de extractos y aceite esencial de geranio, estudiándose la inhibición producida.

Al tratamiento T0 no se le aplicó ningún preparado de los realizados con geranio por lo que el hongo al encontrarse en condiciones controladas y favorables de desarrollo llegando a ocupar el diámetro completo de la placa de petri. La inhibición producida fue del 0%.

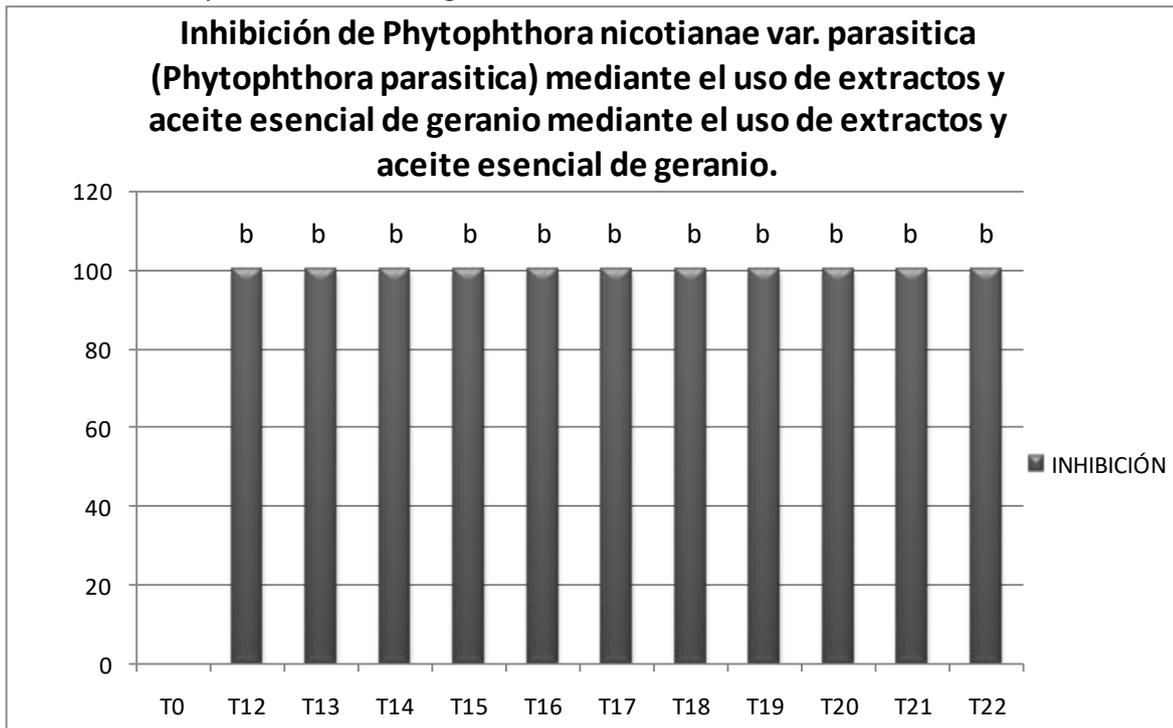
Los tratamientos que contenían extracto de geranio preparado a temperatura ambiente (geranio frío) son los tratamientos T12, T13, T14 y T15, estos se diferenciaban por tener diferentes concentraciones del extracto, 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente.

Los tratamientos que se le aplicó extracto de geranio preparado mediante infusión son los tratamientos T16, T17, T18 y 19 con concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%.

Los tratamientos T20, T21 y T22 estaban formados por el fragmento del hongo así como la aplicación de aceite esencial de geranio en diferentes concentraciones, 1%, 2,5% y 4% respectivamente.

Todos los tratamientos a los que se le hicieron aplicaciones de los agentes naturales extraídos del geranio presentaron un porcentaje de inhibición del 100% incluso en las concentraciones más bajas, como se puede apreciar en la Gráfica 10.

Gráfica 10: Inhibición de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.



T0: testigo sin inoculación de hongo y sin extracto.

T12: extracto frío (25)+ *Phytophthora parasitica*.

T13: extracto frío (50) + *Phytophthora parasitica*.

T14: extracto frío (75)+ *Phytophthora parasitica*.

T15: extracto frío (100)+ *Phytophthora parasitica*.

T16: extracto caliente (25)+ *Phytophthora parasitica*.

T17: extracto caliente (50)+ *Phytophthora parasitica*.

T18: extracto caliente (75)+ *Phytophthora parasitica*.

T19: extracto caliente (100)+ *Phytophthora parasitica*.

T20: aceite geranio (1%)+ *Phytophthora parasitica*.

T21: aceite geranio (2.5%)+ *Phytophthora parasitica*.

T22: aceite geranio (4%)+ *Phytophthora parasitica*.

Tabla 13: Inhibición de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (*Phytophthora parasitica*) mediante el uso de extractos y aceite esencial de geranio.

TRATAMIENTO	INHIBICIÓN (%)
T0	0 a
T12	100 b
T13	100 b
T14	100 b
T15	100 b
T16	100 b
T17	100 b
T18	100 b
T19	100 b
T20	100 b
T21	100 b
T22	100 b

4.2 Discusión.

Tras la revisión realizada acerca de la actividad antifúngica de los extractos naturales y aceites esenciales muchos autores aseveran que la actividad no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antifúngica es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. (Santamarina *et al.*, 2015).

Algunos autores indican que los extractos vegetales y aceites esenciales son significativamente más efectivos que sus componentes mayoritarios (Santamarina *et al.*, 2015), mientras que otros muestran resultados contrarios (Carbelo, 2018) (datos no publicados).

Camarena (2015) en su trabajo fin de grado trata de demostrar la actividad antifúngica *in vitro* de aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis*) sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, además de otros hongos. El resultado obtenido fue una inhibición completa del crecimiento micelial del hongo, por lo que salvando las diferencias que existen por la utilización de diferentes aceites los resultados obtenidos concuerdan con lo estudiado en este trabajo ya que el aceite esencial de tomillo y el aceite esencial de geranio comparten algunos compuestos químicos dentro de su composición como es el linalool.

Sharma *et al.*, (2017) analizaron *in vitro* la actividad antifúngica de cuatro aceites esenciales: clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha 3 piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Estos fueron evaluados contra la marchitez causada por *Fusarium oxysporum F. sp. lycopersici*. Esta investigación reveló que todos los aceites esenciales evaluados tuvieron una actividad antifúngica de moderada a alta en el siguiente orden de efectividad, clavo, limoncillo, menta y eucalipto. Estos resultados apoyan lo estudiado en el presente trabajo, ya que tras la aplicación de aceite de geranio, se produjo una inhibición total del desarrollo micelial del hongo.

Scalvenci *et al.*, (2016), Vaillant *et al.*, (2015) o Rodríguez *et al.*, (2000) hicieron uso de aceites esenciales obtenidos de distintas plantas frente a *Phytophthora f. sp.* y *Phytophthora parasitica var. nicotianae* en un estudio *in vitro* en el que obtuvieron resultados de un 94% de inhibición. Estos autores reafirman lo presentado en esta investigación, obteniendo porcentajes similares de inhibición cuando se aplica aceite de geranio para el control de *Phytophthora parasitica*.

Pedroso *et al.*, (2012a) determinaron el efecto antifúngico de dos extractos procedentes de *Acacia farnesiana* sobre el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Los extractos mostraron más de un 90% de inhibición del crecimiento micelial desde la primera evaluación realizada a las 72h después de la inoculación hasta el fin del ensayo. Adicionalmente, se determinaron el origen de la inhibición, los metabolitos con actividad antifúngica reconocida fueron: flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides y saponinas. Como se ha detallado previamente, el extracto de geranio es rico en flavonoides, por lo que no es de

extrañar que en la presente investigación se obtengan resultados de inhibición sobre el crecimiento fúngico similares a los obtenidos por los autores anteriores.

Pedroso *et al.*, (2012b) en este estudio se obtuvo el extracto acuoso de hojas de *Parthenium hysterophorus L.* con el objetivo de evaluar su actividad antifúngica *in vivo* contra el hongo *Pyricularia grisea Sacc.* responsable de la enfermedad más importante en el arroz (*Oryza sativa, L.*). Se encontró que el extracto tenía elevada actividad antifúngica con una concentración de 10% de extracto la inhibición fue total, además de tener actividad biocida. Se determinó que el extracto contiene metabolitos con efecto antimicrobiano como: taninos, fenoles, flavonoides y triterpenos. El geranio contiene en su composición algunos compuestos como los fenoles y flavonoides que se encuentran presentes en otras plantas como es el caso de *Parthenium hysterophorus L.*, por lo que los resultados obtenidos en ambos estudios presentan similitudes.

Lizcano, (2007) en su trabajo fin de grado realizó una prueba en invernadero (*in vivo*) donde evaluó la actividad del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) en forma preventiva y curativa o de control de la enfermedad, se estimó el porcentaje de incidencia y severidad. Después de ser evaluados los resultados determinaron que el extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) puede disminuir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Al instalarse sobre las plantas inoculadas se redujo la expresión de los síntomas de las enfermedades. El extracto de tomillo comparte diferentes compuestos químicos con el geranio por lo que los resultados obtenidos por Lizcano no difieren en gran medida de los determinados durante este ensayo.

Moreno, (2011) realizó su tesis doctoral con el objetivo de evaluar la actividad antifúngica *in vivo* de los extractos de *Piper eriopodon* (*Piperaceae*) y *Zanthoxylum monophyllum* (*Rutaceae*) y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. Los ensayos mostraron que el extracto con mayor actividad antifúngica fue *P. eriopodon*., mientras que *Z. monophyllum* no presentó ninguna actividad en los ensayos *in vivo*. Al igual que en el presente estudio *Fusarium* es controlado mediante el uso de extractos vegetales, inhibiendo su crecimiento y desarrollo de la enfermedad.

La Torre *et al.*, (2016) evaluaron el uso de esencias para controlar la marchitez causada por *Fusarium* en el tomate. El aceite de clavo, aceite de tomillo, aceite de romero y sus componentes principales, así como los dos productos comerciales, Bioxeda y Sporatec. La prueba se llevó a cabo en plántulas de tomate de 5 semanas trasplantadas en macetas y depositadas en un invernadero. Estas macetas fueron inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Los tratamientos se realizaron con aceites esenciales en diversas concentraciones. Los experimentos indicaron que todos los productos probados fueron capaces de reducir la marchitez provocada por *Fusarium* en el tomate. Los mejores resultados se obtuvieron con aceite de clavo, sin embargo, el aceite de romero también fue eficaz en el control de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. El rendimiento de los aceites esenciales

fue menor que el rendimiento de los productos de referencia (Bioxeda y Sporatec). Los resultados obtenidos en el presente ensayo se ven reafirmados por el estudio de estos autores ya que del mismo modo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es controlado de manera eficaz por el uso de aceites esenciales, consiguiendo una inhibición de la enfermedad.

Švecová *et al.*, (2017) analizaron *in vitro* las propiedades antifúngicas del extracto de *Boerhavia diffusa* L. (*Nyctaginaceae*) contra *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici*, agentes causales de la enfermedad del tizón tardío en tomate. El extracto utilizado tuvo un efecto fungitóxico en *P. infestans* e inhibió completamente su crecimiento micelial a todas las concentraciones probadas (0,25, 0,5 y 1%). El crecimiento del micelio de *P. capsici* fue inhibido en un 90% por el extracto al 1%. Su efecto fue comparable al del fungicida sintético, el extracto de *B. diffusa* se puede considerar como una alternativa ambientalmente amigable alternativa al control químico del tizón tardío en tomate. Este estudio corrobora los datos obtenidos por el aceite de geranio en concentraciones similares para el control de *Phytophthora*.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES.

5.1 Ensayo *in vivo*.

1. El aceite de geranio se mostró eficaz para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora nicotianae var. parasitica* (*Phytophthora parasitica*) disminuyendo la expresión de la enfermedad en un 75% y 60% respectivamente. Solo se manifestó retraso de la enfermedad para *Fusarium*.
2. El extracto de geranio (infusión caliente) mostró la misma eficacia que el aceite para *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, alcanzando *Phytophthora parasitica* una reducción de la expresión de la enfermedad de un 87,5% con respecto al testigo.
3. El extracto de geranio (infusión fría) se mostró eficaz para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora parasitica*, disminuyendo la expresión de la enfermedad en un 92,5% y 97,5%, respectivamente. Para ambos patógenos existió retraso de la enfermedad de entre 20 a 25 días.
4. Todos los tratamientos empleados en el ensayo *in vitro* (aceite, extracto frío y extracto caliente de geranio) se mostraron eficaces para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y *Phytophthora parasitica* inhibiendo totalmente en un ensayo en placas de petri tanto a altas como a bajas dosis de los compuestos.

5.2 Reflexión.

Futuras investigaciones debieran de enfocarse en la aplicación de aceite y extractos de geranio en otros hongos fitopatógenos de gran impacto en la agricultura contemporánea, consiguiendo un beneficio medio ambiental, y una solución efectiva para el control de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA.

1. Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Salameh, A. (2002). Antymicotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 50: p.3208-3213.
2. Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. Fifth Ed. Academic Press, Burlington.
3. Albouy, J., Devergne, J.C. (2000). *Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales* Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
4. Aliaga, J A., Martín, M. M., Acebedo M^a P., Rodríguez J., (2012). Expansión del control biológico en el marco de la Producción Integrada en Almería.
5. Altieri, M. (2009). *La agricultura moderna: impactos ecológicos y la posibilidad de una verdadera agricultura sustentable*. University of California, Berkeley, Department of Environmental Science, Policy and Management. Berkeley, CA, USA.
6. Alzate, N. A. G., López, K., Marín, A., Murillo, W. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Tumbaga*, 1(4), p. 59-71.
7. Anaya, R. S. y Romero, J. N. (1990). *Hortalizas. Plagas y enfermedades*. Primera edición. Editorial Trillas, México. p. 34-36.
8. Aparicio, V., Casado, E., Lastres, J., Belda, J., Torres, M. M. (2000). Producción integrada en los cultivos hortícolas bajo abrigo de Almería. I Jornadas sobre Producción Integrada. Ed. Asociación AGRO. Universidad de Almería. Almería.
9. Aparicio, V., Rodríguez, M.D., Gómez, V., Sáez, E., Belda, J.E., Casado, E., Lastres, J. (1995). *Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: control racional*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla: p.13
10. Baker, K.F., Cook, R.J. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. p. 432
11. Baker, R. (1980). Measures to control *Fusarium* and *Phialophora* wilt pathogens of carnation. *Plant Dis.* 64: p. 743-749.
12. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46 (2): p.446-475
13. Balachowsky, A. S. (1951): *La Lutte contre les Insectes*. Ed. Payot Paris, p. 380
14. Bandoni, A., (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Argentina: Red de Editoriales Universitarias. P. 410.
15. Bandoni, A., (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Argentina: Red de Editoriales Universitarias. p.410.

16. Bartual, R., Campos, T., (1984). Hipótesis sobre la genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* L. en pimiento. V. Jornadas de Mejora de Hortalizas. INIA (Logroño), p. 238-256.
17. Bautista, S., Barrera L. N., García, E. D., Hernández, M. L. (2003). Potencial use of plant extracts to reduce postharvest fungal rots of fruits and vegetables. In: Food Technology and Quality Evaluation. R Dris, A Sharma (eds). Science Publishers, Inc., N H. p. 142-154.
18. Bautista, S., Barrera, L. N., Bravo, L. L., Bermúdez, K. T. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. Rev. Mex. Fitopatol. 20: p.8-12.
19. Bautista, S., Hernández M., Bosquez E. (2004). Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (2): p. 178-186.
20. Bawa, I. (2016). Management strategies of *Fusarium* wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.): A review. Int. J. of Advanced Academic Research. 2(5): p.32-42.
21. Beltrán, F. D., Parra, A., Roldán, A., Soler, A., Vila, E. (2012). Pasado, presente y futuro del control integrado de plagas en la provincia de Almería. Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA), (1), 27-43.
22. Benllonch, J. (2009). La normativa europea de fitosanitarios pone en peligro a agricultura española. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, (205).
23. Bernal, A., Zamora J. F., Virgen G. y Nuño R. (2005). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23 (2): 140-146.
24. Bernal, R. (2010). Enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión. Serie Técnica. INIA. Montevideo, Editorial Hemisferio Sur SRL, 181, p.1-71.
25. Bertolote J. M., Butchart A., Besbelli N., (2004). World health organization: Pesticides and Health.
26. Blázquez, M., (2014). Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. Journal of Scientific Research & Reports, 3 (14): p.1843-1860.
27. Boyraz, N., Ozcan M. (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. Journal Food Microbiology 107: 238-242.
28. Bravo, L.L., Bermúdez, T.K. y Montes, B.R. (2000). Inhibición de *Fusarium* moniliforme mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo Integrado de Plagas 57: p.29- 34.
29. Brayford, D. (1996). *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici*, IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1270. Mycopathologia 133: p.61-63.

30. Brechelt, A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL)*. Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD.
31. Breda de Haan, J. V. (1896). De bibitzieke in de Deli tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae* (The root disease in Deli-tobacco caused by *Phytophthora nicotianae*). Meded. S. Lands Plantentium, 15.
32. Cabrera, A., Uclés, D., Agüera, T., de la Cruz, E., (2017). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería: Campaña 2016/2017. Editorial Fundación Cajamar, Almería.
33. Cajamar. (2016). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería, campaña 2015/2016. Cajamar Caja Rural. 46, p.14.
34. Camacho Ferre, F. (2003). Técnicas de producción de cultivos protegidos. 1st ed. Almería, España: Caja Rural Intermediterránea, p. 30.
35. Camarena, M. M. (2016). Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica (Doctoral dissertation).
36. Carbelo, A. (2018). Efectividad “in vitro” e “in vivo” del aceite esencial y extractos de clavo (*Syzygium aromaticum*) en control de hongos fitopatógenos. Proyecto Fin de Grado. Universidad de Almería. Escuela Superior de Ingeniería.
37. Chiang, M. (2003). Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública. Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS). p. 61.
38. Cisneros, F. (1995). Control Biológico. Disponible en [http://avocadosource.com/books/Cisneros Fausto 1995/CPA 8 PG 102-147.pdf](http://avocadosource.com/books/Cisneros_Fausto_1995/CPA_8_PG_102-147.pdf). Fecha de consulta: 15/05/2018.
39. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev.10: 564-582.
40. Daferera, J. D., Ziogas, N.B., Polissiou, G. M. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinérea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection 22: p.39-44.
41. Dan, Y., Liu, H. Y., Gao, W. W., Chen, S. L. (2010). Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Protection*, 29(3), p. 295-299.
42. De Bach P., (1964). Biological control of insect pests and weeds. New York: Reihold.
43. De León, M. (2008). “Comparación del rendimiento del aceite esencial de dos especies de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh), aplicando el método de hidrodestilación a nivel de laboratorio”. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería-Escuela de Ingeniería Química. Guatemala. p. 77.
44. Domini, M. E., et al (1995). Evaluación preliminar del efecto antiapetitivo de diferentes extractos vegetales. En Bioplág'95. Resúmenes. p. 83.
45. Enya, J. (2015). Study on the composition of microbial flora on tomato leaves and screening of biological control agents. *Journal of General Plant Pathology: JGPP*, 81(6), 476.

46. Erwin, D.C., Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora. Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. p. 145-184.
47. España. Real Decreto-ley 1201/2002 de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. Boletín Oficial del Estado, 20 de noviembre de 2002, núm. 287, p. 23340.
48. FAOSTAT. (2016). <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consultado el 04/03/2018.
49. Faria, T. D. J., Ferreira, R. S., Yassumoto, L., Souza, J. R. P. D., Ishikawa, N. K., Barbosa, A. D. M. (2006). Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (*eugenol chemotype*) against phytopathogenic fungi. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(6), p. 867-871.
50. Ferratto, J., Mondino, M. C. (2008). Producción, consumo y comercialización de hortalizas el mundo.
51. Funes, F. (1997). Experiencias cubanas en agroecología. *Revista Agricultura Orgánica*, agosto-diciembre, p.10-18.
52. Gabriel, C.J., Cook, R.J. (1990). Biological control, the need for a new scientific framework. *Bioscience* 40: p.204-207.
53. García L., Martínez R., Ortega S. y Castro B. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9 (2): p.86-96.
54. García, M. J. (2013). Conservación de *phytophthora* en muestras de suelos almacenados, identificación y evaluación de la especificidad parasitaria en tomate y pimiento.
55. Girhepuje, P.V., Shinde, G.B. (2011). Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 105: p.243-251.
56. Grondona, I., Hermosa, M.R., Gomis, M.D., García, P., García, J., y Monte, E., (1994). Control biológico de hongos de suelo que afectan a las semillas y plántulas. En: *Alternativas al bromuro de metilo en agricultura*. Ed. Antonio Bello. Junta de Andalucía 4: Almería. p. 41-45.
57. Guillen, M., Cabo, N. y Burillo, J., (1996). Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *J. Sci. Food Agric.*, 70: p.359-363.
58. Harborne, J. B. (1993). *Phytochemical Dictionary. Handbook of bioactive compound from plants*. Taylor and Francis, p. 791.
59. Hernández, A. N., Bautista S., Velázquez M. G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (2): 119-123.
60. Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: p.603-608.
61. Janssen, D., García, C., Ruiz, L., de Cara, M., Simon, A., Martínez, Á. (2016). Resistencia a enfermedades en los cultivos de tomate producidos en España.

62. Jarvis, W. R. (1988). *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69: p.49-64.
63. Jarvis, W. R. y Shoemaker, R. A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root of tomato. *Phytopathology*, 68: p. 1.679-1.680.
64. Jiménez, P. J. E. (2008). Problemática de la resistencia a fitosanitarios: evolución y perspectivas de futuro. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (197), p. 32-35.
65. Jirovetz, L. y Buchbauer, G., (2005). Processing, análisis and application of essential oils. Ed. Har Krishan Bhalla and Sons. India.
66. Junta de Andalucía (2010). Anuario de estadísticas agrarias y pesqueras de Andalucía. Ed. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Andalucía (España).
67. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R. y Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Daturametel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiological and Molecular plant pathology* 65(2): p.91-100.
68. Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C.J., Islam, R., Pauls, K.P. (2011). Integration of biotechnologies: disease resistance pathology *Fusarium*. In: Moo-Young M. (ed.). *Comprehensive Biotechnology*, second edition, Elsevier, Amsterdam. p.729-743.
69. Katan, T., Shlevin, E., Katan, J. (1997). Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*. 87: p.712-719.
70. Ko, W. (1981). Reversible change of mating type in *Phytophthora parasitica*. *J Gen Microbiol.*125 (2): p.451-154.
71. La Torre, A., Caradonia, F., Matere, A., Battaglia, V. (2016). Using plant essential oils to control *Fusarium* wilt in tomato plants. *European journal of plant pathology*, 144(3), p.487-496.
72. Lahlou, M., (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18: p.435-4488.
73. Lavandero, B., Muñoz, C., Barros, W. (2006). EL TALON DE AQUILES DEL CONTROL BIOLÓGICO: UNA NUEVA VISION PARA SU EXITO. *Agro-Ciencia*. 22. 111-123.
74. Lewis, J. A. y Papvizas, G. C. (1991). Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow; *Crop Protection* (10); p. 95-105.
75. Lizcano, M. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Doctoral dissertation, tesis publicada en www.javeriana.edu.co).
76. Lomeli, R., Rodríguez, E. Torres, A. (2014). el control biológico de plagas en la agricultura protegida en México.
77. Mapama. (2016). Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>. Consultado el: 04/03/2018.

78. Martínez, F. E., Cervantes, L., A., C. E., Hernández, L. G., Sánchez, C. L. D. T., Rueda, E. O. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, ESJ, 12(18).
79. Martínez, P. P. P. (2008). Organismos de control biológico: su actualidad en la horticultura intensiva española y requisitos para su comercialización. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (198), p. 49-55.
80. Mc Govern, R.J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 73: p.78-92.
81. Medina A., (2011). Aceites esenciales: usos, composición química y actividades biológicas. Tesina inédita de licenciatura. Universidad Autónoma de México.
82. Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W., Shan, W. (2014). *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology*, 5(2), p.43-51.
83. Miret, F. (2004). Situación actual de la producción integrada en Cataluña y España.
84. Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S. M. (2016). *Integration between chitosan and Zataria multiflora or Cinnamomum zeylanicum essential oil for controlling Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cucumber fruit rot. *LWT-Food Science and Technology*, 65, p. 349-356.
85. Montes, B., (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29: p.73-82.
86. Moreno, J. (2011). Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eripodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabólicos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
87. Müller, M. y Buchabauer, G., (2011). Essential oil components as pheromones. A review. *Flavour Fragrance Journal*, 26: p.357-377.
88. Muñoz, F. (1994). Plantas medicinales y aromáticas Madrid: Palermo.
89. Necha, L. L. B., Barrera, L. J. G. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista científica UDO agrícola*, 8(1), 33-41.
90. Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia.
91. OILB/SROP. (1973). La lutte intégrée en cultures sous serres. *Bull. OilblSrop* 1973 (4): p.73.
92. Ospina, L. M. P., Peláez, J. A. M., Borrego, P., Cardona, W. F. C., Villamizar, L. B. (2016). Composición Química y Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de *Pelargonium odoratissimum* (L) LHér (*Geraniaceae*). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(1), p. 74-83.
93. Pardo, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. Universidad de Barcelona, España. Recuperado de http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextrac_tosplantas.pdf.

94. Park, M.J., Gwaka, K.S., Yang, K.W., Kim, E.B., Jeung, J.W., Chang, I.G., Choi, A. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia* 80, p.290–296.
95. Parry, E., (1992). The chemistry of essential oils and artificial perfumes. Volumen 2. Scott, Greenwood and Son, Londres.
96. Paz, O. (2017). Pudrición del cuello y raíz del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Serie técnica 71. INIA. P 1-2.
97. Pedroso, A., Arrebato, M., Baños, S., Triana, A., y González, D. (2012a). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), p.91-96.
98. Pedroso, A., Arrebato, M., Travieso, R., González, D., Triana, A., Baños, S. (2012b). Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* del extracto acuoso de hojas de *Parthenium hysterophorus* check for this species in other resources L. sobre *Pyricularia grisea* check for this species in other resources Sacc. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), p.839-844.
99. Peredo, H., Palou, E., López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 3(1), 24-32.
100. Pérez Consuegra, N. (2004). Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba p.296.
101. Pérez, M. (2011). Epidemiología y control de *Phytophthora parasitica* en cultivos de tomate y pimiento bajo abrigo en el Sureste Peninsular de España. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. p.211.
102. Philogene, B., Regnault-Roger, C. y Vincent C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. y Vincent, C, (Ed). *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, p.18.
103. Pierozan, M.K., Pauleti, G., Rota, L., Dos Santos, A.C., Lerin, L.A., di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L. y Vladimiroliveira, J., (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 29: p.764-770.
104. Ramaiah, A.K., Garampalli, R.K. (2015). *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*.1; p. 22-27.
105. Raven, K. P., Hossner, L. R. (1993). Phosphorus desorption quantity- intensity relationship in soils"; en *Soil Science Society of American Journal* (57); p. 1.501-1.508.
106. Riley, C. V. (1875). Annual report on the noxious, beneficial and other insects of the state of Missouri. Ellwood Kirby.
107. Rodríguez, A. T., Morales, D., Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos tropicales*, 21(2).

108. Rose, J. (2000). 375 Essential Oils and hydrosols. Primera ed. California: Frog, Ltda.
109. Salmerón, V. A., Sánchez, E. M. C., García, J. L., Belda, J. E. (2001). Producción Integrada en los cultivos hortícolas bajo abrigo en Almería. In El sector agrario y agroalimentario de Almería ante el siglo XXI: evolución y perspectiva de nuestra agricultura en el año 2000: producción integrada: incidencia de las nuevas normativas de residuos de plaguicidas sobre la horticultura almeriense Instituto de Estudios Almerienses. (p. 183-191).
110. Santamarina, P., Roselló, J., Chiralt, A., Sempere, F. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticilloides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18 (2), p. 359-367.
111. Santos, M., Diáñez, F., de Cara, M., Camacho, F., y Tello, J. (2010). El control biológico de plagas y enfermedades. Un encuadre crítico. *Cuad. Estud. Agroaliment*, 1, p. 61-72.
112. Scalvenzi, L., Yaguache, B., Cabrera, P., Guerrini, A. (2016). Actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L. *Bioagro*, 28(1), p. 039-046.
113. Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils, *fi toterapia*. 77, p. 279-285.
114. Schery, R. (2000). Plantas útiles para el hombre. Séptima ed. Barcelona: Salvat Editores, S. A.
115. Schroth, M.N., Hancock, J.G., (1981). Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, 35: p. 453-476.
116. SEF (2016). Patógenos de plantas descritos en España. <http://sef.es/patogenos.php> (fecha de consulta: 04/04/2018).
117. SENA. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA.
118. Seseni, L., Regnier, T., Roux, M. P., Mogale, E., Badenhorst, J. (2015). Control of *Fusarium spp.* causing damping-off of pine seedlings by means of selected essential oils. *Industrial Crops and Products*, 76, p. 329-332.
119. Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(3), p.308-313.
120. Smith, H. S. (1919). On some phases of insect control by the biological method. *Journal of Economic Entomology*, 12 (4), 288-292.
121. Smith, S. (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathol. Bull.* 16: p.97-120.
122. Stashenko, E. y Combariza, Y. (1998). Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis, Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander.

123. Stevens, P.F. Y COL. (2002). Plantas medicinales y aromáticas. II segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas.
124. Suárez, J.M. (1991). El medio y los recursos naturales. Consejería de cultura y medio ambiente. Junta de Andalucía.
125. Suleiman, M. N., Emua, S. A. (2009). Efficacy of four plant extracts in the control of root rot disease of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
126. Švecová, E., Colla, G., Crinò, P. (2017). Antifungal activity of *Boerhavia diffusa* L. extract against *Phytophthora* spp. in tomato and pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 148(1), p. 27-34.
127. Tabora Andrade, L. A. (2015). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippiaoriganoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).
128. Tello, J. C. y Lacasa, A. (1988): «La podredumbre del cuello y de las raíces», causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. Bol. San. Veg Plagas, 14: p.307-312.
129. Tello, J.C., Camacho, F. (2010). Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para la agricultura sostenible. Fundación Cajamar. P. 81-83.
130. Teruel, M. (2011). El sector del control biológico en España. Publicaciones Cajamar: informes y monografías, 33.
131. Theis, N. y Lerda, M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.*, 164: p.93-102.
132. Turlier, M.F., Epavier, A., Alabouvette, C. (1994). Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic *GUS*-marked hyphae. *Can J Bot*; 72: p. 1605-1612.
133. Vaillant, D. I., Romeu, C. R., Ramírez, R. (2015). Actividad fungicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* L. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 47-47.
134. Valera, D. L., Belmonte, L. J., Molina-Aiz, F. D., López, A., Camacho, F. (2015). The greenhouses of Almería, Spain: technological analysis and profitability. In *International Symposium on New Technologies and Management for Greenhouses-GreenSys 1170* (p. 219-226).
135. Van den Bosch, R., Messenger, P. S. y Gutiérrez, A. P. (1982). An introduction to biological control, Nueva York y Londres, Plenum Press, p.247
136. Van Driesche, R. G., Bellows, T. S. (1996). Parasitoids and predators of Arthropods and Molluscs. In: *Biological Control*. Chapman & Hall, New York. USA. p. 37-65.

137. Villa, A., Pérez, R., Morales, H. A., Basurto, M., Soto, J. M., Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), p. 194-205.
138. Villalobos, M. J. (1996). Plaguicidas de origen vegetal. Estado actual de la investigación.
139. Villarroel, B. (1991). Introducción a la botánica sistémica. Primera ed. Quito: Universitaria.
140. Viñuela, E., Jacas, J. (1993). Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas (No. Folleto 14296).
141. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 86.
142. Wilson, C. L., Ghaouth, A. El., Wisniewski, M. E. (1999). Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17: p.49-53.
143. Wilson, C.L., Wisniewski, M. (Eds.), (1994). *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.182
144. Yadeta, K.A., Thomma, B.P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 4: p. 97
145. Zacaroni, L. M., Cardoso, M. G., Souza, P. E., Pimentel, F. A., Guimarães, L. D. L., Salgado, S. P. (2009). Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimienta negra) sobre os fungos fitopatógenos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
146. Zeller, K.A., Summerell, B.A., Leslie, J.F. (2003). *GibberellaKonza* (*Fusarium konza*) sp. Nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberellafujikuoroi* species complex. *Mycologia.*, 95; p.943-954.
147. Zomlefer, W. (2004). *Guía de las Familias de plantas con flor*. Segunda ed. Zaragoza: Acribia.