

**“Potencial de los Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Origanum vulgare*) para el Control de *Fusarium* spp. en *Chenopodium quinoa* y su Efecto Sobre la Microbiota del Suelo”**

**Adriana Marcela Valero Posada**

**Universidad de Boyacá  
Facultad de Ciencias e Ingeniería  
Maestría en Ingeniería Ambiental  
Tunja  
2021**

**“Potencial de los Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Origanum vulgare*) para el Control de *Fusarium* spp. en *Chenopodium quinoa* y su Efecto Sobre la Microbiota del suelo”**

**Adriana Marcela Valero Posada**

**Trabajo de Grado para Optar al Título de  
Magíster en Ingeniería Ambiental**

**Director**

**Ingrid Rocío Fonseca Guerra  
PhD en Ciencias Biológicas**

**Codirector**

**Martha Elizabeth Benavides Rozo  
Mg. PhD. Biotecnología**

**Universidad de Boyacá  
Facultad de Ciencias e Ingeniería  
Maestría en Ingeniería Ambiental  
Tunja  
2021**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Firma presidente del Jurado**

---

**Firma del jurado**

---

**Firma del jurado**

**Tunja, 11 de noviembre del 2021**

“Únicamente el graduando es responsable de las ideas expuestas en el presente trabajo”.  
(Universidad de Boyacá. Programas de Postgrado. Reglamento Estudiantil. Acuerdo 646, 5 de diciembre de 2013, Art. 86).

Dedico esta tesis a mi padre quien siempre me incentivo a perseguir y cumplir mis sueños inculcando en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, A mis Hijos Juan Diego y Valentina quienes, con su amor, me han impulsado a continuar, a mis hermanas Luz Elena y Rosario por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, a mis sobrinas y amigos por estar conmigo en todo momento y a mi peludito de 4 patas Puqui.

### Agradecimientos

Doy gracias a Dios por la vida y por esta oportunidad de cursar y culminar mis estudios de maestría; agradezco a mi hermosa familia, que me ha apoyado en todo momento, sobre todo en mi crecimiento profesional y personal, en especial a mi padre quien en vida gracias a sus sabios consejos me impulso a estudiar y culminar mis metas académicas, a mis queridas hermanas que han sido mi fortaleza y mi voz de aliento en los momentos más difíciles, a mis hijos Valentina y Juan Diego quienes son el motor de mi vida, quienes me empujan a continuar y ser cada día una mejor persona y no rendirme, y para quienes me esfuerzo día a día para darles el mejor ejemplo posible como madre.

A mis tutoras la Dra. Ingrid Fonseca, por brindarme la oportunidad de trabajar en el proyecto de Quinoa y ser parte de su equipo de investigación, por todos sus aportes, su conocimiento, disciplina, paciencia y sobre todo no dejarme desfallecer y siempre tener una palabra de aliento para continuar. A mi codirectora la Dra. Martha Benavides por su cordial apoyo, su guía y estar siempre disponible para brindarme su conocimiento, orientación y sobre todo su amistad.

Agradezco a la Dra. Andrea Wilches directora del programa de Maestría en Ingeniería Ambiental quien desde siempre nos ha acompañado en el proceso de formación. Agradezco en especial a la Universidad de Boyacá por brindarme los espacios y el apoyo por medio de sus docentes en el transcurso de la maestría quienes han aportado valiosas enseñanzas y experiencias.

Agradecimiento al “Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento Para la Ciencia, La Tecnología y La Innovación Francisco José de Caldas”, Min ciencias y a la Universidad de Boyacá por los recursos destinados para la ejecución del proyecto.

Agradezco al grupo de Investigación en Gestión Ambiental de la Universidad de Boyacá.

Agradecimiento al equipo de investigación del laboratorio de Química de la Universidad de Boyacá, en especial a los doctores Nayda Patricia Arias, Juan Pablo Ortiz y Sergio Armando Loza por su apoyo y dirección para el desarrollo de la fase experimental.

Gracias al departamento de Biología y Microbiología a la Dra. Mayra Beltrán Pineda por brindar su apoyo.

## Contenido

	Pág.
Introducción.....	21
1. Marco Teórico .....	24
1.1. Antecedentes.....	24
1.2. Descripción Botánica y Taxonómica.....	25
1.3. Taxonomía.....	27
1.4. Importancia del Cultivo y Variedades en Colombia .....	27
1.5. Enfermedades por <i>Fusarium</i> spp.....	30
1.5.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
1.5.2. <i>Fusarium cerealis</i> y <i>Fusarium graminearum</i> .....	32
1.5.3. <i>Fusarium incarnatum</i> .....	32
1.5.4. <i>Fusarium culmorum</i> .....	33
1.6. Control de Enfermedades de la Quinua.....	33
1.6.1. Control de fitopatógenos con aceites esenciales.....	34
1.6.2. Obtención de aceites esenciales (AE).....	36
1.6.2. Aceite esencial (AE) de tomillo.....	37
1.6.3. Aceite esencial de Orégano.....	38
1.7. Control Químico.....	38
.....	40
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo General.....	41
2.2. Objetivos Específicos .....	41
3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	42
3.1. Introducción.....	42
3.2. Metodología.....	42
3.2.1. Obtención del extracto etanólico de tomillo por el método de Soxhlet y evaluación de su actividad antifúngica.....	42
3.3. Evaluación de la Actividad Antifúngica y Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de Aceites de Tomillo y Orégano Comerciales .....	44

3.3.1. Evaluación de la actividad antifúngica de aceites comerciales de tomillo y orégano.....	45
3.4. Resultados.....	47
3.4.1. Resultados de la evaluación del extracto etanólico por Soxhlet.....	47
3.4.2. Resultados concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de tomillo y orégano.....	47
3.4.3. Análisis estadístico.....	48
3.4.4. Análisis de la composición de los aceites esenciales empleados.....	51
3.5. Evaluación de la Efectividad de Fungicidas Químicos para el Control de <i>Fusarium spp.</i> y <i>Alternaria sp.</i> ....	54
3.5.1. Metodología.....	54
Figura 13. Micrografías de los resultados de los tratamientos químicos vs orgánicos .....	61
3.6. Discusión .....	64
3.7. Recomendaciones .....	65
4. Evaluación del Uso de Aceites Comerciales de Tomillo y Orégano en el Tratamiento y Desinfección de Semillas.....	66
4.1. Introducción.....	66
4.2. Metodología.....	66
4.3. Resultados.....	69
4.3.1. Análisis estadístico.....	70
4.4. Discusión .....	73
4.5. Recomendaciones .....	74
5. Efecto de la Aplicación de los Tratamientos de Aceites Esenciales de Orégano y Tomillo Sobre el Crecimiento de Hongos Filamentosos en Suelo.....	75
5.1. Introducción.....	75
5.2. Metodología.....	76
5.3. Resultados.....	78
5.4. Discusión .....	80
5.5. Recomendaciones .....	82
Conclusiones.....	87
Referencias .....	89

Anexos..... 109

**Lista de Tablas**

	Pág.
Tabla 1. Propiedades nutricionales del grano de quinua .....	25
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la quinua.....	27
Tabla 3. Principales variedades de quinua cultivadas en Colombia .....	29
Tabla 4. Hongos patógenos del complejo <i>Fusarium</i> .....	31
Tabla 5. Componentes de los aceites vegetales con propiedades antifúngicas .....	34
Tabla 6. Identificación y origen cepas del estudio .....	46
Tabla 7. Concentraciones inhibitorias de los aceites de tomillo y orégano .....	48
Tabla 8. Resultados del análisis del aceite esencial de orégano por cromatografía acoplada por espectrometría de masas .....	52
Tabla 9. Resultados del análisis del aceite esencial de tomillo por cromatografía acoplada por espectrometría de masas .....	53
Tabla 10. Fungicidas químicos empleados y mecanismos de acción.....	55
Tabla 11. Tratamientos químicos probados con concentraciones empleadas .....	58
Tabla 12. Agrupación de datos por tratamiento en suelo .....	84

### Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Fases fenológicas del cultivo de la quinua .....	26
Figura 2. Estructura química de metabolitos activos de aceites esenciales de tomillo y orégano .....	35
Figura 3. Compuestos con acción antifúngica del tomillo y orégano .....	38
Figura 4. Representación esquemática del problema .....	40
Figura 5. Técnica empleada para extracción por Soxhlet.....	43
Figura 6. Técnica de difusión en pozo empleada .....	46
Figura 7. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones tomillo extraído por Soxhlet	47
Figura 8. Efecto inhibitor del crecimiento fúngico del aceite esencial de tomillo .....	49
Figura 9. Efecto inhibitor del crecimiento fúngico del aceite esencial de orégano .....	50
Figura 10. Ensayo comparación de las dosis mínimas inhibitorias .....	58
Figura 11. Porcentajes de inhibición de los fungicidas químicos en 7 cepas de fitopatógenos .....	59
Figura 12. Porcentaje de inhibición comparativo .....	60
Figura 13. Micrografías de los resultados de los tratamientos químicos vs orgánicos .....	61
Figura 14. Efecto de fungicidas sobre <i>F. cerealis</i> .....	62
Figura 15. Efecto de fungicidas sobre <i>F. equiseti</i> .....	63
Figura 16. Efecto de fungicidas sobre <i>F. oxysporum</i> .....	64
Figura 17. Efecto de fungicidas sobre <i>F. graminearum</i> .....	65
Figura 18. Efecto de fungicidas sobre <i>F. incarnatum</i> .....	66
Figura 19. Efecto de fungicidas sobre <i>F. culmorum</i> .....	67
Figura 20. Efecto de fungicidas sobre <i>A. alternata</i> .....	68
Figura 21. Toxicidad de los tratamientos sobre las plántulas de Quinua a los 7 días de germinación .....	71
Figura 22. Siembra de semillas y determinación de incidencia de hongo e índices fisiológicos .....	72
Figura 23. Prueba en semilla concentraciones seleccionadas orgánicos y químicos .....	73

Figura 24. Índices fisiológicos con tratamientos de desinfección previos en aceites de tomillo y orégano (48 horas) .....	74
Figura 25. Porcentaje de germinación en semilla con tratamientos de desinfección previa con aceites esenciales de tomillo y orégano 48 horas .....	75
Figura 26. Porcentaje de geminación en semilla con tratamientos de desinfección previa con aceites esenciales de tomillo y orégano 96 horas .....	76
Figura 27. Índices fisiológicos para tratamiento en desinfección en semilla con aceites de tomillo y orégano 48 y 96 horas .....	77
Figura 28. Metodología empleada para conteo de colonias en suelo .....	82
Figura 29. Prueba de Tukey para conteo de colonias en suelo .....	83
Figura 30. Intervalos de recuento de colonias en suelo .....	83

### Lista de anexos

	Pág.
Anexo A. Anteproyecto “Actividad del Aceite Esencial de Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) para el Control de <i>Fusarium</i> sp. en <i>Chenopodium quinoa</i> y su Efecto sobre la Microbiota del Suelo”.	110
Anexo B. Resultados de porcentajes inhibición de aceites esenciales de tomillo y orégano con cepas de estudio	135
Anexo C. Determinación de la CMI de los aceites esenciales de tomillo y orégano	136
Anexo D. Efecto inhibidor del crecimiento fúngico del aceite esencial de tomillo	137
Anexo E. Efecto inhibidor del crecimiento fúngico del aceite esencial de orégano	138
Anexo F. Resultados de los porcentajes de inhibición de los fungicidas químicos y controles	139
Anexo G. Porcentaje de inhibición del crecimiento para los dos fungicidas que mostraron efectividad, 50% diluida, al 150%, concentrada y dosis recomendada	141
Anexo H. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. cerealis</i>	142
Anexo I. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. equiseti</i>	143
Anexo J. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. oxisporum</i>	144
Anexo K. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. graminearum</i>	145
Anexo L. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. incarnatum</i>	146
Anexo M. Efecto de fungicidas t-Student <i>F. culmorum</i>	147
Anexo N. Efecto de fungicidas t-Student <i>A. alternata</i>	148
Anexo O. Índice de germinación en PDA 48 horas	149
Anexo P. Índice de germinación 96 horas con cada tratamiento	150
Anexo Q. Análisis de varianza en diferencia de tiempo 48 y 96h para desinfección en semilla (epicótilo naciente)	151
Anexo R. Análisis de varianza en diferencia de tiempo 48 y 96h para desinfección en semilla (primordios foliares)	152
Anexo S. Comparativo de porcentajes de germinación 48 y 96h	153
Anexo T. Análisis de varianza en semillas 48 y 96h epicótilo desarrollado	154

Anexo U. Dilución en suelo para recuento de colonias ..... 155

## Glosario

***Aceite Esenciales (AE):*** son compuestos volátiles, naturales, complejos caracterizados por un fuerte olor y obtenidos de plantas aromáticas y medicinales, que contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras (Matiz *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2015).

***Agricultura Orgánica:*** conocida también como agricultura alternativa, biológica, natural es un sistema de producción que, mediante el manejo racional de los recursos naturales, sin la utilización de productos de síntesis química, brinde alimentos sanos y abundantes, mantenga o incremente la fertilidad del suelo y la diversidad biológica (Cancino-Méndez *et al.*, 2018; Lorenz & Lal, 2016).

***Agroquímicos:*** engloban a todos los insumos de síntesis química aplicados al campo, es decir fertilizantes y plaguicidas (Doménech, 2019).

***Bioplaguicidas:*** son un conjunto de plaguicidas derivados de materiales naturales como animales, plantas y microorganismos (bacterias, virus, hongos, y nematodos). Incluyen plaguicidas microbianos, plantas protectoras incorporados y pesticidas bioquímicos. Estos compuestos considerados respetuosos con el medio ambiente porque son menos tóxicos, se descompone fácilmente y se requiere en pequeñas cantidades (Abubakar *et al.*, 2019).

***Carvacrol:*** es un compuesto fenólico, se considera uno de los principales componentes de ciertos aceites esenciales (AE) que ejercen actividad antimicrobiana. Estudios que se han realizado, han demostrado que el carvacrol tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra casi todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas analizadas (Sökmen *et al.*, 2004); además de esta actividad antibacteriana, el carvacrol se ha descrito como antifúngico (Oussalah *et al.*, 2006; Chami *et al.*, 2005), antitoxigénico, insecticida y antiparasitario (Siroli, Lorenzo *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2013).

**Colonia de bacterias:** Conjunto de bacterias de la misma especie que se acumulan de forma característica (Beltrán & Castellanos, 2016).

**Destilación por arrastre de vapor:** La destilación por arrastre de vapor posibilita la purificación o el aislamiento de compuestos de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura (siempre inferior a 100°C). Es una técnica de destilación muy útil para sustancias de punto de ebullición muy superior a 100 °C y que descomponen antes o al alcanzar la temperatura de su punto de ebullición (Nitsche & Gbadamosi, 2017).

**Diluciones:** es la disminución de concentración de una sustancia en una solución. Se prepara una solución madre, que se encuentra en una concentración mayor de la que se utiliza (Beltrán & Castellanos, 2016).

**DMSO:** cuya sigla es dimetilsulfóxido y corresponde es un líquido orgánico incoloro de fórmula química es  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$  que contiene sulfóxido, usado como disolvente de grasas y aceites (Beltrán & Castellanos, 2016).

**Género *Fusarium*:** comprende muchas especies de hongos filamentosos ampliamente distribuidos a nivel mundial. Varios miembros de este género pueden causar enfermedades en plantas, animales y humanos. Diferentes especies de *Fusarium* causan enfermedades en algunos de los más importantes cultivos, como arroz, maíz, trigo, frijol, soya, calabaza, melón y sandía, entre otros (Smith, 2007).

**Hidrodestilación (HD):** es el método de extracción de aceites esenciales que se basa en la destilación heterogénea (Peredo *et al.*, 2009), este método utiliza vapor generado por calentamiento para separar los compuestos volátiles de los materiales vegetales, para luego condensarlos y obtener el aceite esencial (Peng *et al.*, 2021). Generalmente, el agua sólo hierve cuando se calienta a 100 °C bajo presión normal para que se genera vapor para lograr la separación de los aceites esenciales, requiere entre 3 a 4 horas de destilación (Liu *et al.*, 2011).

**Hongo:** son un grupo muy grande, diverso y heterogéneo de organismos que se encuentran en prácticamente todos los nichos ecológicos. Entre los géneros más comúnmente aislados en el interior de los edificios se encuentran *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria*. (Li & Yang, 2004).

**Orégano:** (*Origanum vulgare*), es una planta herbácea y perenne originaria de Europa central y Asia occidental, cuyas hojas y sus aceites esenciales se consideran fotogénicos, diversas investigaciones han evaluado la utilización de los AEO como promotores de crecimiento, antibióticos naturales y mejoradores de la calidad de la carne, pero es conocida. Es generalmente utilizada como condimento alimenticio, dentro de sus propiedades terapéuticas el orégano se utiliza como: antioxidante, antibacteriano, antimicótico, antiséptico, tónico, digestivo, anticancerígeno, antiinflamatorio, emenagogo, antiespasmódico, expectorante, diurético, emoliente, vulnerario (Han & Parker, 2017).

**PDA:** es un medio de cultivo sólido, no selectivo en el que pueden crecer tanto especies bacterianas como fúngicas, pero su uso está indicado especialmente para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras se preparan a partir de infusión de patata y dextrosa (Beltrán & Castellanos, 2016; Gil, 2019).

**Pesticidas o Plaguicidas:** Son compuestos químicos o biológicos empleados prevenir, controlar, destruir, repeler o atraer cualquier organismo biológico considerado plaga. destruir o controlar plagas, incluidos insectos, hongos, roedores o especies de plantas no deseadas que causan daños durante la producción y el almacenamiento de cultivos (Abubakar et al., 2019) Doménech, 2019).

**Pesticida Inorgánico:** corresponden a una serie de compuestos de elementos tóxicos de carácter metálico y no metálico; algunos son insecticidas fluorados, fungicidas compuestos principalmente por azufre y cobre y herbicidas (George et al., 2014).

**Pesticida Orgánico** son aquellos pesticidas que se obtienen a través de fuentes naturales. Incluyen compuestos fitoquímicos como alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos, que tienen un potencial plaguicida demostrado (George *et al.*, 2014).

**Quinoa:** (*Chenopodium quinoa Willd*) perteneciente a la subfamilia *Chenopodioideae* de las amarantáceas porque, es considerada es un “pseudo cereal” ya que no pertenece a la familia de las gramíneas en que se incluyen los cereales "tradicionales", pero debido a su alto contenido de almidón su aprovechamiento y utilización es como la de un cereal (SEPHU, n.d.).

**Quinoa orgánica:** corresponde a la quinoa obtenida por método de producción exclusivamente natural, donde es restringido el uso de aditivos o sustancias que contienen materiales sintéticos, tales como pesticidas, herbicidas y/o fertilizantes artificiales (Cely & Ducón, 2015).

**Suelo nativo:** se define como cualquier tipo de suelo que no sea material de relleno, que se encuentre de forma natural y sea más representativo de la litología y geología localizada del subsuelo; cuando se labra un suelo, cambiamos su biogeoquímica, de tal manera que un suelo cultivado se parece al original nativo, pero sus características han sufrido cambios enormes y profundos (González *et al.*, 2011).

**Timol:** (2-isopropil-5-metilfenol) es un monoterpeno fenólico que se encuentra como componente de varios aceites esenciales, principalmente de orégano, tomillo y ajedrea, se encuentra como parte de la formulación de diversos medicamentos. Hay numerosos estudios que muestran la eficacia de este compuesto como bactericida, fungicida, insecticida, nematocida, y desinfectante en general (Sofía *et al.*, 2015).

**UFC:** (Unidades formadoras de colonias), indica la cantidad de microorganismos vivos en un líquido, determinado por el número de colonias individuales, describe el número de células de un organismo en el agua. Estos pueden ser bacterias u hongos (Beltrán & Castellanos, 2016).

## Resumen

Valero Posada, Adriana Marcela

Potencial de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) para el Control de *Fusarium* spp. en *Chenopodium quinoa* y su efecto sobre la Microbiota del Suelo / Adriana Marcela Valero Posada. - - Tunja : Universidad de Boyacá, Facultad de Ciencias e Ingeniería, 2021.

155 p. : il. + 1 CD ROM. - - (Trabajos de Grado UB, Maestría en Ingeniería Ambiental; n°. )

Trabajos de Grado (Magister en Ingeniería Ambiental). - - Universidad de Boyacá, 2021.

El complejo *Fusarium* sp. causa graves problemas en los cultivos, provocando pudrición de raíces y tallos, y por lo tanto grandes pérdidas económicas para los productores. Con el propósito de buscar un método sostenible de control de este fitopatógeno, que permita el mantenimiento de ecosistemas saludables y la gestión sostenible del suelo, el agua y los recursos naturales, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre especies previamente caracterizadas del género *Fusarium*: *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. oxisporum*, rescatadas en cultivos de quinua del departamento de Boyacá. Inicialmente para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales, se realizó mediante una prueba *in vitro* de difusión en pozo haciendo uso de diluciones seriadas (1:10) en dimetilsulfóxido (DMSO) de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  mL AE/mL, se sembraron 0,1 mL de cada una de las diluciones en cajas que contenían medio PDA y llevadas a incubación por 7 días a  $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Para comparar la efectividad de dichos aceites con fungicidas comerciales de uso habitual en el campo, se evaluó la efectividad de los mismos en condiciones *in vitro*. Los principios activos de los fungicidas evaluados correspondieron a validamicina (Validacin®), compuestos de amonio cuaternario (Sanaráz®), carboxin + captan (Vitavax®), difenoconazol (Score®), metil-2-benzimidazol carbamato (Carbendazim®), yodo polaxamer (Agrodine®), metiram y sulfato de cobre + cal hidratada (Caldo Bordelés®), los cuales fueron probados en las concentraciones recomendadas por las casas fabricantes y 50% más diluidas o concentradas. Los resultados permitieron determinar que la dosis mínima inhibitoria para el aceite de tomillo fue de  $10^{-2}$  mL AE/mL; para el aceite esencial de orégano  $10^{-3}$  mL AE/mL. Las diluciones mayores no lograron porcentajes de inhibición significativos. En las lecturas realizadas a los 7 días de incubación para los fungicidas comerciales, se evidenció la inhibición de las cepas con los principios activos metil-2-benzimidazol carbamato (Carbendazim) y difenoconazol (Vitavax), sin embargo, la respuesta después de 3 semanas se mantuvo únicamente con el metil-2-benzimidazol carbamato, ya que con difenoconazol se observó un 100% de crecimiento de las colonias.

Con el objetivo de determinar la eficiencia de los aceites esenciales y los dos fungicidas comerciales con mayor inhibición de crecimiento fúngico en la desinfección de semillas, se tomaron 50 semillas quinua variedad “Amarilla de Marangani”, las cuales se trataron con aceite puro y diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  de aceites de tomillo y orégano, además se probó Carbendazim (metil-2-benzimidazol carbamato) y Vitavax (difenoconazol) en las

concentraciones recomendadas por las casas comerciales. Posterior al tratamiento las semillas fueron sembradas en medio PDA. Se evaluó el crecimiento fúngico y la toxicidad de los aceites y los compuestos comerciales, a las 48 y 98 horas, determinando que los aceites esenciales puros y en concentraciones  $10^{-1}$  mL AE/mL y  $10^{-2}$  mL AE/mL inhiben el desarrollo del embrión. Finalmente se evaluó el impacto de las aplicaciones sobre la microbiota funcional del suelo nativo. A 15 g se suelo nativo sin esterilizar se adicionó 5mL de aceites esenciales de tomillo y orégano de las concentraciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  mL AE/mL y se probó la eficacia de los fungicidas Carbendazim y Vitavax a concentración de 0,4 g/L y 3g/L respectivamente. Los suelos tratados se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 72 horas antes del recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para determinar la homogeneidad de los datos en la prueba de obtención de las CMI, y desinfección de semilla, se realizó un análisis de varianza, seguido de la prueba t-Student para determinar si existen diferencias significativas en las medidas de las respuestas de los tratamientos. Los datos obtenidos del ensayo en suelo se analizaron con la prueba de Tukey empleando el software Minitab.

Frente a compuestos tradicionalmente usados como amonio cuaternario (Sanaraíz®), carboxin + captan (Vitavax®), yodo polaxamer (Agrodine®), metiram y sulfato de cobre + cal hidratada (Caldo Bordelés®), para los cuales no se observó inhibición de ninguno de los aislados fúngicos, los tratamientos con aceites esenciales pueden ser promisorios en el control del complejo *Fusarium* y *Alternaria* en quinua. Se recomienda realizar pruebas en campo para evaluar la efectividad y alcance de estos tratamientos.

## Introducción

La quinua es un cultivo ancestral de un valor nutritivo importante por su alto contenido de proteínas, aminoácidos y ácidos grasos esenciales (Barriendos, 2020), y aunque en Colombia cada día se expande, sus cultivos están constantemente expuestos a plagas y a enfermedades principalmente producidas por hongos y cuya incidencia depende del ambiente donde se cultive. La presencia del género *Fusarium* y sus metabolitos secundarios que pueden contaminar a los granos, frutos y tejidos vegetales de consumo humano y animal son un problema grave ya que afectan la calidad de los alimentos (Perczak *et al.*, 2020). Dentro de los hongos fitopatógenos y filamentosos, este hongo habitante principalmente del suelo está constituido por muchas especies que causan serias enfermedades a las plantas alrededor del mundo (Agrios, 2005). Su taxonomía es bastante compleja y ha sufrido diversos cambios desde las primeras descripciones hechas por Link en 1803 (Leslie J F, 2006); está ampliamente distribuido no solo en suelo sino también en las plantas generando pudrición tanto a nivel radicular como de semilla en períodos preemergentes. Las principales especies patógenas de este género cosmopolita corresponden a *F. oxysporum* que causa marchitez foliar; *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* ampliamente descritas en gramíneas y *F. solani* causante de pudriciones a nivel radicular (Figuroa-Rivera *et al.*, 2010).

Para el control de estas enfermedades producidas por hongos, así como por otros microorganismos en campo, existe un amplio grupo de sustancias químicas de naturaleza inorgánica entre las que se encuentran los fungicidas, estas juegan un papel importante en la agricultura moderna, aunque su empleo continuo puede ocasionar numerosos problemas e influir sobre los microorganismos benéficos del suelo (Chaves-Bedoya *et al.*, 2013). Afectando la actividad enzimática de especies funcionales disminuyendo las poblaciones e influenciando negativamente la mayoría de las reacciones bioquímicas, tales como la mineralización de la materia orgánica (M.O), la nitrificación, la desnitrificación, la amonificación, las reacciones de oxidorreducción, y la metanogénesis (Hussain *et al.*, 2009). Dicha microbiota posee varias funciones entre las que se incluye la descomposición de la materia orgánica, la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico, la descomposición de minerales primarios, mineralización del N-orgánico (nitrificación), solubilización de P, y formación de asociaciones simbióticas para mejorar la

captación de nutrientes vegetales, ampliar la protección de las plantas contra patógenos y descomposición de contaminantes (biorremediación) (Ramírez *et al.*, 2013).

Los fungicidas de origen químico se clasifican en: de contacto (protectores) o sistémicos (penetrantes); con función preventiva (profiláctico) o curativa (erradicante) y con uno o múltiples puntos de acción y aunque suelen ser imprescindibles en el establecimiento de cultivos, algunos de sus compuestos han sido identificados como peligrosos a largo plazo para el ambiente y están prohibidos o rigurosamente restringidos por convenios internacionales para el control de plagas y enfermedades, ya que traen como consecuencia intoxicación crónica en el hombre (del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014), razón por la cual es indispensable desarrollar nuevas tecnologías eficaces para el control de enfermedades fúngicas de los cultivos sin efecto contaminante y sin perjudicar la salud humana (Cruces & Callohuri, 2016).

Las aplicaciones continuas de fungicidas sintéticos a los cultivos, conllevan a su bioacumulación, tardando años en descomponerse en productos menos tóxicos (Cui *et al.*, 2018) afectando fuentes hídricas, acumulándose en plantas las cuales posteriormente pueden ser consumidas por animales y humanos y desmejorando la calidad del suelo (Oves *et al.*, 2017) ya que la incorporación de dichos compuestos incrementa los niveles de nitratos y amonios modificando la población de bacterias.

Colombia se posiciona como el noveno entre los 10 países a nivel mundial con mayor uso pesticidas, con el empleo de 52.501.83 toneladas de agroquímicos y el octavo lugar en el uso de fungicidas y bactericidas con un total de 19.110.41 toneladas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - FAO, 2020)- Además, según datos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en el país predomina el uso de plaguicidas azólicos, encontrándose disponibles comercialmente 32 productos con este tipo de sustancias; esto sugiere una amenaza potencial para la salud humana y ambiental al representar un alto riesgo para el desarrollo de resistencia microbiana a los antimicóticos o propiciar posibles intoxicaciones por ingestión de agua y alimentos contaminados con estas (Zubrod *et al.*, 2019).

Respecto a los hongos más limitantes de cultivo y que a menudo requieren el uso importante de fungicidas se encuentra *Fusarium spp.*, del cual en el cultivo de quinua en Colombia los reportes son escasos; sin embargo, dentro de los estudios realizados por el grupo de investigación de Gestión ambiental de la Universidad de Boyacá; Chiquillo y colaboradores

(2019), muestrearon 4 parcelas ubicadas en los municipios de Tibasosa, Soracá, Tuta y Siachoque, reportando mayor incidencia de este género.

Teniendo en cuenta la necesidad prioritaria en el control de este fitopatógeno, en el presente trabajo de investigación, se determinó la efectividad de los aceites esenciales de tomillo y orégano como biofungicidas, para el control de este moho en la variedad de quinua “Amarilla de Marangani”. Para esto se evaluó la respuesta de especies aisladas de cultivos del departamento correspondientes a *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. oxisporum*, además de *Alternaria alternata*, determinando inicialmente la dosis *in vitro* mediante la técnica de halos de inhibición, seguido del bioensayo donde se probaron las concentraciones más eficaces para determinar la efectividad de los tratamientos en semilla y se finalmente se evaluó el efecto de su aplicación sobre el microbiota total del suelo, buscando obtener un producto, amigable con el ambiente, de fácil manejo y capaz de mantener la diversidad microbiana del suelo.

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Antecedentes

La quinua es un pseudocereal andino originario del lago Titicaca de Perú y Bolivia (Rojas *et al.*, 2011), distribuida geográficamente en los países de Bolivia, Perú, Chile, Ecuador, Colombia y Argentina con diferenciación entre ecotopos tanto en el altiplano y en los valles. Con la llegada hispana a América se introdujeron otros cultivos como los cereales, muchos de los cuales desplazaron a los tradicionales, razón por la cual la quinua pasó a constituirse en un cultivo marginal practicado por algunas comunidades campesinas de la zona andina (Sánchez, 2019).

Esta planta es considerada un alimento de alta calidad por su aporte nutricional y aunque ha sido poco cultivado en Colombia (Apaza *et al.*, 2013), debido a la falta de promoción en el consumo, esta podría reemplazar el uso de alimentos de origen animal, cereales de alta demanda y productos lácteos (García-Parra *et al.*, 2017), además de ser una alternativa valiosa de diversificación para las regiones cerealeras. De acuerdo con (Pando & Castellanos, 2017) este es un cultivo necesario para la humanidad y podría ser la solución a los problemas de seguridad alimentaria mundial y actualmente ha venido apareciendo como un alimento nuevo en los diferentes supermercados, reemplazando o complementando otros granos ya consumidos (Apaza *et al.*, 2013).

La quinua es un alimento completo debido a su aporte integral a la demanda de la nutrición humana; supera los requerimientos estándar y presenta compuestos de alto valor funcional mostrando ventajas con respecto a otros cereales y granos pues posee proteínas y aminoácidos esenciales, y tiene un aporte proteico significativo (11,2%) con un alto porcentaje de proteínas solubles (10,04%). Además, se describe la presencia de un 45% de azúcares totales, 16% de azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa), 33% de almidón y 4% de lípidos, entre otros compuestos de interés alimentario (Vargas-Zambrano *et al.*, 2019; Mendoza, 2019). La quinua posee cualidades superiores sobre los productos de origen animal en cuanto a la presencia de hierro, el cual previene la anemia y zinc, el cual mejora el sistema inmunológico, fibra soluble que reduce el colesterol, disminuyendo el riesgo de cáncer y mejorando la asimilación de vitaminas y minerales (Koziol' Latinreco, 1992). En promedio, este pseudocereal es mejor fuente de minerales en relación con la mayoría de los granos (Tabla 1).

Tabla 1.

*Propiedades nutricionales del grano de quinua*

Valor nutricional	Quinua	Trigo	Maíz	Arroz
Proteínas	13.81	11.50	10.20	7.40
Grasa g/100g	6,3	2,3	4,7	2,3
Carbohidratos	69	78,4	81	80,4
Fe	10.90 -	3.30	2,1	0,7
Zn	7.47	4.70	2.90	0,6
*contenido de macronutrientes de la quinua y en alimentos seleccionados por cada 100g de peso seco				

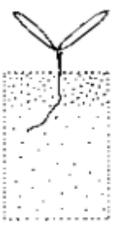
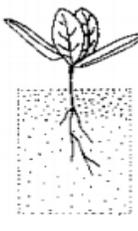
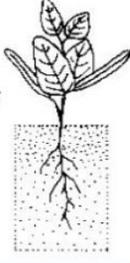
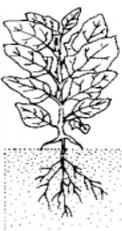
Fuente: Koziol' Latinreco, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35–68.

## 1.2. Descripción botánica y taxonómica

La quinua es una planta herbácea anual, dicotiledónea con características propias en su morfología, coloración y comportamiento dependiendo de las zonas agroecológicas donde se cultiva. Presenta diferenciación y plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4.000 msnm; muy resistente a factores edafoclimáticos adversos como sequía, heladas, salinidad de suelos entre otros que afectan al cultivo. Asimismo, prospera en suelos arenosos hasta los arcillosos, la coloración de la planta es también variable con los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillo, anaranjado granate y demás gamas que se puedan diferenciar (Apaza *et al.*, 2013; Mendoza, 2019).

La planta de quinua puede llegar a crecer de 1 a 3 metros de altura, su período vegetativo varía desde 90 hasta 240 días, se adapta a suelos ácidos de pH 4,5, hasta alcalinos con pH de 9,0. (Apaza *et al.*, 2013). Las semillas pueden germinar con rapidez, incluso a unas pocas horas de ser expuestas a la humedad. Sus raíces alcanzan un máximo de 30 centímetros de profundidad, son del tipo 'pivonte' (crecen verticalmente hacia abajo), tienen buena estabilidad y son altamente resistentes a la sequía gracias a su vigorosidad, profundidad, fibrosidad y a ser bastante ramificadas (Arichávala *et al.*, 2020).

Las hojas presentan coloración variable del verde al rojo, con diferentes tonalidades y con un tamaño que alcanza hasta los 15 centímetros de largo y 12 centímetros de ancho. Las hojas están cubiertas por cristales (de oxalato de calcio) que captan la humedad del ambiente por las noches, poseen flores muy pequeñas que alcanzan hasta 3 milímetros y carecen de pétalos; y los frutos son redondos y levemente ensanchados hacia el centro (Figura 1) (Salcedo, 2014).

			
<b>Emergencia</b>	<b>Dos hojas verdaderas</b>	<b>Cuatro hojas verdaderas</b>	<b>Seis hojas verdaderas</b>
Aparecen las dos hojas cotiledónales en la superficie del suelo.	Aparecen dos hojas verdaderas extendidas	Se observa dos pares de hojas verdaderas extendidas y aún están presentes las hojas cotiledónales, de color verde	Se aprecian tres pares de hojas verdaderas extendidas, las hojas cotiledónales se tornan de color amarillento.
			
<b>Ramificación</b>	<b>Panoja</b>	<b>Floración</b>	<b>Grano lechoso a pastoso y maduración</b>

Se nota ocho hojas verdaderas extendidas. Las hojas cotiledónales se caen y dejan cicatrices en el tallo.	Emergen las primeras panojas para sobresalir con claridad por encima de las hojas de la planta.	Se abren las primeras flores de la parte apical de la panoja.	Los granos al ser presionados presentan un líquido lechoso.
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

Figura 1. Fases fenológicas del cultivo de la Quinua, Fuente. Yzarra, W., & López, F. (2011). Manual de Observaciones Fenológicas (p. 98). Ministerio de medio ambiente, Dirección general de agrometeorología (SENAMHI). Recuperado de <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/01401SENA-11.pdf>

### 1.3. Taxonomía

La quinua es una especie que se clasifica (Tabla 2)

Tabla 2

#### *Clasificación taxonómica de la Quinua*

<b>Reino:</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Phylum</b>	<i>Streptophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Caryophyllales</i>
<b>Familia</b>	<i>Chenopodiaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Chenopodium</i>

Fuente: Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020; baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187

### 1.4. Importancia del cultivo y variedades en Colombia

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en informes anuales del 2020 y 2021, enfatizada en la necesidad de generar cambios importantes en el sistema alimentario global ya que la agricultura debe enfrentar el doble desafío de alimentar a una población en crecimiento con una demanda paulatina de carne y dietas ricas en calorías (FAO del 2020; FAO, 2021). La globalización, el cambio climático y los nuevos hábitos

alimenticios han generado otras preferencias a la hora de hablar de alimentos a nivel mundial; entre las tendencias que han tenido mayor aceptación y posee gran potencial está el consumo y comercialización de productos orgánicos (Graziano da Silva *et al.*, 2021). El-Hage, N y Hattam (2002), definen la agricultura orgánica como un sistema de suministro de alimentos respetuoso con el ambiente y la sociedad; dentro de las alternativas para enfrentar esta problemática, este es un sistema destinado a producir alimentos con un impacto mínimo en los ecosistemas, animales o humanos que a menudo se propone como una solución viable por su sistema de protección sostenible (Seufert *et al.*, 2012).

Dichos sistemas se han venido consolidando a nivel nacional e internacional, permitiendo un mayor desarrollo del sector agrícola, disminuyendo el impacto ambiental por el no uso de fertilizantes y otros productos químicos, otorgando beneficios para la salud de productores y consumidores.

En la actualidad, la quinua orgánica se encuentra dentro de los productos con mayor demanda, siendo Estados Unidos, Canadá y Francia, los principales importadores alcanzando un consumo del 55% de la producción reportada (Duque *et al.*, 2016). Entre los principales productores figuran Bolivia y Perú quienes para el año 2013, de acuerdo con los datos de “Trade Map”, tenían una participación del 84% de las exportaciones en el mundo (Brazile D., Bertero T., 2013). En Colombia, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), identificó algunos de los centros de producción más importantes de quinua en Cundinamarca, Boyacá, Cauca y Nariño (Rojas *et al.*, 2011), en los cuales se reactivó la producción desde el año 2007 pero con la aplicación de labores culturales tradicionalmente usadas en otros cultivos como la papa y el maíz (Duque *et al.*, 2016), desconociendo la posibilidad de establecer cultivos de manera orgánica, entre las principales variedades sembradas en Colombia está la variedad Piartal, Blanca de Jericó, Tunkahuan, Aurora y Amarilla de Marangani (Tabla 3).

Tabla 3.

*Principales variedades de quinua cultivadas en Colombia*

<b>Variedades de Quinua cultivada y características.</b>	<b>Lugar de siembra</b>	<b>Origen</b>
Piartal: De color púrpura, el grano es blanco opaco, de aproximadamente 2 mm de diámetro (Delgado <i>et al.</i> , 2009)	Nariño, Boyacá	Ecuador
Variedad 'SL47' Variedad precoz, de porte bajo, ramas comprimidas y panoja de color blanco rosado. Seleccionado por la facultad de ciencias agrícolas, Universidad de Nariño;(Sañudo <i>et al.</i> , 2005)	Nariño, Cauca	Nariño
Blanca de Jericó: De porte alto, semitardía, con ramificación abierta desde la base y panoja de color blanco rosado (Sañudo <i>et al.</i> , 2005)	Boyacá	Boyacá Colombia
Aurora: Variedad dulce, posee bajo contenido de Saponinas (Sañudo <i>et al.</i> , 2005)	Boyacá	Boyacá
Blanca de Chivatá: Variedad dulce, posee bajo contenido de Saponinas. (Sañudo <i>et al.</i> , 2005) (Casas-Forero <i>et al.</i> , 2018)	Boyacá	Boyacá
Tunkahuan: De color púrpura y panoja amarillo-anaranjada, glomerulada, grano blanco, tamaño de grano de 1,7 a 2,1 mm, contenido de saponina de 0,06 y 15,73% de proteína (Casas-Forero <i>et al.</i> , 2018)	Nariño	Ecuador
Aurora dulce Nariño-AN (Guerrero-López, 2018)	Nariño	Nariño
Blanca dulce Soracá-BS (Guerrero-López, 2018)	Boyacá	Boyacá
Amarilla de Maranganí: Sabor levemente amargo, necesitándose un lavado previo al consumo y alto contenido de saponinas (Garrido <i>et al.</i> , 2013)	Boyacá	Perú

Fuente: recopilación hecha por el autor.

### 1.5. Enfermedades por *Fusarium* spp.

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular (Villa *et al.*, 2015). Como patógeno facultativo está representado por 17 complejos de especies (Zhu *et al.*, 2020), además, este género ha sido un serio obstáculo económico para los productores en todo el mundo ya que se encuentran en la mayoría de sustratos naturales como patógenos o no patógenos y asociados con otros hongos (Lombard *et al.*, 2019). Las especies más relevantes del género *Fusarium* que causan la contaminación en los granos pequeños de cereales son *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* y *F. equiseti*, además, son fuente importante de tricotecenos, fumonisinas y otras micotoxinas que causan enfermedades graves en humanos y animales (Jurado *et al.*, 2005).

Las especies del complejo no sólo inactivan ciertas rutas metabólicas propias de la planta sino que también producen toxinas que aumentan su virulencia, tales como las eniatinas y ácido fusárico, mientras que otras micotoxinas, como tricotecenos y fumonisinas, son tóxicas para los animales, presentando efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicas, inmuno-supresores y estrogénicos, por lo que representan un riesgo para la salud pública (Agrios, 2005; Wagacha & Muthomi, 2007). Además, estas especies ocasionan el tizón de cabeza, una enfermedad que produce importantes pérdidas en el rendimiento de los cereales. Las especies del complejo *Fusarium* que han sido halladas como asociadas a los cultivos de quinua del departamento de Boyacá se presentan en la (Tabla 4).

Tabla 4.

*Hongos Patógenos del complejo Fusarium*

Género y especie	Cultivos reportados	Enfermedades	Autor
<i>Fusarium graminearum</i>	Cebada ( <i>Hordeum vulgare L.</i> ) y el trigo ( <i>Triticum aestivum L.</i> ) Cereales	Fusariosis de la espiga	(Agrios, 2005)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Uvilla ( <i>Physalis peruviana L.</i> ) papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Marchitez vascular	(Vera, 2021)
<i>Fusarium equiseti</i>	Manzano ( <i>Malus domestica</i> )	Acortamiento de entrenudos en plantas	(A. Naeini <i>et al.</i> , 2010) (Pérez-Corral <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusarium cerealis</i>	Cereales, trigo, centeno, cebada	Tizón de cabeza Micotoxinas	(Geiser <i>et al.</i> , 2013) (Chandler <i>et al.</i> , 2003)
<i>Fusarium culmorum</i>	Trigo	Tizón de cabeza Pudrición de pie	(Beccari <i>et al.</i> , 2011)
<i>Fusarium incarnatum</i>	Melon ( <i>Cucumis melo</i> )	Pudrición postcoscha	(Wonglom & Sunpapao, 2020)

Fuente: recopilación hecha por autor

**1.5.1. *Fusarium oxysporum***

Es probablemente la especie más común del género *Fusarium* y ocupa el quinto lugar en la lista de los 10 principales hongos fitopatógenos cosmopolitas (Dean *et al.*, 2012) y más

comunes de suelo, se comporta como un saprófito de suelos que puede competir con saprofitos obligados y con algunos hongos que infectan raíces para colonizar tejido vegetal muerto, es un importante hongo vascular sobre muchas especies de plantas a nivel del mundo. Esta especie se caracteriza por invadir tejidos epidermales de la raíz, y se extiende a los haces vasculares produciendo micelio y/o esporas en los vasos y mata a la planta por taponamiento de vasos (Zaquinaula, 2018), causando daño significativo predominantemente a los cereales y algunas especies no cereales (Dean *et al.*, 2012).

### **1.5.2. *Fusarium cerealis* y *Fusarium graminearum***

Las especies dentro del complejo de especies de *F. graminearum* y *cerealis* han sido descritos como los principales agentes causales del tizón de cabeza (S.A. Palacios, A. Del Canto, J. Erazo, 2021), una enfermedad fúngica muy importante que afecta a los cereales de grano pequeño en el mundo como lo son el trigo y el maíz. Esta enfermedad no solo provoca pérdidas de rendimiento, sino también contaminación de los cultivos con micotoxinas como el deoxinivalenol (DON) y el nivalenol (NIV). Miller (1994), identificó quimiotipos de tricoteceno de tres cepas de *F. cerealis* (*F. crookwellense*) reportando impactos económicos debido a la reducción del rendimiento y la contaminación por micotoxinas

### **1.5.3. *Fusarium incarnatum***

Se ha demostrado que el complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) abarca 33 especies filogenéticas, en una amplia gama de hábitats/ huéspedes en todo el mundo (Wang *et al.*, 2019), incluye solo unas pocas especies descritas formalmente caracterizadas por la curvatura típicamente dorsiventral de macroconidios y abundantes clamidosporas, que van desde ser simples o en cadenas o grupos, a excepción de *F. scirpi* que carece de microconidios (Bentley, A.R., *et al.*, 2006). Los miembros del grupo FIESC son ubicuos, principalmente saprobios, patógenos o invasores secundarios de hábitats ambientales, plantas, humanos y animales y algunos producen micotoxinas (O'Donnell *et al.*, 2009). Esta especie es capaz de producir micotoxinas como fuminosina (Wonglom & Sunpapao, 2020).

#### 1.5.4. *Fusarium culmorum*

Es un importante patógeno de una amplia variedad de plantas, especialmente de cereales como el trigo (Hestbjerg *et al.*, 2002). La presencia de este patógeno en semillas reduciendo la germinación, además, durante el proceso de crecimiento vegetativo su presencia genera podredumbre del pie y raíz; durante la floración en condiciones húmedas provoca el tizón de la cabeza en trigo (Valle *et al.*, 2004). Se cree que la producción de deoxinivalenol (DON) por esta especie juega un papel en la patogénesis.

### 1.6. Control de Enfermedades de la Quinua

Numerosos estudios han reportado cambios en los ecosistemas del suelo como resultado de la aplicación de pesticidas por lo que un gran número de indicadores de la calidad del suelo han sugerido incluir la evaluación del nitrógeno potencialmente mineralizable, las enzimas y los organismos de este. Se ha demostrado que el uso a largo plazo de pesticidas incrementa la concentración de contaminantes en suelos y otros recursos ambientales (del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014). La contaminación con metales junto con la erosión y labranza, reduce la calidad de los suelos, afectan sus propiedades bioquímicas haciéndolos más susceptibles de contaminación convirtiéndose en una grave preocupación agroambiental, reduciendo la calidad de este recurso y la sostenibilidad del agroecosistema (Monkiedje *et al.*, 2002).

En la actualidad, se han ido desarrollando diferentes formas de contribuir a la conservación del ambiente en el área agrícola con productos biológicos que evitan o excluyen insumos externos de síntesis química. Existen diversas opciones de controladores biológicos con menor impacto nocivo, los biofungicidas y bioplaguicidas de origen microbiano, usados para la minimización de agentes patógenos y que dependen del conocimiento de la ecología y epidemiología de la enfermedad los cuales usan como ingrediente activo microorganismos antagonistas naturales que han sido ampliamente estudiados (Hernández *et al.*, 2007) por ejemplo extractos de origen vegetal con compuestos activos pesticidas. En los países desarrollados se está incrementando el uso de tratamientos con estos nuevos componentes, denominados por la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) como insecticidas de “riesgo reducido” (Wogiatzi *et al.*, 2009)

### 1.6.1. Control de fitopatógenos con aceites esenciales

Es importante mencionar que se ha vuelto una tarea difícil elaborar productos naturales eficientes y estables que brinden protección fitosanitaria a las plantas, sin embargo, se han probado con éxito formulaciones comerciales de origen vegetal, solas o en conjunto con microorganismos de control biológico. De esta forma, una alternativa segura corresponde al uso de algunos extractos de plantas individuales o combinados en determinadas concentraciones y proporciones, que al poseer principios con propiedad antifúngica pueden afectar a patógenos diferencialmente (Villa-Martínez *et al.*, 2015). Estas propiedades se han conocido durante siglos, la canela (*Cinnamomum verum*), el comino (*Cuminum cyminum*) y el tomillo, se empleaban en el antiguo Egipto para embalsamar y en China e India para preservar alimentos (Peredo *et al.*, 2009). Del tomillo se ha reportado, sobre sus principales componentes, el efecto nocivo contra una amplia gama de microorganismos fitopatógenos presentes tanto en el suelo (pre-siembra) como en la etapa de postcosecha (Tabla 5) (Rota *et al.*, 2008)

Tabla 5.

*Componentes de los aceites vegetales con propiedades antifúngicas*

Nombre común de la planta	Nombre científico	Componente químico	% máximo presente del aceite esencial
<b>Tomillo</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol Timol Terpineno Cymeno	10-64% 2-11% 2-31% 1'-56%
<b>Orégano</b>	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol Terpineno Cymeno	80% 64% 2-52% 52%
<b>Romero</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Pineno Acetato de boril Canfor 1.8 cineolo	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%
<b>Canela</b>	<i>Cinnamomum verum</i>	Trans cinnamaldehido	65%
<b>Clavo</b>	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Acetato de eugenil	75.85% 8-15%

Fuente: García-García R. M.; Palou-García. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectivos de Ingeniería de Alimentos.*, 2(2), 41–51.

Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-García-García-et-al-2008a.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-García-García-et-al-2008a.pdf)

Los aceites esenciales provienen de plantas aromáticas y tienen uso aplicativo en el control de enfermedades en plantas, tanto en cosecha como en postcosecha, pues ha sido considerado como un método seguro para el medio ambiente como para la salud humana. Debido a las sustancias que se encuentran presentes, algunas de estas corresponden a compuestos volátiles que se localizan en diferentes órganos de las plantas que pueden ser raíces, hojas, tallos, flores (Jiménez, 2020), se han descrito alrededor de 3000 aceites esenciales provenientes de diversas plantas y aproximadamente 300 de ellas presentan interés comercial por sus aplicaciones terapéuticas y alimentarias (Marqués, 2015) estos aceites pueden contener terpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Figura 2) (Oseida, 2018). Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos derivados del isopreno gracias a ellos, los diferentes tipos de plantas tienen olores característicos y varían dependiendo de los terpenos que tenga.

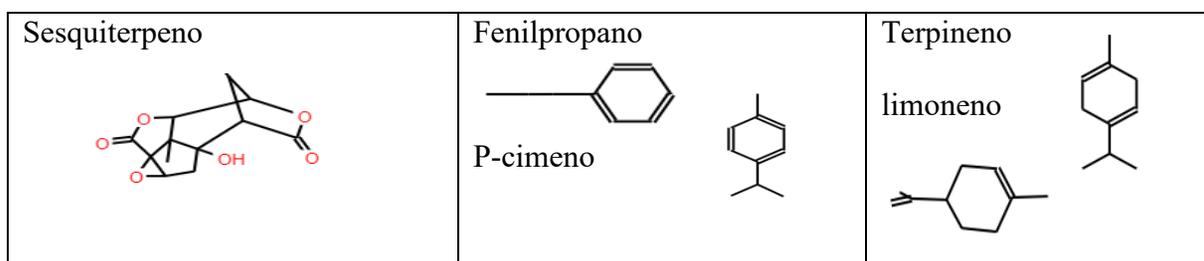


Figura 2. Estructura química de metabolitos activos de aceites esenciales de tomillo y orégano.

Fuente: autor. empleando la herramienta: <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm>

Los mecanismos de acción sobre hongos y bacterias de los compuestos que se encuentran en los aceites esenciales han sido descritos (Andrade-Bustamante *et al.*, 2017) (Figura 3), presentando efectos sobre el control de algunos microorganismos, se destacan: flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas y polipéptidos, por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos; el modo de acción de los terpenos no es claro aún, pero se ha considerado que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos (García & Palou-García, 2008), en la tabla 5 se encuentran descritos algunos compuestos presentes en aceites esenciales.

El efecto inhibitorio de estos aceites esenciales está dado principalmente por su acción lipofílica, pues tienen la capacidad de penetrar la membrana plasmática provocando cambios morfológicos en las hifas, dañando la célula y su sistema enzimático, dificultando el mecanismo

de transporte de la membrana plasmática, la salida de cationes como  $H^+$  y  $K^+$ , cambiando así el valor de pH de las células y afectando la composición y actividad de las células (Dwivedy *et al.*, 2017), provocando la muerte de microorganismos fúngicos y bacterianos e induciendo por último la destrucción de las mitocondrias para inhibir los hongos. (Sreenivasa *et al.*, 2011; Mohapatra *et al.*, 2017). El carvacrol puede reducir la fluidez de la membrana celular al cambiar la proporción y estructura de los ácidos grasos en la membrana celular y luego desempeñar un papel inhibitorio, (Di Pasqua *et al.*, 2006; Andrade-Bustamante *et al.*, 2017).

### 1.6.2. Obtención de aceites esenciales (AE)

Los "aceites esenciales" (AE) son sustancias líquidas a temperatura ambiente, que cuentan con un carácter lipofílico además de propiedades aromáticas, volátiles, tienden a polimerizarse y su densidad promedio está entre 0,84 y 1,18 g/mL, (Núñez-torres *et al.*, 2020) estos compuestos oleosos se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas por presión, fermentación, extracción con solventes volátiles, fluidos supercríticos, pero el método más común para la producción comercial es el de destilación por arrastre de vapor (Marqués, 2015); de acuerdo con estas características las técnicas más comúnmente utilizadas incluyen el método de destilación por arrastre vapor de agua, extracción con solventes orgánicos volátiles y con fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono como solvente (Santana, *et al.*, 2012); destilación con agua y vapor, destilación sometida a una degradación térmica, destilación-extracción con solvente (DES) y destilación asistida por radiación microondas (HDM) (Santana *et al.*, 2012; Villa-Martínez *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2012).

**1.6.2.1. Destilación por arrastre de vapor.** Una de las técnicas más utilizadas para extraer aceites esenciales es la destilación por arrastre agua-vapor; esta técnica consiste en emplear fuentes de calor externas para la separación de aceites esenciales de la materia prima (Calderón *et al.*, 2018) se basa en vaporizar dos líquidos inmiscibles a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, consiste en la toma de muestras vegetales generalmente frescas, las cuales se introducen en un balón de tres bocas y se someten a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, este extrae el AE presente en las estructuras contenedoras y lo difunde a través

de las membranas de las células debido a que el vapor de agua penetra los tejidos de la planta, luego arrastrado y posteriormente condensado, recolectado, separado de la fracción acuosa (Peredo et al., 2009; Granados et al., 2012) esta técnica además, es sencilla, fácil de manipular y el consumo energético es relativamente bajo (Cerpa & Palomino, 2007; Caballero et al., 2011)

**1.6.2.2. Método de Soxhlet.** Consiste en la separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. Aunque su campo de aplicación es fundamentalmente el agroalimentario es también de utilidad en el área medioambiental, así es el método de análisis recomendado para la determinación del aceite y la grasa total recuperable en aguas de vertidos industriales permitiendo la determinación de hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, grasas animales, ceras, jabones y compuestos relacionados (Usaquén & Zafra, 2018).

### **1.6.2. Aceite esencial (AE) de tomillo**

El tomillo (*Thymus vulgaris L.*) es una planta perenne perteneciente a la familia Lamiaceae, especie del grupo de las plantas aromáticas, de aspecto compacto. El tomillo es una especie rica en aceites esenciales utilizada principalmente en medicina tradicional y como condimento (Rojas-Armas, et al., 2015). El aceite de tomillo posee compuestos fenólicos, carvacrol y timol (2-isopropil-5-metilfenol) cuya fórmula molecular es  $C_{10}H_{14}O$ , Figura 3 (Matiz, G., Fuentes, K., León, 2015), correspondiente a un isómero óptico del timol, sustancia cristalina incolora con un olor característico, poco soluble en agua debido a la presencia de un grupo hidroxilo en su anillo aromático (Arango et al., 2012; Oussalah et al., 2006). La eficacia bactericida del aceite de tomillo radica en su mecanismo de acción generando rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos induciendo la lisis rápida de la célula, además, diversos autores han reportado su efectividad fungicida contra *Fusarium* sp., con un alto porcentaje de inhibición (Barrera, L., García, 2008).

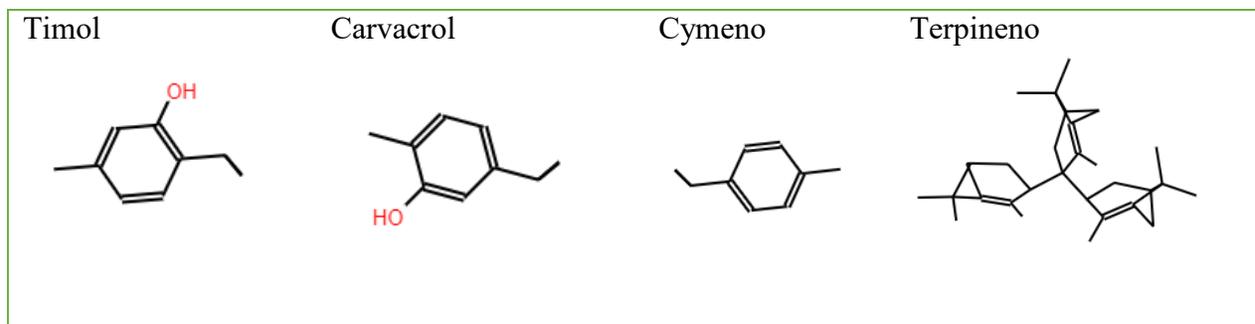


Figura 3. Compuestos con acción antifúngica del tomillo y orégano, Fuente: elaboración propia usando herramienta <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm>

### 1.6.3. Aceite esencial de Orégano

Estudios indican que el aceite de orégano también ejerce poder inhibitorio sobre el crecimiento de hongos (Caballero *et al.*, 2018). Este hecho muestra un potencial enorme que puede aprovecharse para dar valor agregado al producto (Franco *et al.*, 2005). El contenido de aceite que tiene el orégano (*O. vulgare*) oscila entre 0,5% hasta 7% y su composición química al igual que el tomillo son carvacrol, timol (por lo que se le atribuye un gran poder antioxidante por su alto contenido de estos dos compuestos) e isómeros fenoles, además de monoterpenos p-cimeno y  $\gamma$ -terpinene en bajas cantidades (Sakkas, H. Papadopoulou, 2017). Se ha reportado efectividad del aceite de orégano como fungicida contra: *Candida albicans*, *Phymatotricopsis omnivora*, *Rhizopus spp*, *Fusarium oxisporum* y *Phytoppthora capsici*.

## 1.7. Control Químico

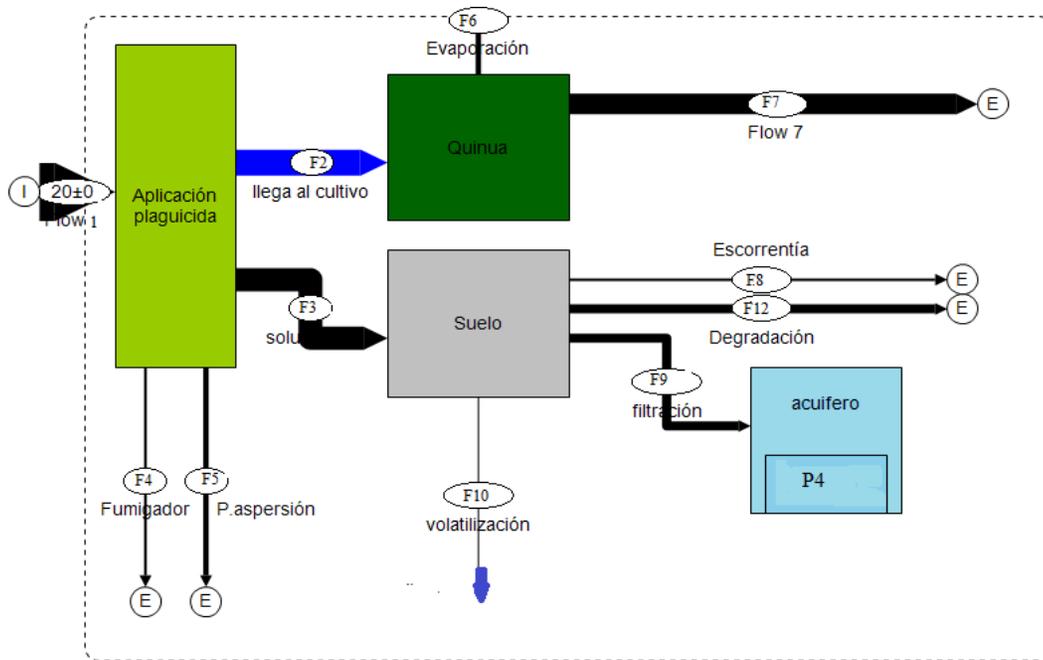
Para el control principalmente de este *Fusarium* se usan fungicidas sistémicos tales como los benzimidazoles que incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. Se ha documentado que algunos de estos principios activos son mutagénicos en las plantas, por ejemplo, Villa y colaboradores (2015) han reportado el efecto genotóxico del benomil (Metil-1-(butilcarbomoil) benzimidazol-2il-carbamato) en raíces de cebolla (*Allium cepa*) al ser tratadas con diferentes dosis de este fungicida, el cual ocasiona algunas anomalías tales como defectos en la formación del huso mitótico y cariocinesis sin citocinesis. Además, se ha demostrado que los agroquímicos pueden impactar de diferente manera los microorganismos

que se encargan de la descomposición de la materia orgánica desmejorando notablemente la calidad del suelo (Chaves-Bedoya *et al.*, 2013).

En la (Figura 4) se puede observar el efecto de la aplicación de un fungicida químico sobre los factores suelo, aire y agua, representado mediante un modelo esquemático en el programa STAN2.5web. En dicho esquema se puede evidenciar como por procesos de degradación y evaporación hace que el fungicida salga a la atmósfera generando contaminación y en el caso del suelo, el compuesto químico por escorrentía y filtración llega a cuerpos de agua subterráneas, y por bioacumulación genera cambios en la dinámica del suelo, afectando la microbiota del suelo limitando las poblaciones de organismos benéficos y disminución los nutrientes para las plantas (Gerbore *et al.*, 2014).

Desde hace tiempo se ha reportado que la adsorción de plaguicidas químicos en el suelo modifica el proceso de degradación y de transporte de estos compuestos en el mismo, así como su actividad biológica para combatir los organismos a los que son destinados (Al-Qodah *et al.*, 2007). Esta problemática se resalta debido a la importancia que tiene la microbiota del suelo para el desarrollo adecuado de los cultivos, dichas comunidades se caracterizan por su diversidad haciendo parte de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo entre otros.

Sumado a esto, en el caso del agricultor, en el momento de la aplicación del producto las partículas del fungicida químico quedan impregnadas en la ropa y en la piel provocando afectaciones en la salud ya sea a corto o mediano plazo por la exposición a agentes químicos, esta situación se agrava por la deficiencia en el uso de medidas de protección, además, como los productos alimenticios pueden llevar trazas de sustancias tóxicas estas pueden ser ingeridas generando efectos en la salud del consumidor (A. Naeini *et al.*, 2010).



**I** =Entrada del fungicida químico al sistema. **E**= Salidas del sistema (**F10** volatilización, **F8** escorrentía, percolación, **F6** evaporación, **F9** filtración, Degradación **F12**). Contaminación, **P4** acuífero, atmósfera, **F3** aspersión humano.

Figura 4. Representación esquemática del problema, Fuente: elaboración propia usando la herramienta STAN2.5web.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica de los aceites vegetales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) para el control orgánico de *Fusarium* sp. y el impacto generado por su aplicación sobre el microbiota total del suelo.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Establecer mediante una metodología *in vitro* las dosis y concentraciones óptimas de los aceites esenciales de tomillo y orégano con actividad antifúngica, sobre cepas del género *Fusarium* aisladas de cultivos de quinua del departamento de Boyacá.
- Evaluar la efectividad del uso de los aceites esenciales de tomillo y orégano como tratamiento para la desinfección de semillas de quinua de la variedad “Amarilla de Marangani”
- Determinar y comparar el impacto generado por la aplicación de los aceites esenciales de tomillo y orégano con fungicidas comerciales sobre la microbiota total del suelo.

### **3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.**

#### **3.1. Introducción**

Desde hace años, el control de las enfermedades fúngicas vegetales ha dependido, en gran medida, de los tratamientos con agroquímicos, sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente, además, han dado lugar a la aparición de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades con mayor incidencia que antes. Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas tanto para seres humanos como para animales (A-Naeini *et al.*, 2010).

Los aceites esenciales son mezclas volátiles complejas de metabolitos secundarios que a veces superan los 100 componentes con olor característico que pueden extraerse de todos los órganos de la planta extendiéndose su uso a la industria como saborizantes, agentes de limpieza, cosmética y perfumes. (Oseida, 2018); estos líquidos aceitosos aromáticos se pueden obtener obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas), algunos de ellos indican actividad antibacteriana y antifúngica, como fue descrita en el marco teórico debido a sus compuestos timol y carvacrol (Perdones *et al.*, 2016)

#### **3.2. Metodología**

##### **3.2.1. Obtención del extracto etanólico de tomillo por el método de Soxhlet y evaluación de su actividad antifúngica**

El proceso de extracción del aceite esencial de tomillo se realizó en el laboratorio de Química de la Universidad de Boyacá. Cuarenta gramos de tomillo seco fue molido, empleando un procesador de alimentos para que el material quedara lo más finamente posible, luego se pasó por un juego de tamices de varios diámetros hasta llegar a la malla con diámetro de 1 mm, procedimiento realizado una vez, el macerado se introdujo en 4 dedales de celulosa con una cantidad aproximada de 6 gr por cada uno; como disolvente se emplearon 150 mL de etanol

grado absoluto (de la marca PanReac) por cada balón de destilación, el montaje se llevó al sistema de Soxhlet con 4 planchas de calentamiento a temperatura de 78 °C por 5 horas (Figura 6). A continuación, se llevaron 250 ml del compuesto obtenido por Soxhlet a un rota evaporador con una temperatura inicial de 50 °C y una presión de 300 mbar, la temperatura se mantuvo constante y la presión se redujo hasta 160 mbar, por un espacio de 4 horas hasta eliminar la totalidad de etanol y obtener así el aceite concentrado de tomillo, el procedimiento se realizó una vez más, para obtener mayor cantidad del extracto de tomillo, obteniendo un total de 8.09 gr, para su posterior uso en las pruebas inhibitorias (Figura 5).

Con la masa obtenida se realizó una dilución 1/1 en Tween 20 al 0,1%, basado en método empleado por Robalino & Calero, (2019) y se pasó luego por vortex para tratar de homogeneizar la mezcla, este procedimiento empleado se basó en la técnica propuesta por Zhu y Colaboradores (2020).

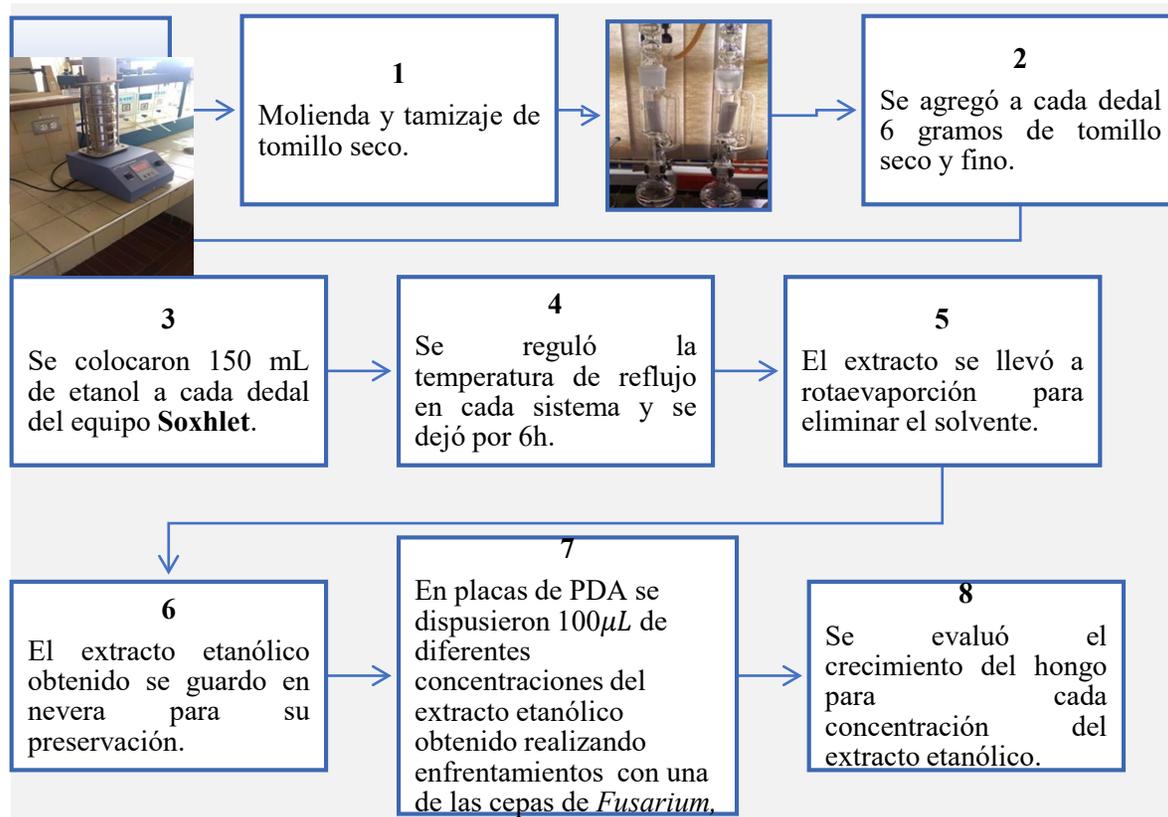


Figura 5. Técnica empleada para extracción por Soxhlet. Fuente: autor, imágenes propias.

Con el fin de determinar si el extracto etanólico de tomillo obtenido, presentaba actividad antifúngica, se realizó una prueba piloto de enfrentamiento, para esto en placas de Petri conteniendo agar PDA (agar papa dextrosa) suplementado con 0,1g/L de cloranfenicol, se realizaron repiques de cepas previamente identificadas y caracterizadas de *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *A. alternata* ubicando un segmento de 5mm del inóculo hacia un extremo de la caja y al otro extremo se dibujó una línea en donde se aplicaron 100µL del extracto puro y en diluciones seriadas 1:10 desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  mL AE/mL (Concentraciones desde puro hasta  $10^{-8}$  mL AE/mL). Cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado, las muestras fueron dejadas en incubadora durante 7 días, a  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ .

### **3.3. Evaluación de la Actividad Antifúngica y Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de Aceites de Tomillo y Orégano Comerciales**

Los métodos empleados fueron de difusión en agar, usados para determinar la sensibilidad y susceptibilidad *in vitro* de bacterias y levaduras a los agentes antimicrobianos, constituyen una metodología sencilla, cuyos resultados son fáciles de leer e interpretar y de factible implementación en los laboratorios de rutina en micología, por lo cual sería conveniente contar con herramientas como estas para estudiar la sensibilidad antifúngica de hongos filamentosos (Torres *et al.*, 2006). A través de dicha técnica se puede estudiar la sensibilidad de los hongos a determinados compuestos antifúngicos que se encuentran, bien a una concentración fija o en concentraciones diferentes, determinando cualitativamente si el hongo es sensible, resistente o moderadamente sensible; o bien se puede conocer cuantitativamente utilizando una serie de diluciones seriadas permiten determinar las CMI. Para hongos filamentosos los estándares son más difíciles de establecer, actualmente se usan como referencia los documentos CLSI M38-A2 y su contraparte europea (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008). Actualmente se ha logrado establecer parámetros para la utilización de técnicas de disco difusión para la susceptibilidad antifúngica, concretamente el documento CLSI M44- A2 (National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS., 2009).

### 3.3.1. Evaluación de la actividad antifúngica de aceites comerciales de tomillo y orégano

Los aceites esenciales de tomillo y orégano se seleccionaron teniendo en cuenta que la obtención hubiera sido mediante la técnica de arrastre de vapor, teniendo en cuenta que el aceite obtenido por el método de Soxhlet no presentó inhibición alguna. Para la determinación de la CMI de los aceites esenciales se modificó la técnica de difusión en pozo en agar propuesta por Chandrasekar y colaboradores (2015). Para el ensayo se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 20 mL de agar PDA a cada pozo se le adicionaron 100 $\mu$ L del extracto diluido en una suspensión de DMSO (dimetilsulfóxido) de los aceites puros de acuerdo con la metodología propuesta por (Soylu *et al.*, 2010) modificada. Para esto se prepararon concentraciones seriadas 10<sup>-1</sup> mL AE/mL hasta 10<sup>-10</sup> mL AE/mL y tanto éstas como el aceite puro se probaron contra cepas *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *A. alternata*, previamente identificadas por el grupo de Investigación Gestión Ambiental en el marco del proyecto: “Fortalecimiento del cultivo de la quinua (*Chenopodium quinoa*) a partir del conocimiento de la diversidad genética, la sanidad del cultivo e inocuidad de los agroalimentos derivados de la producción, financiado por Minciencias en Convocatorias Retos País 808”, (Tabla 6). Los inóculos fueron dispuestos en el centro de la placa con un pitillo de 5mm de diámetro garantizando un tamaño homogéneo. Las placas se incubaron durante 7 días a 27 $\pm$ 3°C o hasta el crecimiento absoluto del control (placa conteniendo en los pozos únicamente DMSO).

Se midió el diámetro de las colonias y se determinó el porcentaje de inhibición respecto a la placa control como se describe (Figura 6). Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta que el desarrollo de una zona de inhibición del crecimiento microbiano de cualquier tamaño alrededor del pozo indica que el microorganismo es sensible a la concentración del producto analizado, su ausencia indica la resistencia al producto probado. La inhibición del crecimiento radial de hongos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(DC - DT)}{DC} \times 100$$

Donde:

Dc = diámetro de la colonia del control

Dt = diámetro de los tratamientos

Tabla 6.

Identificación y origen cepas del estudio\*\*

Código	Origen	Especie
ER9	Soracá / hoja	<i>F. oxysporum</i>
SOR009M21	Soracá / suelo	<i>F. equiseti</i>
M06	Tunja / hoja	<i>F. graminearum</i>
SO01M2	Soracá / suelo	<i>F. culmorum</i>
ER1	Siachoque / suelo	<i>F. proliferatum</i>
ER3	Tunja / hoja	<i>F. incarnatum</i>
TIH20	Tibasosa/ Hoja	<i>A. alternata</i>

\*\*Identificación laboratorio de biología molecular Universidad de Boyacá. Fuente: autor

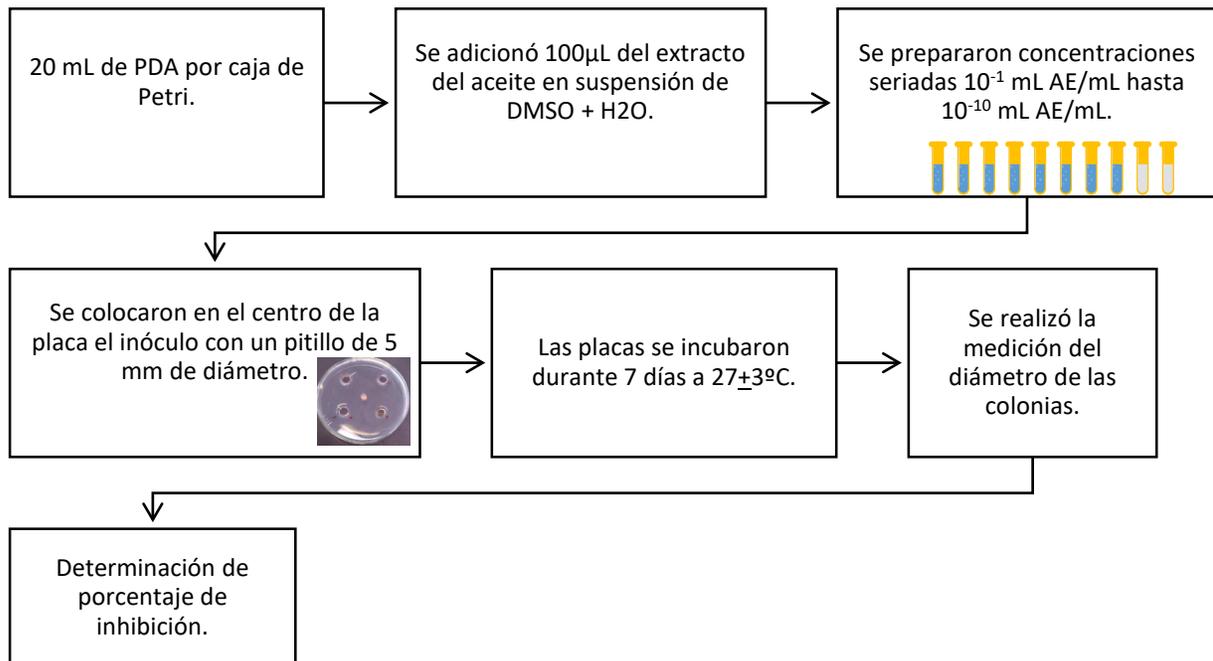


Figura 6. Técnica de difusión en pozo empleada. Fuente: autor

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Resultados de la evaluación del extracto etanólico por Soxhlet.

Los resultados obtenidos del enfrentamiento con el extracto etanólico de tomillo obtenido por método de Soxhlet no mostró inhibición en ninguna de las concentraciones, para las cepas probadas (Figura 7); razón por la cual se decidió emplear aceites esenciales de tomillo y orégano obtenidos por la técnica de arrastre de vapor de forma comercial.

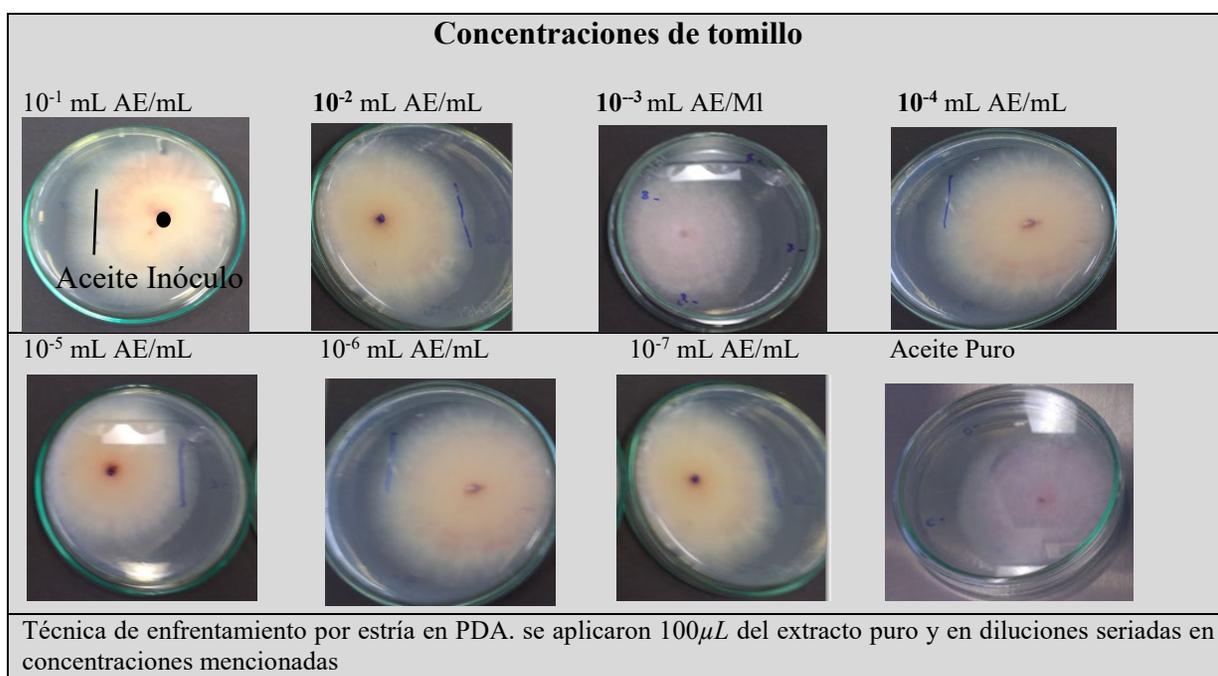


Figura 7. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones tomillo extraído por Soxhlet.

Fuente: autor

#### 3.4.2. Resultados concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de tomillo y orégano.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que ambos aceites esenciales puros presentaron una inhibición del 100%. El cálculo de la CMI permitió determinar que la dosis mínima inhibitoria para el aceite de tomillo fue en la dilución 10<sup>-2</sup> mL AE/mL y para el aceite de orégano 10<sup>-3</sup> mL AE/mL para todas las cepas excepto para *F. incarnatum* cuya CMI fue de

$10^{-1}$  mL AE/mL con tomillo (Tabla 7, Anexo B). Para las concentraciones por encima de los valores de  $10^{-4}$  Ninguno de los aceites presentó actividad total o parcial (Anexo C)

Tabla 7.

*Concentraciones inhibitorias de los aceites de tomillo y orégano*

Especie	CMI Tomillo	CMI Orégano
<i>F. cerealis</i>	$10^{-2}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>F. culmorum</i>	$10^{-2}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>F. oxysporum</i>	$10^{-2}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>F. incarnatum</i>	$10^{-1}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>F. graminearum</i>	$10^{-2}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>F. equiseti</i>	$10^{-1}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL
<i>A. alternata</i>	$10^{-1}$ mL AE/mL	$10^{-3}$ mL AE/mL

Fuente: autor

### 3.4.3. Análisis estadístico.

**3.4.3.1. Tomillo.** Para establecer las diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba t- Student. Respecto a la inhibición presentada por el aceite esencial de tomillo (Figura 8 y Anexo D), se presentan los siguientes hallazgos con un nivel de significancia  $p < 0,05$ :

Las diluciones de  $10^{-1}$  mL AE/mL no muestran diferencias significativas en su capacidad de inhibición en comparación con el AE puro.

Las diluciones de  $10^{-3}$  mL AE/mL tienen una pérdida significativa de capacidad inhibitoria de crecimiento con respecto al desempeño que muestra el AE puro frente a la mayoría de las cepas, excepto *F. equiseti*. En el caso del tratamiento con esta cepa la capacidad de inhibición de  $10^{-2}$  mL AE/mL no muestra diferencias significativas en su eficacia con respecto al AE puro.

El aceite pierde totalmente su capacidad inhibitoria luego de ser disuelto a concentraciones menores a  $10^{-3}$  mL AE/mL.

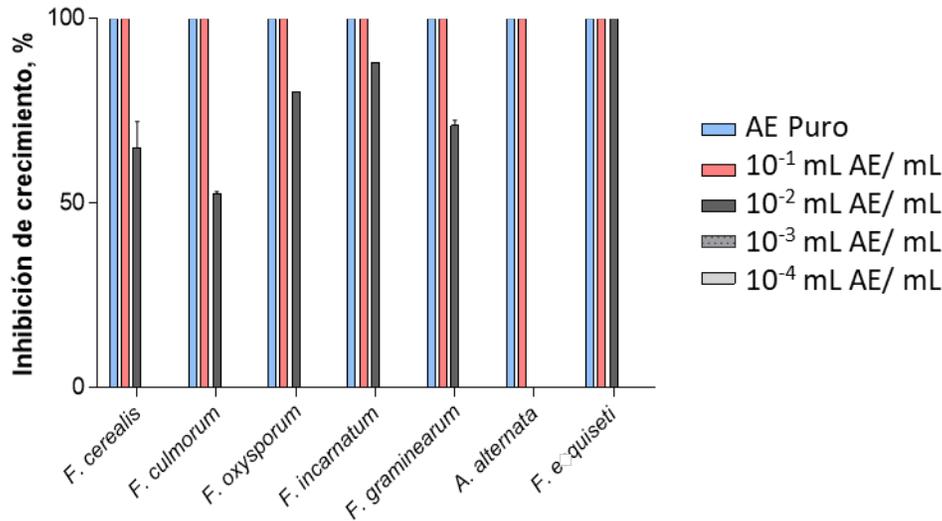


Figura 8. Efecto inhibitor del crecimiento fúngico del aceite esencial de Tomillo\*\*

\*\*Se grafica la inhibición del crecimiento puesto que permite una mejor visibilización de los datos y en muchos tratamientos la inhibición corresponda. Fuente: autor

**3.4.3.2. Orégano.** Al realizar la prueba t- Student. respecto a la inhibición presentada por el aceite esencial de orégano (Figura 9, Anexo E), se presentan los siguientes hallazgos con un nivel de significancia  $p < 0,05$ ; la dilución de  $10^{-2}$  mL AE/mL no muestra diferencias significativas en su capacidad de inhibición en comparación con el AE puro, en ninguno de los casos.

Las diluciones de  $10^{-3}$  ml AE/mL tienen una pérdida significativa de capacidad inhibitoria de crecimiento con respecto al desempeño que muestra la dilución  $10^{-2}$  en todos los casos. Sin embargo, el aceite diluido a  $10^{-3}$  aún conserva capacidad significativa de inhibición (con respecto a las diluciones  $10^{-4}$  frente a las cepas *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *A. alternata*).

Se resalta que el aceite presenta un buen comportamiento de inhibición dosis-respuesta frente a la cepa *A. alternata*. Esto podría sugerir la presencia de algún principio activo en el aceite al que es más susceptible esta cepa y, en menor medida, también lo son *F. oxysporum* y *F. graminearum*.

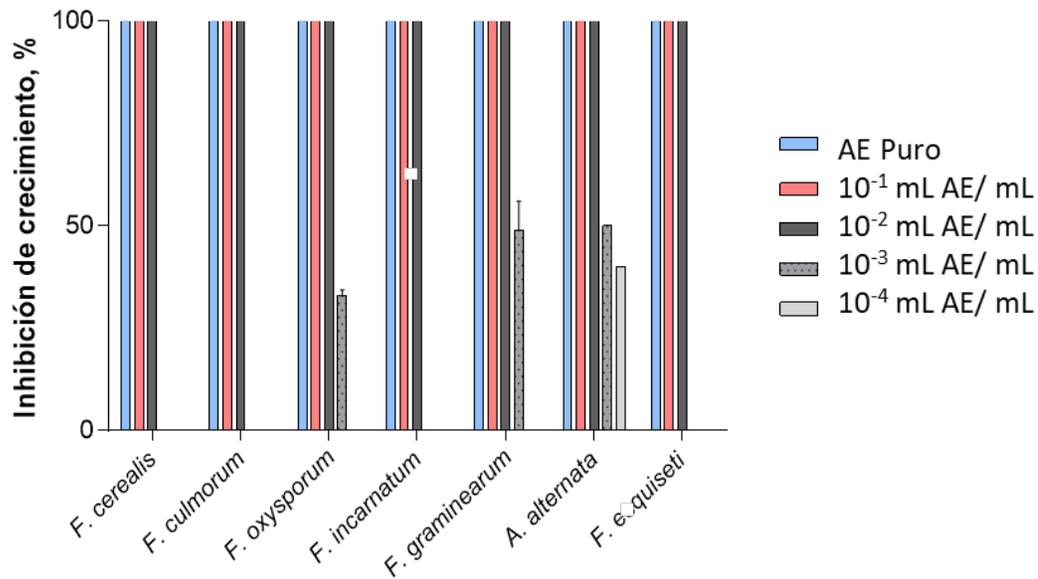


Figura 9. Efecto inhibitor del crecimiento fúngico del aceite esencial de Orégano, Fuente: autor

Teniendo en cuenta que los resultados demuestran que los dos aceites presentan diferencias significativas siendo más efectivo el aceite de orégano, se destaca que entre los estudios previos en los que se incluyen aceites esenciales para el control de hongos, se reporta la inhibición de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* por el aceite de Orégano (Barrera- Necha & García Barrera, 2008; Wogiatzi *et al.*, 2009); en otro estudio comparativo entre el aceite esencial de clavo y orégano para control de *F. oxysporum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Estrada y colaboradores (2017) reportaron que el aceite esencial de orégano mostró los mayores valores de inhibición contra el patógeno al inicio de las pruebas y antes de un periodo de 8 días (Boumar *et al.*, 2020), al emplear aceites tanto de *O. vulgare* como de *T. vulgaris*, evaluando en ellos la actividad antifúngica *in vitro* de *Fusarium* en el cultivo de la papa, empleando los aceites de manera separada como de forma sinérgica, los autores encontraron una gran actividad potencial con valores de concentración inhibitoria mínima (CMI) de (0.078 - 0.156  $\mu\text{L} / \text{mL}$  y 0.156 - 0.313  $\mu\text{L} / \text{mL}$ ), respectivamente. Igualmente, se halló que los aceites eran efectivos contra la germinación de esporas de todas las especies de *Fusarium* probadas. Los hallazgos indicaron que ambos aceites esenciales, solos o en combinación, poseen propiedades antioxidantes y antifúngicas.

Estudios en fresa mostraron que estos aceites esenciales de orégano y tomillo evaluados a las 10 horas y 6 días de periodo de incubación inhibieron similarmente de forma moderada la germinación de conidios in vitro y el crecimiento micelial de *F. oxysporum f. sp. Fragariae* (Park et al., 2017). Reportes de la actividad del aceite de tomillo en concentraciones de 100, 150, 200, 250, 300, 500 y 750  $\mu\text{L} / \text{L}$ , colocadas en discos en medio PDA, para control de *F. culmorum* y *F. pseudograminearum* en trigo, mostraron el efecto alto contra esos dos patógenos. La germinación y producción de esporas también fueron fuertemente inhibidas por la acción del aceite de tomillo (Mohammad-Hosseini et al., 2020).

Por otra parte, el aceite de tomillo empleado como fumigante a una concentración de 66,7  $\mu\text{L} / \text{L}$  mostró un efecto inhibitorio significativo sobre *A. alternata* aplicándolo en tomates cherry almacenados a 25 ° C durante 5 días, usado en dilución de 500  $\mu\text{L}/\text{L}$  este mostró un efecto de inhibición de contacto significativo en el hongo en tomates almacenados a 25 ° C durante 3 días (Feng et al., 2011).

Štrelková y colaboradores (2021), emplearon el método de volatilización de disco modificado. Los autores probaron tres concentraciones (250, 125 y 62,5  $\mu\text{L}/\text{L}$ ) de aceites esenciales de Tomillo, Orégano, limoncillo y clavo, las dosis que reportan inhibición completa del crecimiento de hongos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* sp l. spp., *Penicillium ochrochloron*). Las dos concentraciones más altas dieron como resultado una inhibición del 100% en todos los aislados, incluso 62,5  $\mu\text{L}/\text{L}$  mostró un efecto antifúngico significativo, se reportó adicionalmente que la actividad antifúngica prioriza al tomillo por encima del orégano para ese estudio.

#### **3.4.4. Análisis de la composición de los aceites esenciales empleados.**

El análisis de la muestra fue procesado en los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander empleando el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS). La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al cromatógrafo. La identificación presuntiva de los compuestos registrados en las muestras de aceites esenciales de tomillo y orégano se basó en sus espectros de masas (EI, 70 eV), se usaron las bases de datos de Adams, Wiley y NIST.

Los resultados del informe se presentan a continuación en la (Tabla 8), el reporte de la composición química de orégano (Tabla 9), reporte del contenido químico del aceite esencial de tomillo

Tabla 8.

*Resultados del análisis del aceite esencial de orégano por cromatografía acoplada por espectrometría de masas*

<b>TR</b> <b>Tiempo de retención/minutos</b>	<b>Identificación del compuesto</b>	<b>Cantidad relativa</b> <b>en % 1.5 mL de</b> <b>aceite Orégano</b>
15,8 $\alpha$ -	Tujeno	0,2
16,2 $\alpha$ -	Pineno	0,6
16,9	Canfeno	0,2
18,1	Oct-1-en-3-ol	0,2
18,6 $\beta$ -	Mirceno	1,0
19,4 $\alpha$ -	Felandreno	0,2
19,8	$\alpha$ -Terpineno	1,3
20,2	p-Cimeno	6,5
20,4	Limoneno	0,2
20,4	$\beta$ -Felandreno	0,2
20,5	1,8-Cineol	0,2
21,6	$\gamma$ -Terpineno	4,1
22,1	cis-Hidrato de sabineno	0,3
22,7	Terpinoleno	0,2
23,2	Linalol	5,4
23,4	trans-Hidrato de sabineno	0,2
26,3	endo-Borneol	1,2
26,6	Terpinen-4-ol	1,1
27,2	$\alpha$ -Terpineol	0,2
28,6	Carvacril metil éter	0,3
29,2	Carvona	0,2
30,4	Timol	3,7
31,0	Carvacrol	66,7
31,4	2-Metil-5-(propan-2-ilideno)	0,4

33,2	Acetato de carvacrilo	0,2
35,6	trans- $\beta$ -Cariofileno	1,6
38,4	$\beta$ -Bisaboleno	2,4
40,9	Óxido de cariofileno	0,3
42,5	epi- $\alpha$ -Cadinol	0,3
49,0	N.I.	0,4

Fuente: autor, datos obtenidos del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas universidad industrial de Santander

Tabla 9.

*Resultados del análisis del aceite esencial de tomillo por cromatografía acoplada por espectrometría de masas*

<b>TR</b> <b>Tiempo de retención/minutos</b>	<b>Identificación del compuesto</b>	<b>Cantidad relativa en % 1.5 mL de aceite Tomillo</b>
16,2 $\alpha$ -	Pineno	3
16,9	Canfeno	0,4
18,8	trans-p-Mentano	0,2
18,6	$\beta$ -Mirceno	1,2
19,5	$\Delta^3$ -Careno	0,1
19,7	1,4-Cineol	0,3
19,8	$\alpha$ -Terpineno	0,9
19,9	m-Cimeno	0,4
20,2	p-Cimeno	29,9
20,4	Limoneno	0,6
20,5	1,8-Cineol	1,2
21,6	$\gamma$ -Terpineno	3,5
22,1	cis-Óxido de linalol	0,2
22,7	trans-Óxido de linalol	0,2
23,2	Linalol	6,4
24,4	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,1
25,9	Isoborneol	0,4
26,2	endo-Borneol	2,1
27,2	$\alpha$ -Terpineol	0,9

30,4	Timol	37,9
30,6	Acetato de bornilo	0,7
30,7	Acetato de isobornilo	0,4
30,8	Carvacrol	6,5
35,6	trans- $\beta$ -Cariofileno	1,0
40,9	Óxido de cariofileno	0,6
54,4	N.I.	0,3

**\*NI no identificado**

Fuente: autor, datos obtenidos del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas universidad industrial de Santander

En cuanto al reporte de estos análisis se evidencia que el contenido de carvacrol es mayor en el aceite esencial de orégano representando el 66% comparado con el reporte del aceite esencial de tomillo que contiene para la muestra analizada 6,5%. el cual es eficaz para las bacterias hasta tal punto que evita la proliferación de las mismas. El timol en ambas muestras también varía de acuerdo al aceite encontrándose en mayor proporción en el tomillo, además en el reporte se encontró otro grupo de compuestos entre los cuales está el terpineno en sus formas ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ), el linalol, el borneol y el pineno.

Sarkhosh y colaboradores (2018) reportaron que el aceite esencial extraído del tomillo fue principalmente compuesto de timol (73,3%) seguido de mucho menor cantidades de carvacrol (6,6%), p-cimeno (5,8%) y  $\gamma$ -terpineno (4,6%), indicaron además las propiedades, antisépticas y antioxidantes que aporta el aceite esencial. El presente estudio a diferencia del reportado por Sarkhosh (2018), tiene valores menores de timol, sin embargo, los valores de carvacrol son similares en ambos reportes por espectroscopía de masas (Sarkhosh *et al.*, 2018).

### 3.5. Evaluación de la Efectividad de Fungicidas Químicos para el Control de *Fusarium spp.* y *Alternaria sp.*

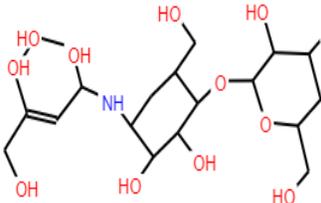
#### 3.5.1. Metodología

Con el objeto de evaluar la respuesta de las cepas de estudio contra fungicidas tradicionalmente empleados para el control de *Fusarium* en cereales, se probaron 8 compuestos

comerciales de los cuales se describe su mecanismo de acción (Tabla 10), los siguientes corresponden a los fungicidas químicos para control de *Fusarium* que fueron seleccionados para esta investigación.

Tabla 10.

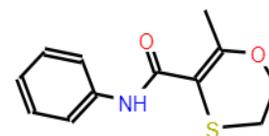
*Fungicidas químicos empleados y mecanismos de acción*

Fungicida y mecanismo de acción	Estructura y composición química
<p><b>Validacin®3% SL</b></p> <p>Validacina es el principio activo con fundamento antibiótico y fungicida, aminoglucósido conocido por inhibir las trehalasas en plantas, insectos y hongos, así como mejorar la acumulación de trehalosa en plantas transgénicas. Es eficaz contra <i>Pellicularia sasakii</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> en las plantas, pero sólo disminuye su virulencia en lugar de exhibir un efecto fungicida. Además, se utiliza para controlar la enfermedad de la peste de la vaina en el arroz y es más eficaz contra los patógenos transmitidos por el suelo (Liñan, 2021).</p>	<p>Validacina</p> 
<p><b>Águila®</b></p> <p>Ditiocarbamato con actividad fungicida por contacto, se caracteriza por su acción preventiva y persistencia. Su mecanismo de acción no es todavía conocido, aunque parece ser que inhibe las enzimas sulfhidrúlicas e impide la respiración. Pertenece al grupo de los inhibidores multisitio. Fungicida orgánico del grupo EBDC's (ditiocarbamatos) con amplio espectro de acción para el manejo preventivo de diferentes enfermedades (Liñan, 2021).</p>	<p>Ditiocarbamato</p> 

**Vitavax®**

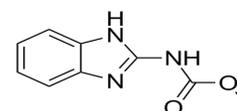
## Carboxin

Fungicida preventivo y curativo de acción sistémica perteneciente al grupo de las oxathiin- carboxamides. Inhibe la respiración mitocondrial del hongo bloqueando el transporte de electrones en la cadena de la respiración a nivel del succinato. Reacciona con las enzimas sulfhídricas con producción de tiofosgeno, sustancia tóxica para las células fúngicas, e interfiere el proceso de respiración celular en los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelar, se transloca a los tejidos tanto en semillas como al suelo o foliar, se emplea tanto en tratamiento de semillas y adicionalmente, como fungicida protectante, (Monzón, 2003).

**Carbendazim ®**

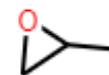
## Carbendazim

compuesto activo metilbenzimidazol-2-il carbamato con actividad fungicida preventiva y curativa sobre enfermedades producidas por hongos endoparásitos y ectoparásitos. Es absorbido por las raíces y por los tejidos verdes y traslocado en sentido acrópeto. Actúa interfiriendo la biosíntesis del DNA durante la mitosis y el mecanismo de transmisión del mensaje genético del DNA. Entre los hongos que controla se encuentra *Fusarium sp.*, *Glomerella glycines*, *F. solani*, (Liñan, 2021; Monzón, 2003).

**Agrodyne®**

## 2-methyloxirane

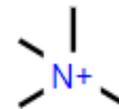
Solución líquida a base de yodo actúa como fungicida y bactericida que puede aplicarse al suelo o al follaje para el control de hongos y bacterias fitopatógenas. El fungicida Agrodyne por su gran solubilidad actúa de forma sistémica, llegando a todos los órganos de la planta, para destruir por óxido reducción las paredes celulares de los microorganismos con los que hace contacto, su acción es curativa y erradicante (Liñan, 2021).



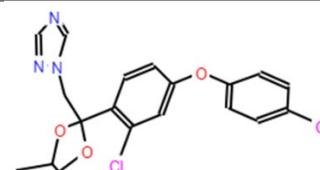
**Sanaraiz®**

## Amonio cuaternario

Producto elaborado con sales de amonio cuaternario, han sido ampliamente usados como desinfectantes de uso general debido a sus propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales, su acción fungicida depende del grado de dilución sin embargo es considerado un desinfectante de baja actividad, entre los hongos que ha mostrado efectividad se encuentran levaduras y mohos. Estos compuestos también se emplean como desinfectantes de superficie (Cuauhtémoc, 2018).

**Score® 250 EC**

Es un fungicida sistémico, recomendado para el control de Venturia, Oidio y otras enfermedades en pomáceas (manzana, pera, membrillo), Oidio y acción complementaria en Botrytis en vides y berries (arándano, frutilla, frambuesa, mora), Oidio y Tizón temprano en papa y Tizón temprano, Alternariosis, Oidios (Gaviria-Hernández *et al.*, 2013)



Fuente: recopilación hecha por el autor, elaboración de moléculas empleando la herramienta: <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm>

Para el desarrollo del ensayo se probó la concentración recomendada por la casa comercial, 50% más diluidas y 50% más concentradas (Tabla 11), esperando reconocer si la susceptibilidad o resistencia de las cepas a dichos principios activos tiene alguna correlación con la concentración del compuesto. Como control se agregó agua puesto que todos los compuestos probados se disuelven en esta. Cada tratamiento se realizó con cuatro repeticiones para la obtención del promedio y cálculo del porcentaje de inhibición, manteniendo la similitud con el ensayo realizado con los aceites, pero reemplazando el DMSO por agua como control (Figura 10)

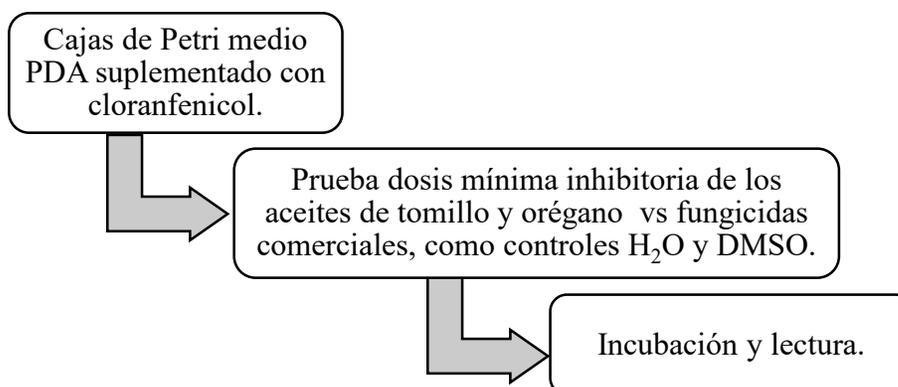


Figura 10. Ensayo comparación de las dosis mínimas inhibitorias Fuente: autor

Tabla 11.

*Tratamientos fungicidas comerciales probados con concentraciones empleadas*

Tratamientos	Principio activo	Concentración
T1 Validacin	Validacina	[1]* 1,5g/L [2] 3,0g/L y [3] 4,5g/L
T2 Águila	Metiram (70%)	[1] 1,87 g/L [2] 3,50 g/L [3] 5,62 g/L
T3 Vitavax	Carboxin + captan, difenoconazol	[1] 1.5 g/L [2] 3 g/L [3] 4.5 g/L
T4 Carbendazim	Metil-2-benzimidazol carbamato	[1] 0,2 g/L [2] 0,4 g/L [3] 0,625 g/L
T5 Agrodyne	Yodo polaxamer	[1] 0,66 g/L [2] 1,32 g/L [3] 1,98 g/L
T6 Caldo bordelés	sulfato de cobre y cal hidratada	[1] 1g/L [2] 2g/L [3] 3g/L
T7 Sanaraiz	Cloruro de benzalconio amonio cuaternario	[1] 0,2g/L [2] 0,4 g/L [2] 0,6g/L
T8 Score	250 g/l (23,58 % p/p) Difenconazol	[1] 0,5g/L [2] 1 g/L [2] 1,5 g/L

\*[1] concentración diluida al 50% [2] concentración recomendada por el fabricante [3] concentración concentrada al 150%- Fuente: autor

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de t- *Student*, la cual se utilizó para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos debido a la distribución normal de las variables, teniendo en cuenta que el valor p calculado es menor al límite elegido por significancia estadística para rechazar la hipótesis nula en favor de la hipótesis alternativa.

### 1.4.2. Resultados y Análisis Estadístico

De los fungicidas probados solamente Score y Carbendazim presentaron actividad contra las cepas de estudio, el crecimiento de los aislamientos frente a los otros fungicidas y en las 3 concentraciones probadas presentaron el mismo comportamiento que el control, por lo que se deduce que los fungicidas de las cepas a Águila, Bordelés, Sanaraiz, Vitavax, Validacin y Agrodyne no tienen un efecto dosis respuesta en los límites empleados (Figura 11 y Figura 13).

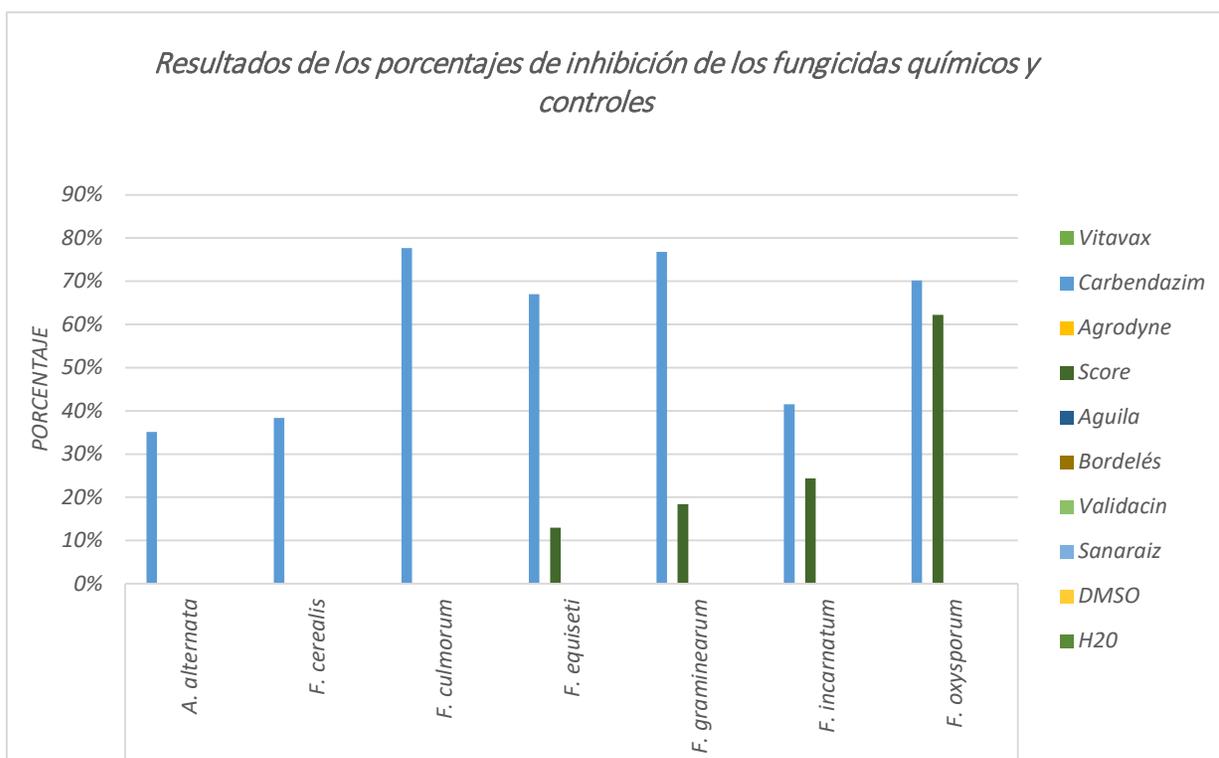


Figura 11. Porcentajes de inhibición de los fungicidas químicos en 7 cepas de fitopatógenos.

Fuente: autor

De manera general el Carbendazim presentó una mayor efectividad en los tres tratamientos, observándose un incremento directamente proporcional a la dosis probada, las cepas más susceptibles correspondieron a *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. graminearum*, se evidenció que la inhibición de *F. incarnatum* depende directamente de la dosis. Con Score, *F. culmorum* y *A. alternata* no presentaron susceptibilidad alguna, la cepa más sensible fue *F. oxysporum*, por lo que se evidencia que diversas especies del complejo *Fusarium* responden de manera diferencial a los tratamientos, en *F. graminearum* el porcentaje de inhibición fue bajo,

inclusive en la dosis más alta (Figura 13), lo cual representa una problemática importante debido a la importancia de este hongo en cereales y pseudocereales (Figura 12 y Anexo F).

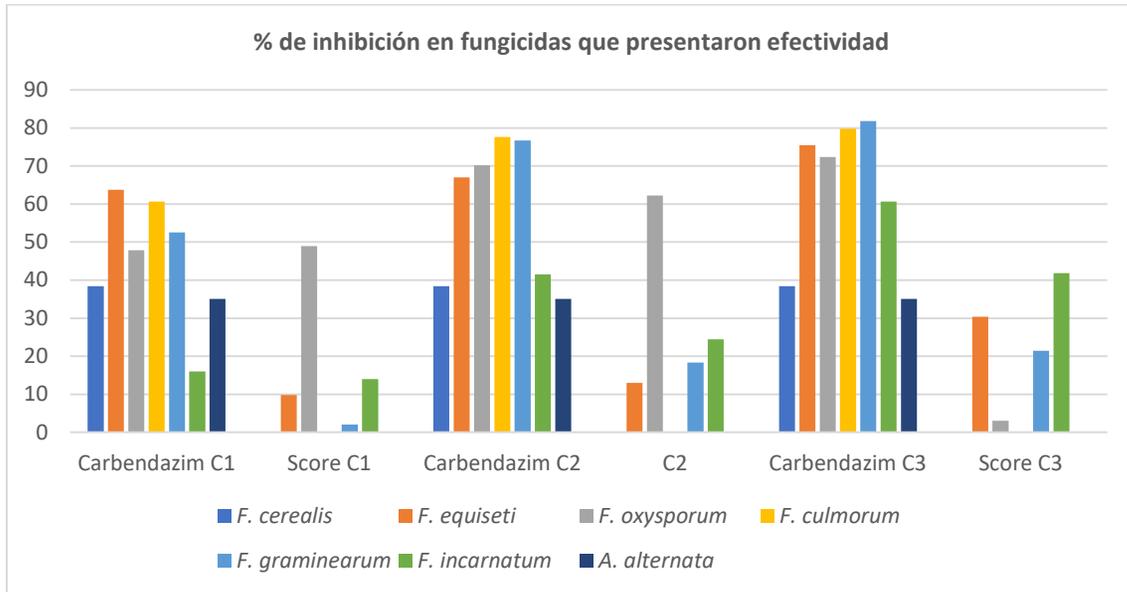
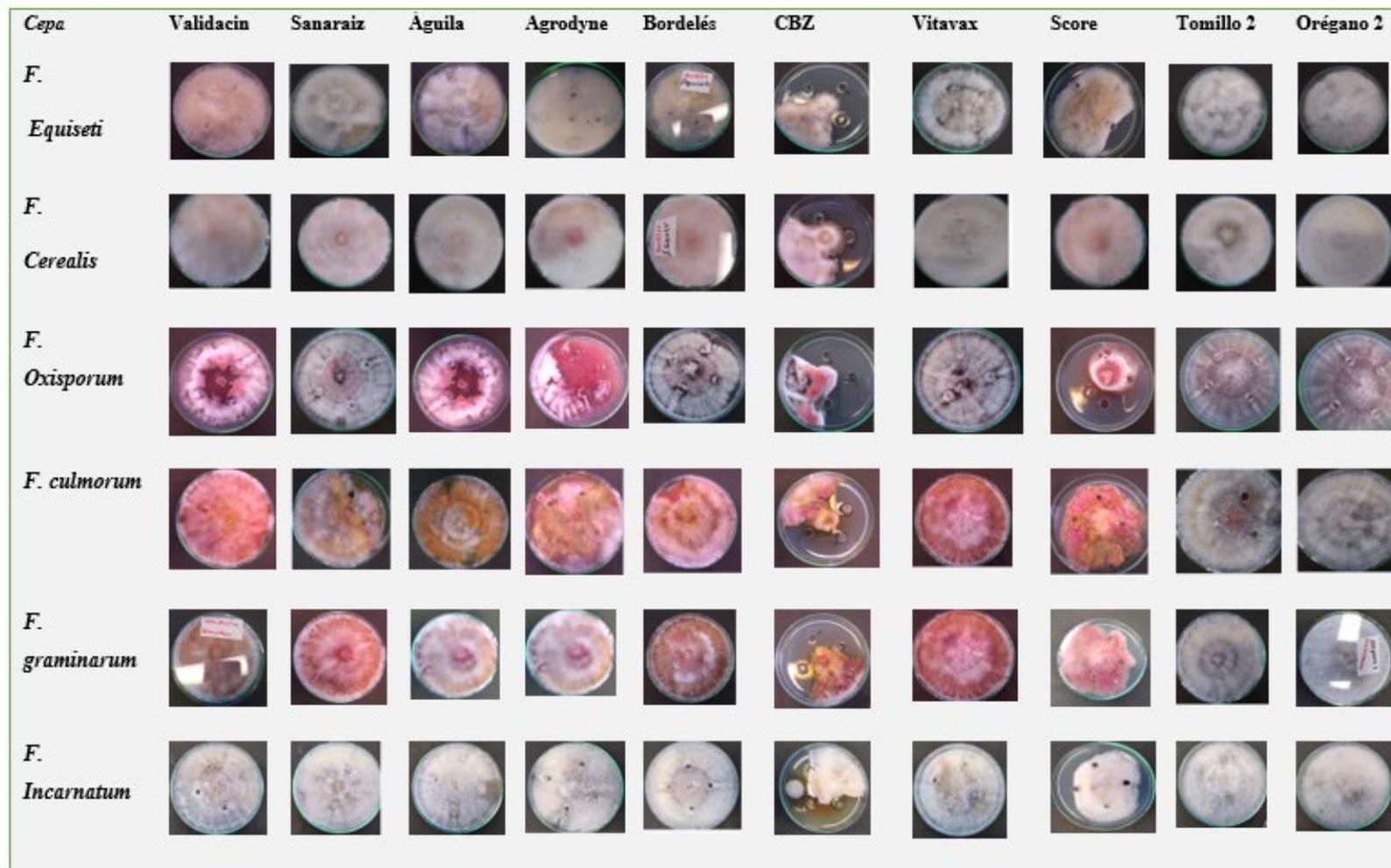


Figura 12. Porcentaje de inhibición comparativo\* Fuente: autor



Crecimiento de *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. Oxisporum*, *Alternaria alternata* en placas con media PDA, para los fungicidas químicos Vitavax, Carbendazim, Agrodyne, Score, Águila, Bordelés, Validacin, Sanaraiz, DMSO, H<sub>2</sub>O

Figura 13. Micrografías de los resultados de los tratamientos químicos vs orgánicos. Fuente: autor

Para establecer las diferencias significativas se realizó un test de t-Student. Arrojando los siguientes resultados. Es importante mencionar que las gráficas fueron realizadas sobre el porcentaje de crecimiento, puesto que la mayoría de los compuestos no tuvo ninguna inhibición, lo cual no permite una buena apreciación.

Las siguientes figuras de la (14 a la 20) se muestran las gráficas que representan el efecto de cada uno de los tratamientos sobre las cepas evaluadas y su respectivo análisis.

**1.4.2.1. *F. cerealis*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. cerealis* bajo tratamiento con Carbendazim en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO (Figura 14); sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de diferentes concentraciones.

T de Student para hallar diferencias entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O. Se hallan diferencias significativas.

T de Student para hallar diferencias entre los tratamientos al 50% de concentración y 100% de concentración. No hay diferencias significativas.

T de Student para hallar diferencias entre los tratamientos al 50% de concentración y 150% de concentración. No hay diferencias significativas (Anexo G)

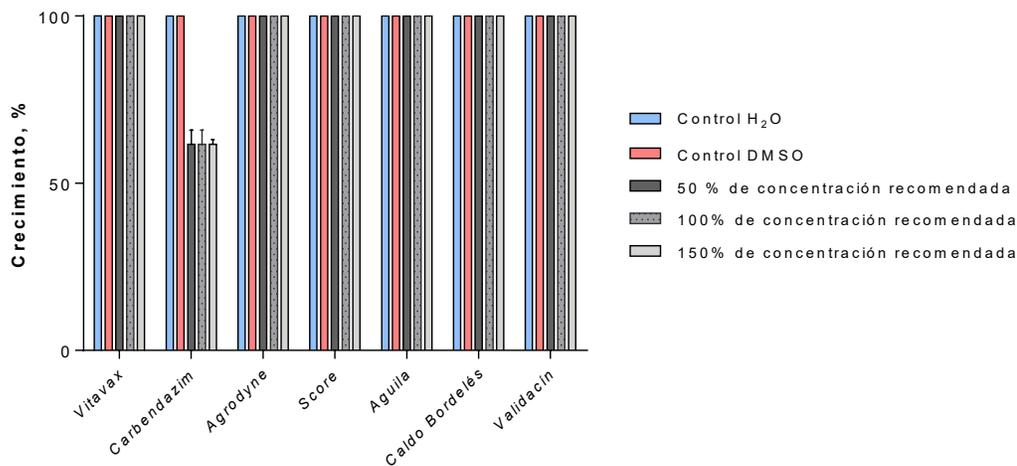


Figura 14. Efecto de fungicidas sobre *F. cerealis*. Fuente: autor

**1.4.2.2. *F. equiseti*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. equiseti* bajo tratamiento con Carbendazim y Score en comparación con los

controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de mayores concentraciones. Cabe resaltar que Score a concentración recomendada y mayores concentraciones pierde efectividad en la inhibición de crecimiento de esta cepa con respecto a la dilución del 50%. Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O.

Se hallan diferencias entre los tratamientos al 50% y al 100% de concentración de Carbendazim y Score.

En la prueba para hallar diferencias entre los tratamientos al 50% de concentración y 150% de concentración. Solo se halla diferencia significativa entre los tratamientos de 50% y 150% de concentración de Score (Figura 15, Anexo H)

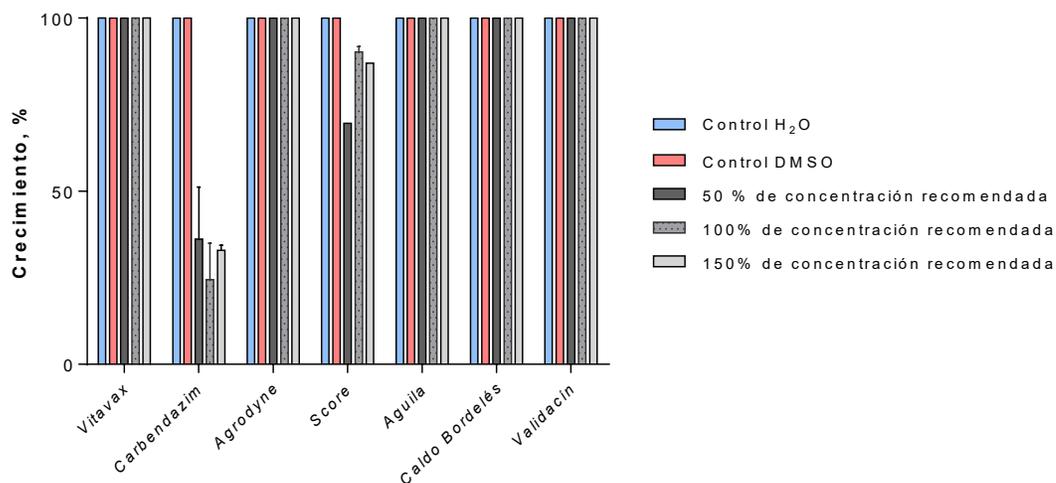


Figura 15. Efecto de fungicidas sobre *F. equiseti*. Fuente: autor

**1.4.2.3. *F. Oxysporum*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. equiseti* bajo tratamiento con Carbendazim y Score en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de mayores concentraciones. Cabe resaltar que Score a concentración recomendada y mayores concentraciones pierde efectividad en la inhibición de crecimiento de esta cepa con respecto a la dilución del 50%.

concentraciones pierde efectividad en la inhibición de crecimiento de esta cepa con respecto a la dilución del 50%. (Figura 16, Anexo I). Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O

Se hallan diferencias entre los tratamientos al 50% y al 100% de concentración de ambos fungicidas.

Solo se halla diferencia significativa entre los tratamientos de 50% y 150% de concentración de Score, pero no en estas concentraciones para Carbendazim.

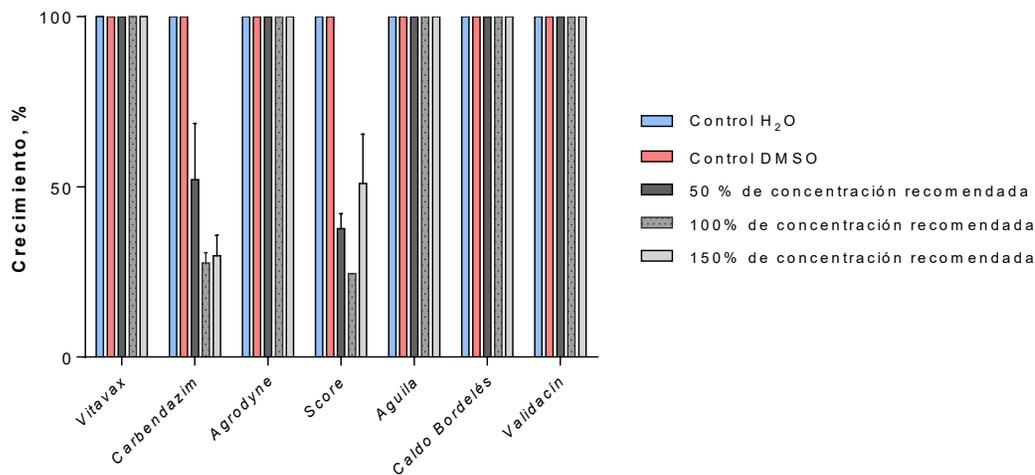


Figura 16. Efecto de fungicidas sobre *F. oxysporum*. Fuente: autor

**1.4.2.4. *F. graminearum*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. graminearum* bajo tratamiento con Carbendazim y Score en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de mayores concentraciones (Figura 17, Anexo J). Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas con el tratamiento con Carbendazim y Score. entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O

Se hallan diferencias entre los tratamientos al 50% y al 100% de concentración de Score y Carbendazim.

Se halla diferencia significativa entre los tratamientos de 50% y 150% de concentración de Score y Carbendazim, así mismo 100% y 150% también muestran diferencias significativas.

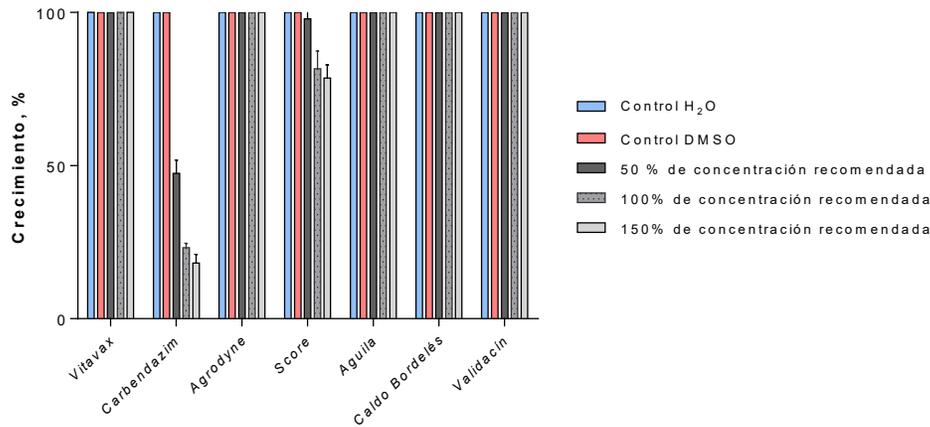


Figura 17. Efecto de fungicidas sobre *F. graminearum*. Fuente: autor

**1.4.2.5. *F. incarnatum*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. incarnatum* bajo tratamiento con Carbendazim y Score en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Además, se hallan diferencias significativas entre los tratamientos de diferentes concentraciones. Por tanto, ambos fungicidas muestran mayor efectividad en la inhibición de esta cepa y una eficaz actividad dosis-respuesta comparado con su desempeño en otras cepas (Figura 18). Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas con el tratamiento con Carbendazim, entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O.

Se hallan diferencias entre los tratamientos al 50% y al 100% de concentración de ambos Carbendazim y Score (Anexo K).

T de Student para hallar diferencias entre los tratamientos al 50% de concentración y 150% de concentración. Se halla diferencia significativa entre los tratamientos de 50% y 150% de concentración de ambos fungicidas (100% y 150% también muestran diferencias significativas).

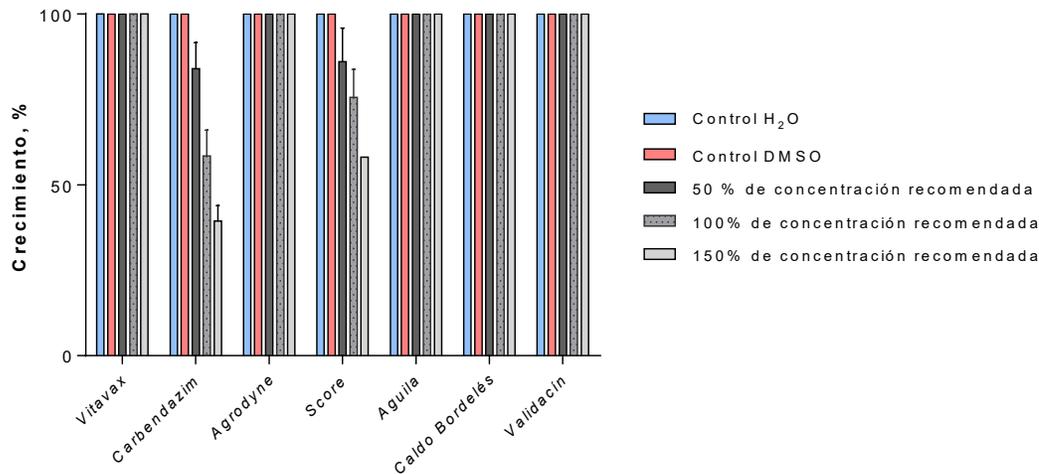


Figura 18. Efecto de fungicidas sobre *F. incarnatum*. Fuente: autor

**1.4.2.6. *F. culmorum*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *F. culmorum* bajo tratamiento con Carbendazim en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de mayores concentraciones (Figura 19). Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas con el tratamiento con Carbendazim entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O.

Se hallan diferencias entre los tratamientos al 50% y al 100% de concentración de Carbendazim

Se halla diferencia significativa entre los tratamientos de 50% y 150% de concentración de Carbendazim (100% y 150% no muestran diferencias significativas) (Anexo L).

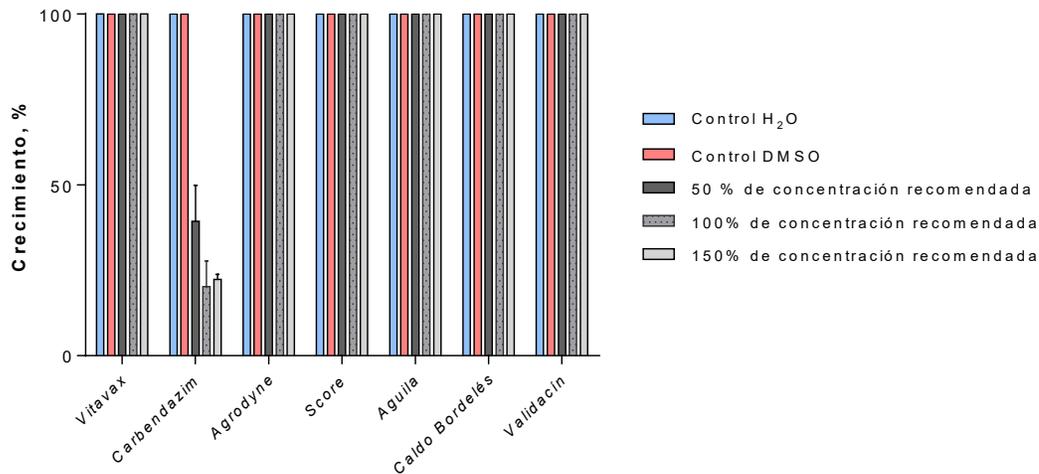


Figura 19. Efecto de fungicidas sobre *F. culmorum*. Fuente: autor

**1.4.2.7. *A. alternata*.** Se encuentra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de inhibición de crecimiento de *A. alternata* bajo tratamiento con Carbendazim en comparación con los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO. Sin embargo, no se halla diferencias entre los tratamientos de diferentes concentraciones (Figura 20, Anexo M). Los hallazgos estadísticos indican lo siguiente:

Se hallan diferencias significativas entre los tratamientos al 50% de concentración y el control de H<sub>2</sub>O.

No hay diferencias significativas entre los tratamientos de Carbendazim y Score al 50% y 100% de concentración.

No hay diferencias significativas entre los tratamientos al 50% de concentración y 150% de concentración.

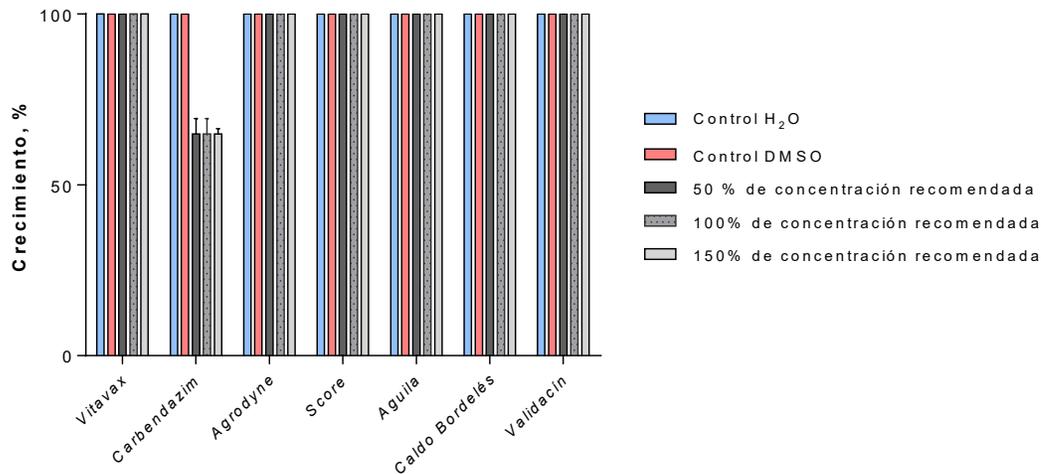


Figura 20. Efecto de fungicidas sobre *A. alternata*. Fuente: autor

### 3.6. Discusión

Hallazgos previos han descrito la resistencia de algunos hongos a los fungicidas y esto es un problema grave en la agricultura, (Ghosal *et al.*, 2020) probó cuatro aislamientos de *Fusarium oxysporum* de cuatro plantas de cultivo marchitas (tomate, papa, guisante y guisante) demostrando la sensibilidad basados en el crecimiento radial. Los aislados también mostraron un efecto inhibitor pleiotrópico sobre el crecimiento del micelio a carbendazim (1 mg/L). Por lo tanto, en condiciones de baja temperatura y estrés por metales pesados, el carbendazim podría usarse con prudencia para el control del patógeno (Ghosal *et al.*, 2020).

Yang y colaboradores (2019) encontraron que los patógenos podrían desarrollar resistencia cruzada a fungicidas con diferentes modos de acción reportado en sus resultados de investigación por medio de correlaciones positivas entre las tolerancias de mancozeb y difenoconazol a *Alternaria alternata*. También reportaron una asociación positiva entre la tolerancia a mancozeb y la agresividad de *A. alternata*, y la desintoxicación que limitan la acumulación intercelular de sustancias químicas naturales/sintéticas en patógenos podrían explicar la resistencia cruzada y la asociación positiva entre la agresividad del patógeno y la tolerancia a mancozeb (Yang *et al.*, 2019)

### 3.7. Recomendaciones

Se recomienda establecer la CMI en concentraciones que estén el rango comprendido entre la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  utilizando el método de microdilución, así mismo evaluar un posible efecto sinérgico con el fin de determinar si se logra una mayor inhibición o no hay efectos teniendo en cuenta que los compuestos timol y carvacrol son comunes a estos dos aceites.

Se recomienda evaluar el efecto de los fungicidas en otras cepas fúngicas aisladas a partir del cultivo que sean de interés fitopatológico, teniendo en cuenta que se observa una resistencia de las mismas a la mayoría de los compuestos probados.

Se recomienda evaluar el método de extracción de los extractos crudos, así como su dilución, que permita establecer un protocolo en el que se obtengan los compuestos activos.

#### 4. Evaluación del Uso de Aceites Comerciales de Tomillo y Orégano en el Tratamiento y Desinfección de Semillas.

##### 4.1. Introducción

Como se mencionó previamente, la quinua considerada un cultivo rústico, es resistente a factores medioambientales desfavorables (Calle *et al.*, 2010), las etapas tan vulnerables como la germinación pueden ser afectadas tanto por factores bióticos como abióticos. (Gabriel *et al.*, 2013), la alta variabilidad genética, la introducción de variedades a nuevas regiones y las interacciones con las condiciones del entorno generan impacto negativo en la disminución del rendimiento, calidad para la industria y/o viabilidad de la semilla cosechada, que se traduce en pérdidas económicas parciales o totales (Kermode, 2005).

La disminución de la calidad de las semillas ocurre a un tiempo y tasa de deterioro determinado entre otras cosas por las condiciones y el tiempo en las que se almacena, esta calidad se refiere a un conjunto de cualidades que se dividen en primarias y secundarias; las primeras representan componentes de viabilidad y germinación, y las segundas incluyen peso, humedad, tamaño, forma, entre otros (Gallo *et al.*, 2008).

##### 4.2. Metodología

Inicialmente se planteó la aplicación de los tratamientos para la desinfección del suelo en condiciones controladas. El suelo seleccionado para el ensayo fue una mezcla de cascarilla de arroz y tierra negra (1:1), al cual se le realizó doble esterilización en autoclave a 121°C, 1 atm de presión por 45 minutos, posteriormente, el suelo se colocó en bandejas de germinación con los inóculos de *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. culmorum* y *F. oxisporum*, presentes en una suspensión de esporas a una concentración de  $10^6$  conidias/mL modificando los protocolos propuestos por Cañedo & Ames, (2004) y Bi y colaboradores, (2012), se colocaron 200µL del inóculo por cada pocillo tres días antes de la siembra de las plántulas, cada tratamiento se realizó por triplicado. En cada uno de los pozos de siembra se adicionó 1mL de las concentraciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  mL AE/mL, de los aceites de Tomillo y Orégano y de las diluciones Carbendazim, agua y DMSO, como control, luego se realizó la

siembra de 5 semillas en cada pozo de la bandeja. En un segundo ensayo, se esperó la germinación y la aparición de los dos primordios foliares antes de la aplicación de los tratamientos mencionados.

Los resultados de los ensayos anteriormente mencionados arrojaron que la aplicación de los aceites en el momento de la siembra limitó la germinación de las semillas y que la aplicación de los aceites sobre las plántulas resulta tóxica impidiendo su crecimiento (Figura 21)

Razón por la cual se determinó realizar un ensayo que permitiera establecer la viabilidad en la aplicación de los tratamientos sobre la semilla y evaluar su toxicidad de manera indirecta sobre el proceso de germinación.

**Carbendazim**

**Orégano  $10^{-4}$  AE mL/mL**

**Tomillo  $10^{-2}$  mL/mL**



*Figura 21.* Toxicidad de los tratamientos sobre las plántulas de quinua a los 7 días de germinación. Fuente: autor

Se realizó la evaluación de la viabilidad de las semillas y su habilidad de crecimiento en medio PDA, primero se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio al 5% y etanol al 70%, los lavados se realizan por 5 minutos cada uno y entre lavado se enjuago con agua destilada estéril, las semillas fueron dispuestas en agar PDA, medio en el cual germinaron en un lapso de 24 a 72 horas, (Figura 12). Para la aplicación de los tratamientos en semilla se modificó el protocolo propuesto por Karaca y colaboradores (2017), los ensayos se realizaron sobre semillas no desinfectadas teniendo en cuenta que se busca establecer un protocolo aplicado en campo (la desinfección con hipoclorito de las semillas en campo no se realiza por el alto volumen que se utiliza de las mismas); para esto fueron expuestas 200 semillas por cada tratamiento los cuales consistieron en aceites esenciales puros y diluciones seriadas de los mismos desde  $10^{-1}$  mL AE/mL hasta  $10^{-4}$  mL AE/mL Para preparar la concentración de  $10^{-1}$

mL AE/mL fue diluida en DMSO y las demás en agua destilada estéril, las cuales fueron mezcladas vigorosamente en vortex previo a la aplicación de los tratamientos. Como controles se emplearon dos fungicidas químicos Carbendazim (metil-2-benzimidazol carbamato) a una concentración de 500g/L y Vitavax a una concentración de 3 mg/mL, como controles negativos se emplearon agua y una solución de agua y DMSO correspondiente a la concentración  $10^{-2}$  mL AE/mL sin aceite esencial.

Las semillas fueron sumergidas en las soluciones durante 1 hora y posteriormente sin realizar ningún enjuague, con el objeto de evaluar el porcentaje de semillas desinfectadas, se sembraron en cajas de agar PDA suplementado con cloranfenicol, distribuyendo aproximadamente 50 semillas por caja, la incubación fue realizada a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó tanto el conteo de colonias como la evaluación de índices de germinación de acuerdo con Romero y colaboradores (2018), sin embargo, se determinó que, aunque la semilla germinara no necesariamente prosperaba por lo que se incluyeron las mediciones de porcentaje de semilla con epicótilo naciente, porcentaje de semilla con primordios foliares, porcentaje semilla hipocótilo desarrollado, longitud promedio del hipocótilo en mm, realizando lecturas a las 48 y 96 horas post tratamiento. Para determinar la acción antifúngica de los tratamientos se determinó el porcentaje de semillas con incidencia del hongo para cada tratamiento (Figura 23).

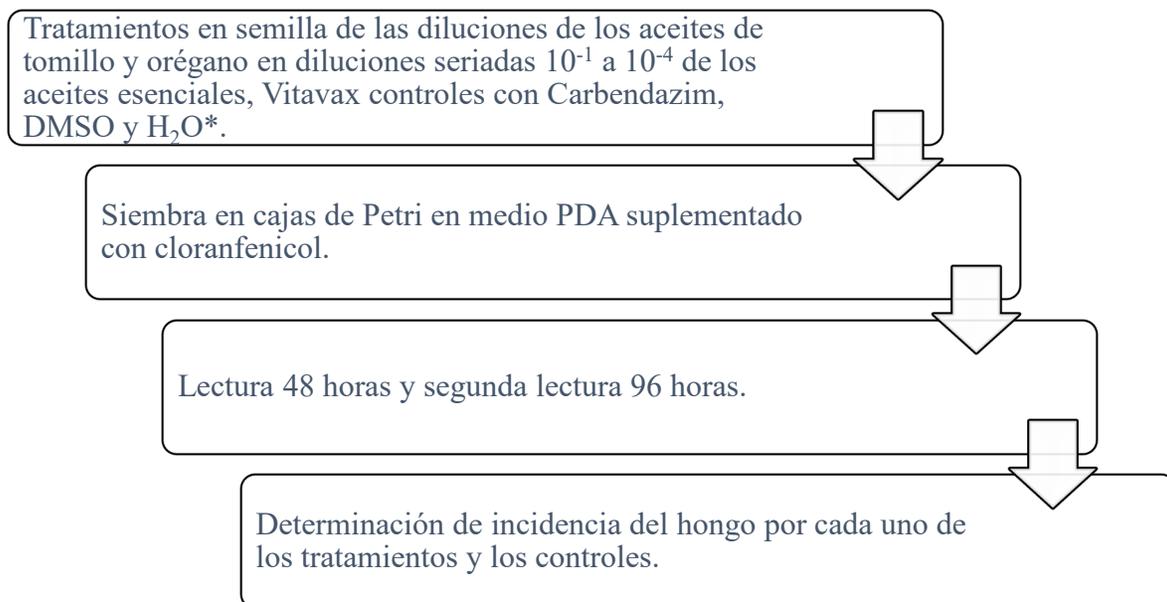


Figura 22. Siembra de semillas y determinación de incidencia de hongo e índices fisiológicos.

Fuente: autor

### 4.3. Resultados

Los resultados obtenidos demostraron una inhibición del 100% de crecimiento fúngico empleando los aceites puros y las diluciones  $10^{-1}$  mL AE/mL y  $10^{-3}$  mL AE/mL resultados que parecieran promisorios, sin embargo, dichos tratamientos tuvieron una alta toxicidad impidiendo la germinación de las plántulas (Figura 23). Para los tratamientos de tomillo y orégano en las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  hubo una inhibición del crecimiento fúngico inclusive mejor que los tratamientos comerciales (Carbendazim y Vitavax) sin inhibir el crecimiento de las plántulas, por lo que se considera que los tratamientos pueden ser efectivos en el tratamiento de semillas previo a la siembra.

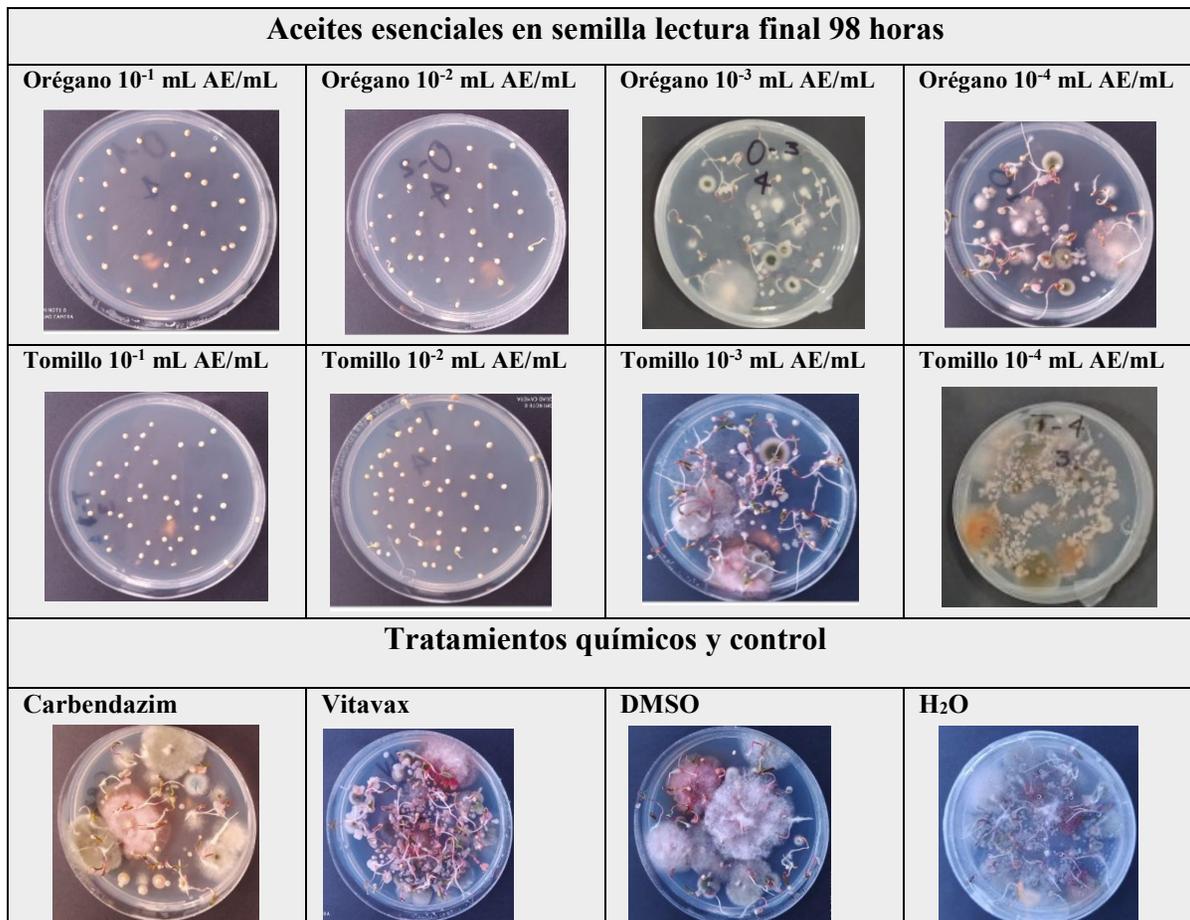


Figura 23. Prueba en semilla Concentraciones seleccionadas orgánicos y químicos. Fuente: autor, imágenes propias.

### 4.3.1. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos a las 48 horas se les realizó análisis de varianza y prueba de Tukey. En el análisis de epicótilos nacientes se determinó que las concentraciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  mL AE/mL de aceite esencial de tomillo son favorable en la formación de epicótilos nacientes en comparación con las concentraciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  mL AE/mL. Además, se determinó que las concentraciones de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  mL AE/mL de tomillo y orégano afectan al crecimiento de la planta, como se observa en la fila azul de la (Figura 24 y Anexo N).

El análisis estadístico arrojó que no hay diferencias significativas entre los compuestos y las diluciones usadas y el desarrollo del primordio foliar y el desarrollo del hipocótilo (Figura 25)

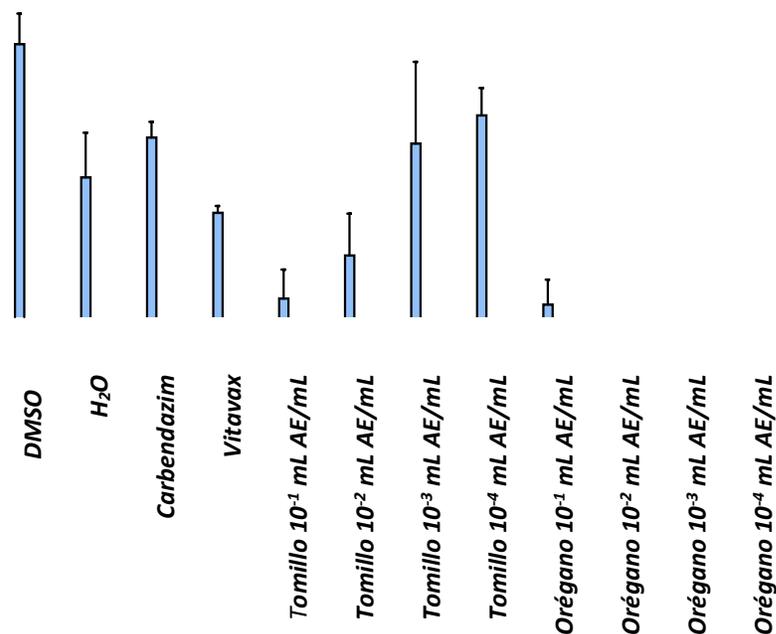


Figura 24. Índices fisiológicos con tratamientos de desinfección previa en aceites de tomillo y orégano (48 horas). Fuente: autor

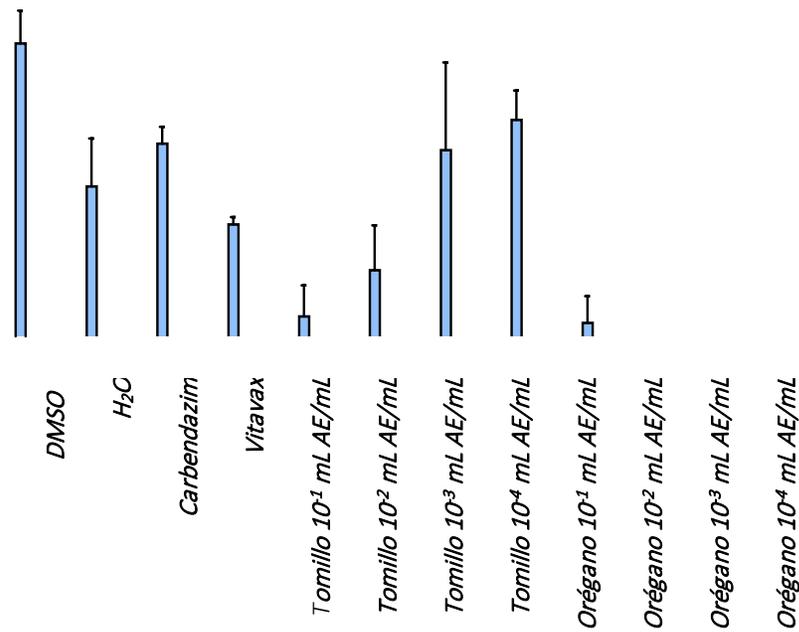
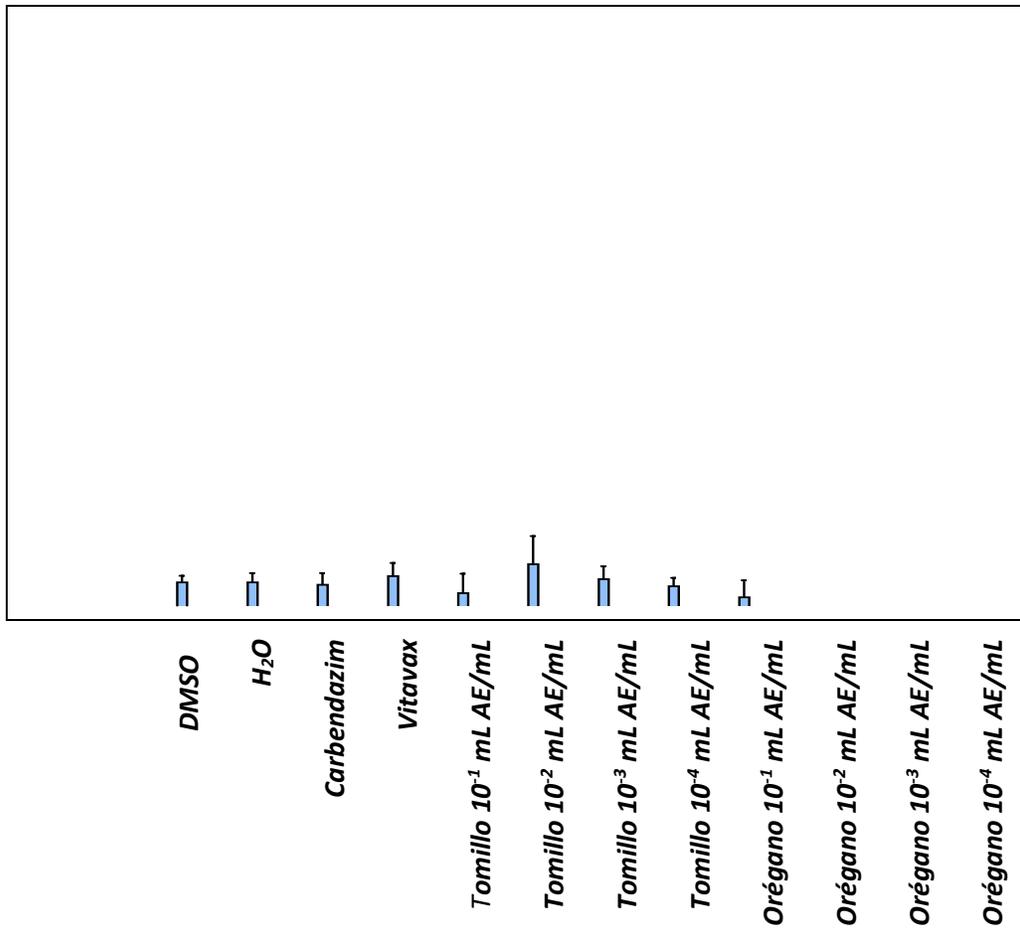


Figura 25. Porcentaje de germinación en semilla con tratamientos de desinfección previa con aceites esenciales de tomillo y orégano (48 horas). Fuente: autor

Hallazgo (ANOVA): No se evidencia ningún efecto significativo sobre el crecimiento de la planta al 4 día de tratamiento (Figura 26, Anexo O)



*Figura 26.* Porcentaje de germinación en semilla con tratamientos de desinfección previa con aceites esenciales de tomillo y orégano (96 horas). Fuente: autor

Con respecto al comparativo en relación al tiempo de 48 y 96 horas entre el aceite esencial de tomillo y orégano en concentraciones de 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> mL AE/mL tienen efecto negativo significativo en el crecimiento de la planta (Figura 27), y su respectivo ANOVA (Anexo P, Anexo Q y Anexo R)

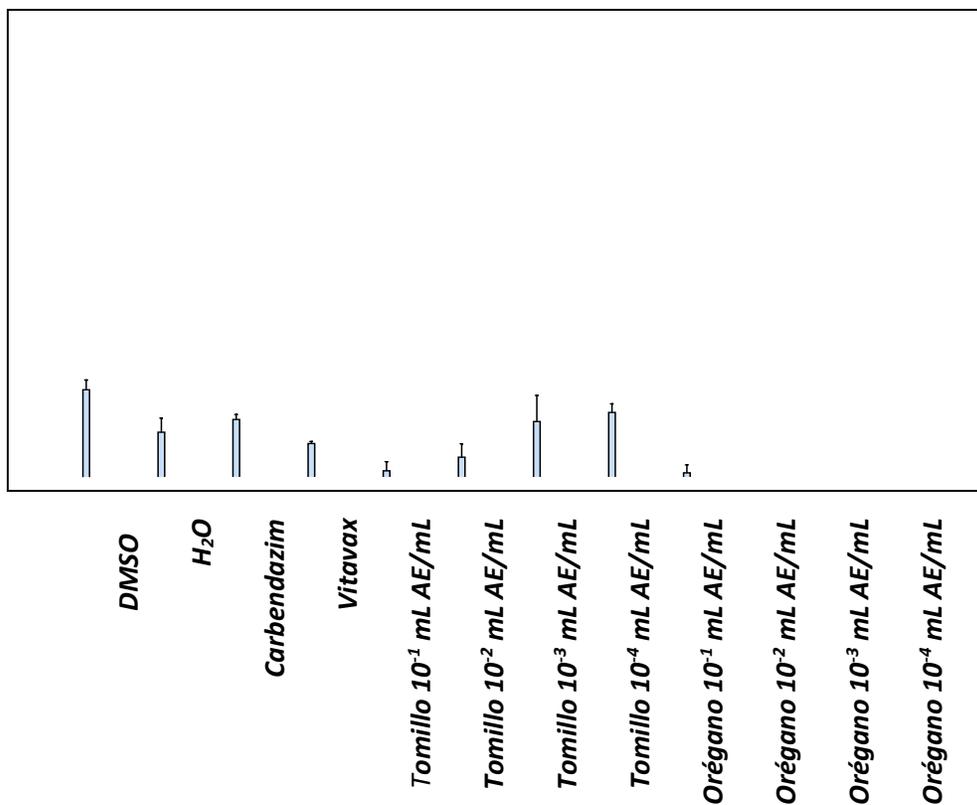


Figura 27. Índices fisiológicos para tratamiento en desinfección en semilla con aceites de tomillo y orégano (48 y 96 horas). Fuente: autor

#### 4.4. Discusión

Son muy pocos los estudios que indiquen algún efecto tóxico de aceites esenciales para el control de hongos que afecten el desarrollo de las semillas. Un reporte en semilla de trigo (*Triticum aestivum*) tratada en diluciones de aceites esenciales de clavo, menta y orégano durante una hora en concentraciones (0.05 - 10%) para mirar su efecto sobre de *Fusarium*, y luego de un periodo de incubación de 7 días, se encontró las dosis más altas de aceites de clavo, menta y orégano inhibieron totalmente el crecimiento de hongos en semillas de trigo, pero también inhibieron la germinación de semillas, las menores dosis no lograron inhibir los hongos en las semillas. Como resultado, se encontró que los aceites esenciales de plantas podrían ser utilizado contra la enfermedad del tizón del trigo como alternativa a los fungicidas (Karaca *et al.*, 2017). De acuerdo con estudios realizados en tomate de árbol (*S. betacea.*), publicado por Alzate (2009), los resultados obtenidos en las evaluaciones de fitotoxicidad se pueden afirmar

que ninguno de los tratamientos afecta el desarrollo foliar de las plantas de tomate de árbol. Los riesgos de fitotoxicidad inherentes a su aplicación bajo las condiciones evaluadas son muy bajos o nulos, incluso manejando dosis y frecuencias de aplicación altas. No obstante, es aventurado asegurar de manera contundente que estos productos sean totalmente inocuos para las estructuras vegetativas y reproductivas de las plantas; es necesario practicar evaluaciones que permitan verificar los efectos sobre la floración, el crecimiento y el desarrollo de frutos, entre otros. (Alzate O. *et al.*, 2009).

Perczak y colaboradores (2020) evaluaron los efectos de AE seleccionados sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* y la biosíntesis de micotoxinas en semillas de maíz. El análisis cromatográfico de ergosterol como indicador de crecimiento fúngico mostró una inhibición significativa del crecimiento de *Fusarium* (83,24–99,99%) en comparación con las muestras de control, lo que como consecuencia resultó en una reducción de las concentraciones de micotoxinas. Se demostró que la adición de AE de canela, palmarosa, naranja y menta verde son eficaces para reducir la concentración de zearalenona (99,10 a 99,92%). El análisis de desoxinivalenol confirmó una disminución de este compuesto en la aplicación de todos los AE analizados (90,69–100%). Los resultados obtenidos indicaron que los AE tienen un gran potencial para inhibir el crecimiento de hongos *Fusarium* y reducir la concentración de micotoxinas en la semilla de maíz.

#### **4.5. Recomendaciones**

Se recomienda realizar un conteo de UFC una vez aplicados los tratamientos sobre semillas maceradas, así mismo establecer los tiempos óptimos del mantenimiento de los tratamientos sobre las semillas y establecer el tiempo de viabilidad de las mismas una vez aplicado el compuesto.

Se recomienda evaluar el efecto antifúngico de los compuestos de manera sinérgica y evaluar en condiciones in vivo la aplicación de los aceites en el establecimiento de plantularios.

## **5. Efecto de la Aplicación de los Tratamientos de Aceites Esenciales de Orégano y Tomillo Sobre el Crecimiento de Hongos Filamentosos en Suelo.**

### **5.1. Introducción**

El suelo es un soporte para las plantas ya que permite el constante suministro de nutrientes, es importante para el sostenimiento de los bosques y la biodiversidad y está relacionado además, con el adecuado uso y equilibrio de los recursos agua, aire y en general de los ecosistemas (Orjuela, 2016; Wall *et al.*, 2019). Los sistemas vivos asociados a este recurso son fundamentales en procesos de transformación de la materia en sus elementos constitutivos para que la dinámica de los nutrientes cumpla con el mantenimiento de una buena estructura y del funcionamiento de este nicho (Finn *et al.*, 2017). Estos procesos de transformación están a cargo de la biodiversidad microbiana entre los cuales hongos y bacterias benéficas ayudan a mantener este equilibrio en el suelo (Wall *et al.*, 2019), por lo que la importancia de la composición e interacción de las poblaciones microbianas asociadas a este son indiscutibles.

En gran medida, la fertilidad del suelo está controlada por las actividades biogeoquímicas de la microbiota que actúa como abastecedor potencial de nutrientes para las plantas, hidrólisis de disacáridos, nitrificación, fijación de nitrógeno y oxidación de metano (Finn *et al.*, 2017), a este nivel, los microorganismos se distribuyen muy irregularmente, y su flujo y concentración dependen fundamentalmente de la disponibilidad de carbono por lo que para determinar en el suelo la presencia, abundancia y actividad de las poblaciones microbianas presentes en un momento determinado se realizan recuentos microbiológicos (Helgason *et al.*, 2014), por medio de la observación de colonias en medios sólidos o por el desarrollo y crecimiento en medios líquidos. Para esto, debido a la alta carga de individuos que poseen las muestras, se realizan diluciones para poder contarlos, las mismas deben hacerse de una forma estandarizada (Luis, 2020).

La enumeración en medios sólidos se fundamenta en que cada bacteria y hongo, desarrollará una colonia que puede corresponder a uno o más individuos con base a este criterio, los recuentos en medios sólidos se expresan como Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro o gramo según corresponda (Luis, 2020).

Los hongos del género *Fusarium* son ampliamente conocidos alrededor del mundo, y se han convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de los seres humanos y de los animales. Como otros fitopatógenos, este hongo emplea diversas estrategias de infección, así también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium*. El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra cerca una planta hospedera, la infección puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo y puede propagarse a través del aire o el agua (Geiser *et al.*, 2013).

Para que la infección se logre con éxito, la interacción hongo-planta responde a un proceso donde se deben movilizar diferentes conjuntos de genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a la superficie de este, la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa contra los compuestos antifúngicos del anfitrión, la inactivación y muerte de las células huésped por micotoxinas segregadas (Agrios, 2005).

Los fungicidas químicos disminuyen la actividad de enzimas del suelo y pueden influir en la mayoría de las reacciones bioquímicas, entre ellas: la mineralización de la M.O, la nitrificación, la de nitrificación, la amonificación, las reacciones redox, y la metanogénesis (Chaves-Bedoya *et al.*, 2013)

## 5.2. Metodología

Con el objeto de evaluar el efecto de los tratamientos y su aplicación directa sobre la microbiota fúngica del suelo, modificando el protocolo de Bi y colaboradores (2012) en un tubo falcón estéril se tomaron 15 gramos de suelo nativo sin esterilizar y se le adicionaron 5mL de aceites esenciales de tomillo y orégano de las diluciones  $10^{-1}$  mL AE/mL hasta  $10^{-4}$  mL AE/mL. Las diluciones seriadas fueron preparadas en DMSO, para la dilución 0.1 mL AE/mL y el consecutivo hasta  $10^{-4}$  mL AE/mL fueron realizadas en agua destilada estéril, las cuales fueron mezcladas vigorosamente en vortex previo a la aplicación de los tratamientos. Como controles se emplearon dos fungicidas químicos Carbendazim (metil-2-benzimidazol carbamato) a una concentración de 500 g/L y Vitavax (carboxin + captan, difenoconazol) en una concentración de 3 mg/mL, como control negativo se hizo uso de agua destilada y una solución de agua con

DMSO de acuerdo con la dilución correspondiente, Los suelos tratados se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 72 horas antes del recuento.

Para determinar el efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de los hongos filamentosos presentes en el suelo nativo, se realizó el recuento en suelo de acuerdo con la metodología propuesta por Paco-Pérez y colaboradores en el año 2017; se tomaron 10 gr de suelo que fueron suspendidos en 100 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta  $10^{-4}$ . Posteriormente, se tomaron  $100\mu\text{L}$  de cada dilución y se sembró por triplicado, en la superficie de placas que contenían agar PDA suplementado con 0.1g/L de cloranfenicol, éstas fueron llevadas a incubación por 7 días a temperatura  $25\pm^{\circ}\text{C}$ . Terminado el tiempo de incubación se hizo el recuento de las colonias de los hongos filamentosos presentes en las placas para cada uno de los tratamientos (Figura 28) (Paco-Pérez et al., 2017).

El recuento se realizó según la norma Icontec 4092, se seleccionaron las cajas que contenían entre 10 y 300 UFC. Posteriormente se calculó la cantidad de microorganismos (N) mediante la siguiente ecuación:

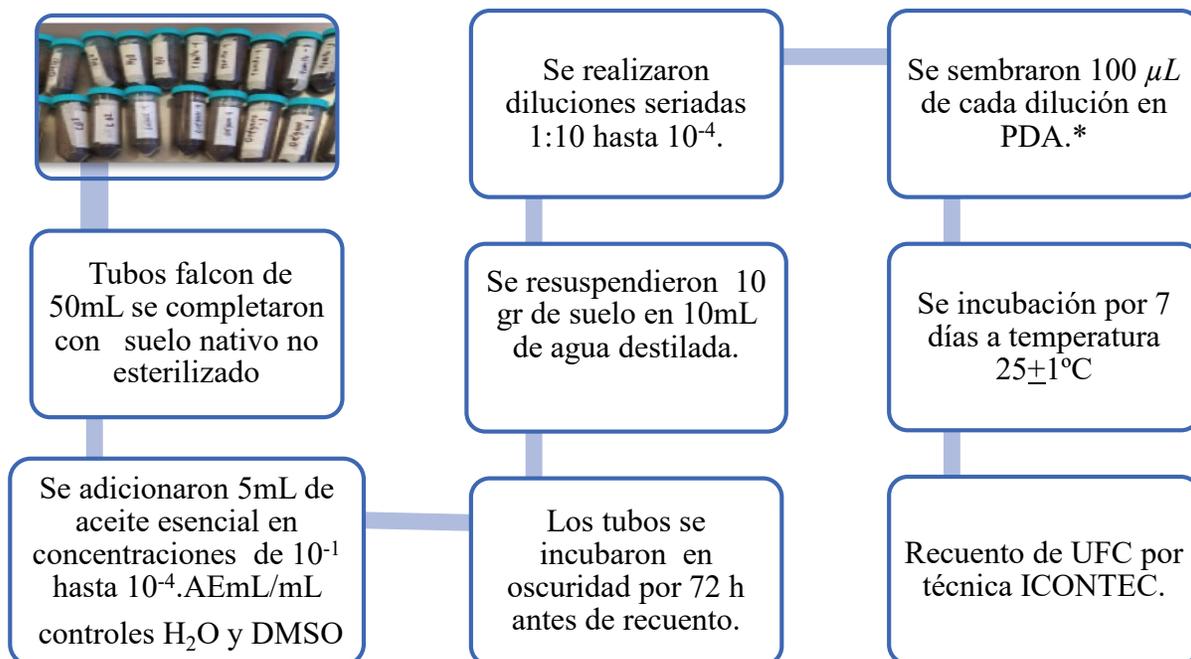
$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d}$$

En donde:

$\sum c$  = suma del número de colonias de las cajas conservadas provenientes de dos diluciones que están dentro del rango 10-300

V = volumen del inóculo en mililitros es un factor de corrección

d= dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada para hacer el recuento



\*Se realizó por triplicado

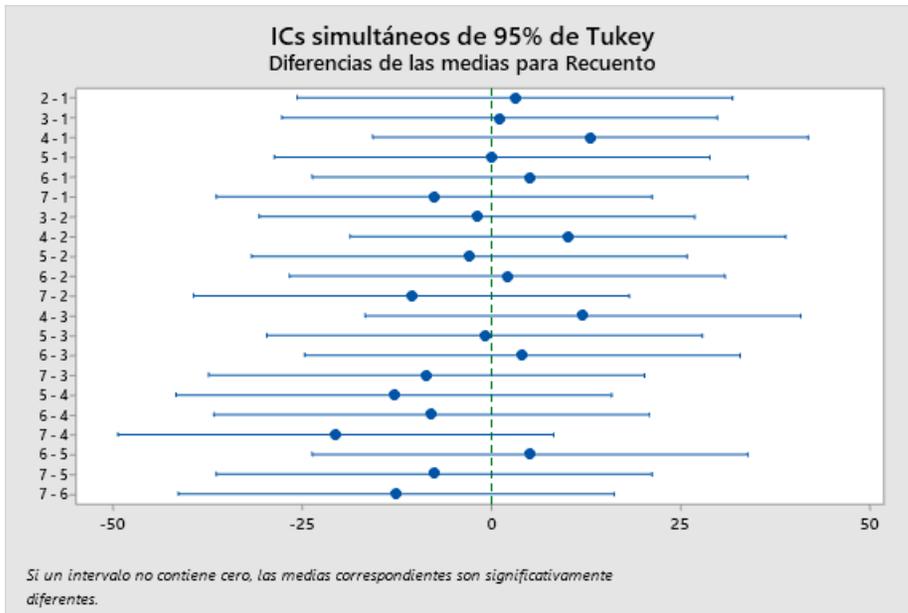
Figura 28. Metodología empleada para conteo de colonias en suelo. Fuente: autor

### 5.3. Resultados

Se determinó la presencia de hongos filamentosos en suelos nativos posterior a la aplicación de los tratamientos. Los datos obtenidos se procesaron mediante análisis de varianza simple y prueba de Tukey para la comparación de medias, con un nivel de confianza del 95 % ( $p \leq 0,05$ ). Se empleó el software estadístico Minitab®, versión 17.0 para Windows.

De acuerdo con la norma el conteo se realizó para la dilución  $10^{-2}$  mL AE/mL, puesto que en esta crecieron el número de colonias adecuadas. Según la prueba de Tukey (Figura 29, Figura 30) los valores de UFC para hongos filamentosos presentes en los suelos nativos permitieron organizar los tratamientos en un solo grupo, evidenciando que no existe diferencia significativa entre los tratamientos Tabla 12. Sin embargo, el tratamiento de tomillo  $10^{-3}$  mL AE/mL presentó el menor número de UFC en la dilución  $10^{-2}$  mL AE/mL (Anexo S, Anexo T). De todos modos, al no hallarse diferencias significativas es posible deducir que, para la aplicación planteada de los tratamientos, estos no tienen ningún efecto positivo o negativo, por lo que se considera

necesario plantear otras aplicaciones incrementando la proporción de los tratamientos por gramo de suelo (Figura 29, Figura 30 y Anexo U)



\*Comparaciones en parejas de Tukey con una confianza de 95%

Figura 29. Prueba de Tukey para conteo de colonias en suelo\* Fuente: autor

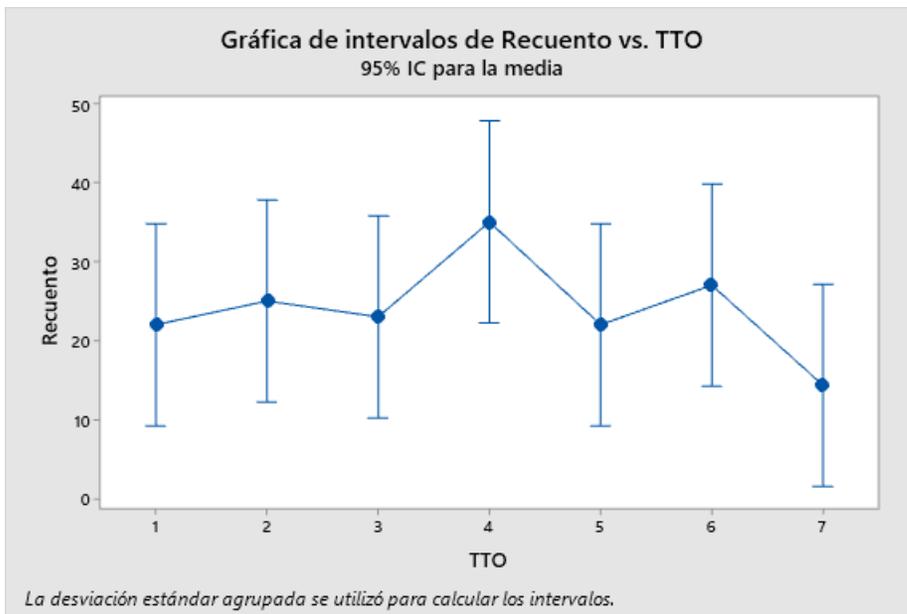


Figura 30. Intervalos de recuento de colonias en suelo. Fuente: autor

Tabla 12.

*Agrupación de datos por tratamiento en suelo*

TTO	N	Media	Agrupación
DMSO	3	35,00	A
H2O	3	27,00	A
Carbendazim	3	25,00	A
Orégano 10 <sup>-4</sup> mL AE/mL	3	23,00	A
Orégano 10 <sup>-3</sup> mL AE/mL	3	22,0	A
Tomillo 10 <sup>-4</sup> mL AE/mL	3	22,00	A
Tomillo 10 <sup>-3</sup> mL AE/mL	3	14,33	A

\*De acuerdo con las diferencias significativas halladas para los tratamientos mediante el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Fuente: autor

#### 5.4. Discusión

Otros análisis en aceites esenciales de eucalipto y orégano en sinergia con antagonistas microbianos se utilizaron para el control de *S. cepivorum*. Los resultados mostraron que la exposición al aceite de eucalipto (10000 ppm) y orégano (200; 250 ppm) inhibieron en un 92% el crecimiento del patógeno; en tanto, que los antagonistas como *Trichoderma asperellum* colonizaron más del 95% de los esclerocios, provocando su degradación in vitro. A pesar de que en estas condiciones se observó la inhibición del crecimiento de *S. cepivorum*, en el bioensayo en el suelo no se evidenció el control de la enfermedad particularmente con las aplicaciones del aceite de orégano; es posible que esto se deba a que el aceite no tuvo un efecto sobre los esclerocios y que, al germinar, posiblemente el aceite ya se había degradado en el suelo. En este sentido, se ha reportado que es necesario evaluar otras concentraciones o formas de aplicación para considerar su uso como alternativa de control de la pudrición blanca (Zapata-Narváez *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha reportado previamente que el aumento de las concentraciones o proporciones pueden incrementar la fitotoxicidad de esta forma.

Tomazoni y colaboradores (2017) al evaluar el efecto fitotóxico observado con el aceite esencial de eucalipto en concentraciones microbicidas lo hace inviable para su uso en el cultivo de ajo, si bien se conoce que este aceite presenta propiedades pesticidas de amplio espectro ya

que diferentes trabajos han demostrado su actividad como compuesto antimicrobiano afectando tanto bacterias como hongos, así como plaguicida - acaricida también se reporta como herbicida (Tomazoni *et al.*, 2017).

Por esta razón las aplicaciones en suelo de AE, se han probado no solo para el control de microorganismos en suelos sino para el control de malezas debido a su toxicidad. En un estudio realizado por Khare y colaboradores (2019) se reportó el uso de AE de *Eucalyptus citriodora*, *Hook Ocimum basilicum L.* y *Mentha arvensis L.* sobre *Angallis arvensis*, *Cyperus rotundus* y *Cynodon dactylon*, se verificó la actividad microbiana de los respectivos suelos, en cuanto a escapes de electrolitos, daño visible en las características de las plantas y se evaluó fitotoxicidad de estos aceites esenciales. Para esto se empleó biomasa microbiana del suelo y enzimas del suelo para evaluar el efecto perjudicial del aceite sobre las actividades biológicas del suelo. Los resultados mostraron que el uso de AE a diferentes concentraciones (50, 75 y 100 mL / L) redujo el crecimiento de malezas, La fitotoxicidad fue más prominente en *A. arvenses*, en cuanto a la disminución de la actividad microbiana del suelo se observó después de la pulverización de EOE, el modelo estadístico evaluado comprobó un efecto inhibitorio insignificante de las actividades biológicas del suelo. Por lo tanto, estos compuestos pueden ser potencialmente empleados como herbicidas (Khare *et al.*, 2019).

Está claro que existe la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías con rendimientos mejorados que también sean de naturaleza ecológica. Debido a la bioactividad de los aceites esenciales (AE) en fase de vapor, su baja toxicidad para los seres humanos y su biodegradabilidad y propiedades antifúngicas, los AE podrían ser una solución adecuada (Střelková *et al.*, 2021).

Pese a los hallazgos en suelo y de acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos con AE pueden ser promisorios en la prevención del complejo *Fusarium* en quinua, a través del tratamiento de semillas, teniendo en cuenta la amplia resistencia de este género a fungicidas ya que los AE de orégano y tomillo presentaron actividad inclusive superior a dichos compuestos. Por lo que se recomienda realizar pruebas *in vivo* para identificar el efecto de dichos tratamientos sobre los factores físicos y biológicos del suelo que permitan el desarrollo óptimo de las plantas de Quinua. Teniendo en cuenta que se determinó que los aceites esenciales de tomillo y orégano, en concentraciones 0.001 mL AE/mL y 0.0001 mL AE/mL, aunque no logran controlar al 100% la propagación del hongo si permiten el crecimiento de la semilla y se

evidencia mejor comportamiento de las semillas con los tratamientos orgánicos que con los tratamientos químicos seleccionados los cuales presentaron un porcentaje por encima del 85% de presencia fúngica post tratamiento, comparado con el orégano en concentración  $10^{-3}$  mL AE/mL que presentó una incidencia del 63.3%. Para las concentraciones por encima de los valores de  $10^{-4}$  mL AE/MI. Ninguno de los aceites presentó actividad total o parcial, de esta forma se pudiese preservar de mejor manera la microbiota funcional del suelo y realizar una mejor gestión agrícola descrita como la manera de dar forma a los microbiomas del suelo para mejorar su calidad y producción de cultivos y otros servicios de este recurso sin dañar el medio ambiente. Se ha descrito que la integración del conocimiento de los microbiomas del suelo en diferentes niveles de la red alimentaria es el futuro de la ciencia del suelo y podría ser una de las pistas para mitigar entre otras el cambio climático global (Wall *et al.*, 2019).

### **5.5. Recomendaciones**

Se recomienda evaluar la aplicación de los tratamientos en suelos inoculados con los patógenos evaluados y en condiciones controladas estableciendo la cantidad de compuesto que debe ser aplicado por unidad de suelo a fin de determinar su utilidad o no en la desinfección de suelos, así mismo se recomienda evaluar la toxicidad de dicha aplicación y el efecto sinérgico de los aceites con otros compuestos buscando disminuir las concentraciones de los compuestos sintéticos que presentan toxicidad. Se recomienda realizar pruebas adicionales en todos los ensayos que incluyan la caracterización del suelo, así como sus características físicoquímicas que permitan el establecimiento de cultivos óptimos.

### Conclusiones

Se determinó que el método de extracción es crítico para la obtención de AE para que estos conserven su actividad biológica, ya que el método de Soxhlet no favoreció este proceso y por tanto ninguna de las concentraciones probadas para el aceite esencial de tomillo obtenido por medio de esta técnica inhibió el crecimiento del hongo. Así mismo, se estableció que las concentraciones de carvacrol y de timol dependen del tipo de aceite, encontrándose valores semejantes de carvacrol en orégano reportados similares a los hallados en el presente estudio, lo cual puede ser determinante para los procesos de inhibición de los fitopatógenos, en el caso del timol los valores encontrados son mayores para el tomillo.

Se encontró que la Concentración mínima inhibitoria para los aceites comerciales de tomillo y orégano correspondió a  $10^{-2}$  mL y  $10^{-3}$  mL AE/mL respectivamente, estableciendo que la aplicación de aceites esenciales a concentraciones  $10^{-3}$  mL y  $10^{-4}$  mL AE/mL pueden ser aplicadas para el tratamiento y desinfección de semillas sin generar efectos nocivos en la germinación y desarrollo de plántulas presentando mejor desarrollo de las semillas que con los tratamientos químicos seleccionados; aunque estas concentraciones no logran controlar al 100% el desarrollo del hongo si permiten el crecimiento de la semilla, las concentraciones 100 mL AE/mL y 1 mL AE/mL de AE de tomillo y orégano respectivamente, presentaron fitotoxicidad ya que inhibieron el desarrollo de las plántulas. De acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos con aceites esenciales pueden ser promisorios en el control del complejo *Fusarium* en quinua inclusive presentando una efectividad superior frente a diversos compuestos, se recomienda realizar pruebas in vivo para identificar el efecto sobre los factores físicos y biológicos del suelo que permitan el desarrollo óptimo de las plantas de Quinua

Se encontró que la aplicación de los aceites esenciales directamente en suelo, no afectan la microbiota fúngica del mismo, sin embargo se plantea la problemática de que tampoco sean funcionales en la desinfección y preparación del suelo ya que se considera que aumentar las concentraciones o la cantidad de compuesto agregado por volumen de suelo puede ser un limitante no solo por el costo de los tratamientos sino de la fitotoxicidad que se pueda presentar, es importante evaluar sinergia entre otro tipo de tratamientos para potenciar el efecto inhibitorio de estos compuestos.

Se determinó que las especies de *Fusarium* y *Alternaria* estudiadas presentan una alta resistencia a fungicidas comerciales, por lo que urge buscar alternativas de manejo de estos dos agentes etiológicos que sean amigables con el ambiente, pero efectivos en su control. Además, diferencia de los fungicidas comerciales los tratamientos con aceites esenciales de tomillo y orégano pueden ser promisorios para la conservación de semillas por lo que se recomienda ampliar el estudio y evaluar aspectos tales como el tiempo de exposición, tiempo de conservación viabilidad en el tiempo, entre otros.

### Referencias

- A. Naeini, T. Ziglari b, H. Shokri, A. R. K. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal of Mycologie Medicale*, 10, 174–178. DOI <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.05.005>
- Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., & Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2019). Pesticides, history, and classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, 29–42. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>
- Al-Qodah, Z., Shawaqfeh, A., & Lafi, W. (2007). Adsorption of pesticides from aqueous solutions using oil shale ash. *Desalination*, 208(1-3), 294–305. Doi: 10.1016/j.desal.2006.06.019
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology 2.0. In RR Donnelley & Sons Company (Ed.), *Molecular Plant Pathology 15(4)*. Elsevier. DOI <https://doi.org/10.1111/mpp.12135>
- Alzate O., D. A., Mier M., G. I., Afanador K., L., Durango R., D. L., & García P., C. M. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116–125.
- Andrade-Bustamante, G., Manelik García-López, A., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzim, C. E., Borboa-Flores, J., & Rueda-Puente, E. O. (2017). Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: Control de fitopatógenos. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(1), 127–142.
- Apaza, V., Cáceres, G., Estrada, R., & Pinedo, R. (2013). Catálogo de Variedades Comerciales de Quinoa en Perú. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Recuperado de <http://www.fao.org/3/as890s/as890s.pdf>
- Arango, O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, A., & Toro, I. (2012). Optimization of yield and thymol content of wild oregano essential oil obtained by steam distillation process. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 217–226. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612012000200025](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200025)

- Arichávala, A. J., Cristina, J., & Cañar, E. N. (2020). The quinoa as a cultural heritage in the gastronomy of the. *Revista de Turismo, Patrimonio y Desarrollo*, 13, 1–25. Recuperado de <http://turpade.com/f/FG101.pdf>
- Barrera Necha, L. L., & García Barrera, L. J. (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.
- Barrera, L., García, L. (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. Recuperado de <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08005>
- Barriandos, E. W. (2020). *Rendimiento y evaluación agro morfológica de 18 progenies de quinoa (chenopodium quinoa willd.) procedentes de cruza simples distantes y cercanas en el cip. Camacani e Illpa.* (Tesis). Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú. Recuperado de <http://tesis.unap.edu.pe/handle/UNAP/15782>
- Beccari, G., Covarelli, L., & Nicholson, P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology*, 60(4), 671–684. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02425.x>
- Beltrán Mayra & Castellanos José. (2016). Manual de Practicas de Laboratorio de Microbiología Ambiental. Universidad de Boyacá.
- Bentley, A.R., Cromey, M.G., Farrokhi-Nejad, R., Leslie, J.F., Summerell, B.A., A., & Burgess, L. (2006). *Fusarium* crown and root rot pathogens associated with wheat and grass stem bases on the South Island of New Zealand. *Aust. Plant Path*, 35, 495–502.
- Bernal, R. *Chenopodium quinoa* Willd. En Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis. 2015. *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K., & Hao, J. J. (2012). Inhibitory effects of essential oils for controlling *phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 96(6), 797–803. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0933>

- Boumar, R., Krimat, S., Boureghda, H., & Dob, T. (2020). Chemical analyses, antioxidant and antifungal effects of oregano and thyme essential oils alone or in combination against selected *Fusarium* species. *International Food Research Journal*, 27(1), 66–77.
- Brazile D., Bertero T., N. C. (2013). Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013.
- Caballero, C. A., Villacorta, L. M., & Vásquez, C. P. (2011). Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays L.*), variedad morado. *Pueblo cont.*, 123-132.
- Caballero., María Alejandra; Castro., Hans Thielin. Análisis in vitro de la actividad biológica de aceites esenciales de orégano y tomillo en hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa L.*). (2018). *Ciencia e Ingeniería*, 5(1), 64, ISSN 2389-9484. Recuperado de <http://revistas.uniguajira.edu.co/rev/index.php/cei/article/view/116>>
- Calderón, C. A., Gutiérrez, J. P., Álvarez, L., Granda, D., Valarezo, E., & Ramírez, C. (2018). PLC-based temperature controller applied to a distiller of essential oils by water-steam drag. Iberian Conference on Information Systems and Technologies, CISTI, 2018-June (June), 1–7. DOI <https://doi.org/10.23919/CISTI.2018.8399308>
- Calle, M., Aguirre, G., Ugarte, M. L., & Gabriel, J. (2010). Efecto del método de secado y nivel de humedad en la germinación y vigor de semillas de Quinoa. 49(January 2010).
- Cancino-Méndez, G., Rosales-Uc, E. M., & Herrera-Chale, F. G. (2018). La inocuidad de lixiviados de biofertilizantes factor de calidad para la agricultura orgánica. *Revista Del Centro de Graduados e Investigación*, 33(72), 121–125. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/335949930>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP). DOI <https://doi.org/cip@cgiar.org>, [www.cipotato.org](http://www.cipotato.org)
- Casas Forero, N., Cote Daza, S., Moncayo Martínez, D., & González Blair, G. (2018). Usos potenciales de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) en la industria alimentaria. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/324672750>

- Cely Torres, L. A., & Ducón Salas, J. C. (2015). Posibilidades en el comercio internacional de la quinua: un análisis desde la perspectiva de la competitividad. *Equidad y Desarrollo*, 24, 119. DOI <https://doi.org/10.19052/ed.3683>
- Cerpa, M.; Palomino, C. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. Valladolid, España: UV
- Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., & Remmal, A. (2005). Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and *in vivo*. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(2), 106–111. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00202.x>
- Chandler, E. A., Simpson, D. R., Thomsett, M. A., & Nicholson, P. (2003). Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(6), 355–367. DOI [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00092-4)
- Chandrasekar, V., Knabel, S. J., Anantheswaran, R. C. (2015). Modeling development of inhibition zones in an agar diffusion bioassay. *Food Science and Nutrition*, 3(5), 394–403. DOI <https://doi.org/10.1002/fsn3.232>
- Chaves-Bedoya, G., Ortíz-Moreno, M. L., & Ortiz-Rojas, L. Y. (2013). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*, 62(1), 66–72. DOI <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag>
- Chiquillo (2019). Presencia de *Fusarium spp.* en cultivos experimentales de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en el departamento de Boyacá. Tercer encuentro de investigación universitaria. En prensa
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). Reference method for broth dilution. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, 3th Ed.*, 28(14), 0–13. Recuperado de [https://clsi.org/media/1461/m27a3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf)
- Cruces, L. M., & Callohauri, Y. (2016). Guía de identificación y control de las principales plagas que afectan a la quinua en la zona andina. (FAO (ed.). Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i5519s.pdf>

- Cuauhtémoc, L. (2018). *Desarrollo de métodos rápidos para verificar la eficacia fungicida de sustancias desinfectantes* (Tesis). Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Veterinaria. España
- Cui, N., Xu, H., Yao, S., He, Y., Zhang, H., & Yu, Y. (2018). Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 25468–25475. DOI <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2587-9>
- da Silva, F. C., Chalfoun, S. M., de Siqueira, V. M., Botelho, D. M. do S., Lima, N., & Batista, L. R. (2012). Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(5), 1002–1010. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102695X2012005000052>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223240764010>
- Delgado, A., Palacios, J., & Betancourt, C. (2009). quinoa Willd .) en el municipio de Iles , Nariño ( Colombia ) Willd .) in the municipality of Iles , Nariño ( Colombia ). *Agronomía Colombiana*, 27(2), 159–167. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/262447392\\_Evaluation\\_of\\_16\\_genotypes\\_of\\_sweet\\_quinoa\\_Chenopodium\\_quinoa\\_Willd\\_in\\_the\\_municipality\\_of\\_Iles\\_Narino\\_Colombia/fulltext/0390786b0cf26e6d785173b7/Evaluation-of-16-genotypes-of-sweet-quinoa-Chenopodium-qui](https://www.researchgate.net/publication/262447392_Evaluation_of_16_genotypes_of_sweet_quinoa_Chenopodium_quinoa_Willd_in_the_municipality_of_Iles_Narino_Colombia/fulltext/0390786b0cf26e6d785173b7/Evaluation-of-16-genotypes-of-sweet-quinoa-Chenopodium-qui)
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745–2749. DOI <https://doi.org/10.1021/jf0527221>

- Doménech, J. (2019). Sus efectos en la salud humana. *Ámbito Farmacéutico Sanidad Ambiental.*, 23, 108–114.
- Duque, A., Espinel, J., & Herran, M. C. (2016). Análisis de los factores productivos que no han permitido el aprovechamiento de la quinua en Colombia (2007-20013). 1–67. Recuperado de [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=finanzas\\_comercio](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=finanzas_comercio)
- Dwivedy, A. K., Prakash, B., Chanotiya, C. S., Bisht, D., & Dubey, N. K. (2017). Chemically characterized *Mentha cardiaca* L. essential oil as plant-based preservative in view of efficacy against biodeteriorating fungi of dry fruits, aflatoxin secretion, lipid peroxidation and safety profile assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 175–184. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.043>
- El-Hage, N., Hattam, C. (2002). Organic agriculture, environment and food security ((FAO) (ed.)). Recuperado de <http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/285489/>
- Estrada Cano, C., Anaya Castro, M. A., Castellanos, L. M., Antonio Garcia Triana, N. A. O., & Ochoa, L. H. (2017). Antifungal Activity of Microcapsulated Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican Orégano (*Lippia berlandieri*) Essential Oils against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 09(01). DOI <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000342>
- FAO, CIDES, C. del saber. (2021). Sistemas alimentarios en América Latina y el Caribe. In *Sistemas alimentarios en América Latina y el Caribe*. DOI <https://doi.org/10.4060/cb5441es>
- FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. 2020. Versión resumida de El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2020. Transformación de los sistemas alimentarios para que promuevan dietas asequibles y saludables. Roma, FAO. DOI <https://doi.org/10.4060/ca9699es>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2018). Plaguicidas usos. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize>
- Feng, W., Chen, J., Zheng, X., & Liu, Q. (2011). Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22(1), 78–81. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.05.010>

- Figueroa-Rivera, M. G., Rodríguez-guerra, R., Zulema, B., González-Chavirá, M. M., Pons-Hernández, J. L., Bajío, C. E., Allende, C. M. De, Cp, M., Jiménez-Bremont, J. F., De, I. P., Potosí, S. L., Cp, M., Ramírez-Pimentel, J. G., Mendoza-Elos, A. M., Roque, I. T. De, Rosas, C. C., Guanajuato, C., Cp, M., & Chico, Z. (2010). Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 124–134. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0185-33092010000200005&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-33092010000200005&lng=pt&nrm=iso)
- Finn, D., Kopittke, P. M., Dennis, P. G., & Dalal, R. C. (2017). Microbial energy and matter transformation in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 111, 176–192. DOI <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.010>
- Franco, R. C., Sánchez, J. M. S., & Soto, R. J. (2005). Determinacion De La Efectividad Fungicida Del Aceite De Orégano Contra Hongos Que Atacan Granos De Maíz Almacenados. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 4(2), 103–108.
- Gabriel, J., Luna, N., Vargas, A., Magne, J., Angulo, A., La Torre, J., & Bonifacio, A. (2013). Quinua de valle (*Chenopodium quinoa Willd.*): fuente valiosa de resistencia genética al mildiu (*Peronospora farinosa Willd.*). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3(2), 94–111. DOI <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2012.030200094>
- Gallo D V, C., Arango, M. R., & Craviotto, R. M. (2008). *Calidad fisiológica y efecto de la presencia de semillas verdes de soja (Glycine max L, Mer) en lotes destinados a simiente* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Córdoba.
- García Parra, M. Á., García Molano, J. F., Melo ortíz, D. I., & Deaquiz Oyola, Y. A. (2017). Respuesta agronómica de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) variedad dulce de Soracá a la fertilización en Ventaquemada-Boyacá. *Cultura Científica*, 15, 66–77. Recuperado de [https://www.jdc.edu.co/revistas/index.php/Cult\\_cient/article/view/28/134](https://www.jdc.edu.co/revistas/index.php/Cult_cient/article/view/28/134)
- García-García R. M.; Palou-García. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectivos de Ingeniería de Alimentos.*, 2(2), 41–51. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-García-Garcia-et-al-2008a.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-García-Garcia-et-al-2008a.pdf)

- Garrido, M. *et al.* (2013). Evaluación del rendimiento de nueve genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) bajo diferentes disponibilidades hídricas en ambiente mediterráneo. *IDESIA (Chile)*, 31(2): 69-76.
- Gaviria-Hernández, V., Patiño-hoyos, L. F., & Saldarriaga-cardona, A. (2013). Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp. en mora de castilla *In vitro* evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp in blackberry. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67–75.
- Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Madan, K., Brandt, M. E., Brown, D. W., Burgess, L. W., Chulze, S., Coleman, J. J., Correll, J. C., Covert, S. F., Crous, P. W., Christina, A., Hoog, G. S. De, Pietro, A. Di, Elmer, W. H., Epstein, L., Frandsen, J. N., ... Viljoen, A. (2013). Concept 1 Letter to the editor: One Fungus, One Name: Defining the genus. *Phytopathology*.
- George, D. R., Finn, R. D., Graham, K. M., & Sparagano, O. A. (2014). Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–12. DOI <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-28>
- Gerbore J., Benhamou, N., Vallance J., Le-Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C. & Rey, P. (2013) Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-013-1807-6
- Ghosal, D., Tarafder, M., & Datta, B. (2020). Fusarium oxysporum isolates showed varied benzimidazole fungicides sensitivity under low temperature and heavy metal stress. *Rhizosphere*, 15, 100227. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100227>
- Gil, Marielsa. (2019). Agar papa dextrosa: fundamento, preparación y uso. Lifeder. Recuperado de. <https://www.lifeder.com/agar-papa-dextrosa/>
- González, F. J., Brasil, M. N., Arias, B. M., Seijo, N. X., & López, P. Y. (2011). *Buenos Suelos Y Suelos " Vírgenes " En Extinción*.
- Granados, C., C., & Yáñez, X., Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12–23. <https://biblat.unam.mx/hevila/BistuaPamplona/2012/vol10/no1/2.pdf>

- Graziano da Silva, J., Jales, M., Rapallo, R., Díaz-Bonilla, E., Girardi, G., del Grossi, M., Luiselli, C., Sotomayor, O., Rodríguez, A., Rodrigues, M., Wander, P., Rodríguez, M., Zuluaga, J., Pérez, D. 2021. Sistemas alimentarios en América Latina y el Caribe - Desafíos en un escenario pospandemia. Panamá, FAO y CIDES. DOI <https://doi.org/10.4060/cb5441es>
- Guerrero-López, A. (2018). *Impacto del cultivo de la quinua (Chenopodium quinoa Willd) como alternativa productiva y socioeconómica en la comunidad indígena Yanacona de La Vega, Cauca, Colombia*. (Tesis de Doctorado en Agroecología), Universidad Nacional de Colombia, 133.
- Han, X., & Parker, T. L. (2017). Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. *Biochimie Open*, 4(March), 73–77. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>
- Helgason, B., Korschun, H., Bedard, A. & Vanderbygaard, A. (2014). Microbial distribution in an eroded landscape: Buried A horizons support abundant and unique communities. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 196, 94–102. Recuperado de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.06.029>
- Hernández, A; Bautista, S; Velázquez del Valle, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar Enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Prospective of plant extracts for controlling postharvest diseases of horticultural products. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119–123. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61030202.pdf>
- Hestbjerg, H., Felding, G., & Elmholt, S. (2002). *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: Correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology*, 150(6), 308–312. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00760.x>
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009). Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Advances in Agronomy*, 102(9). Elsevier Inc. DOI [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(09\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(09)01005-0)
- Jiménez, M. (2020). Evaluación de la actividad antifúngica in vivo del aceite esencial de tomillo (*Tymus vulgaris*) en diferentes concentraciones contra *Collectochum acutatum* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). (Tesis pregrado). Universidad

- Politécnica Salesiana de la Cuenca. Ecuador. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18718/1/UPS-CT008762.pdf>
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., & González-Jaén, M. T. (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(6), 562–568. DOI <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.02.003>
- Karaca, G., Bilginturan, M., & Olgunsoy, P. (2017). Effects of some plant essential oils against fungi on wheat seeds. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S385–S388. DOI <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.53>
- Kermode, A. R. (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Od Growth Regulation*, 24, 319–344. DOI <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0110-2319>
- Khare, P., Srivastava, S., Nigam, N., Singh, A. K., & Singh, S. (2019). Impact of essential oils of *E. citriodora*, *O. basilicum* and *M. arvensis* on three different weeds and soil microbial activities. *Environmental Technology and Innovation*, 14, 100343. DOI <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100343>
- Kozioł, M. J. (1992). Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35–68.
- Leslie J F, S. B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Wiley-Blac).
- Li, D. W., & Yang, C. S. (2004). Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*, 55(February 2004), 31–112. DOI [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)55002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)55002-5)
- Lima, I. O., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., De Oliveira Lima, E., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & De Fátima Formiga Melo Diniz, M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142. DOI <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
- Liu, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2011). Application of ionic liquids-based microwave-assisted simultaneous extraction of carnolic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal*

- of Chromatography A*, 1218(47), 8480–8489. DOI <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.073>
- Liñan, C. (2021). Vademecum de productos agrícolas y nutricionales. In *Portal Tecnoagrícola*. Recuperado de <https://www.buscador.portaltecnoagricola.com/vademecum/col/producto/AGUILA®WG>
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Cai, L., & Crous, P. W. (2019). Changing the game: Resolving systematic issues in key *Fusarium* species complexes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, DOI <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.00>
- Lorenz, K., & Lal, R. (2016). Environmental Impact of Organic Agriculture. *Advances in Agronomy*, 139. Elsevier Inc. DOI <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.05.003>
- Luis, D. D. S. (2020). Medidas cuantitativas de la Población bacteriana en suelos en Microbiología ambiental de suelos (pp. 2–5).
- Marqués, M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica*. (Tesis de pregrado) Universitat Politècnica de Valencia. Recuperado de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/62057/TFG MANUEL MARQUES CAMARENA\\_14489064360187381276109123176571.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/62057/TFG%20MANUEL%20MARQUES%20CAMARENA_14489064360187381276109123176571.pdf?sequence=1)
- Matiz, G., Fuentes, K., León, G. (2015). Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 44(2), 189–207. DOI <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n2.56293>
- Matiz, G., Osorio, M. R., Camacho, F., Atencia, M., & Herazo, J. (2012). Diseño y evaluación in vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*) y ácido acético. *Biomedica*, 32(1), 125–133.
- Melo, G. E. M., Méndez, G. L., & Fortich, M. D. R. O. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 103–116.

- Mendoza, A. A. (2019). *Evaluación de las características físicas y del valor nutricional del grano en cinco variedades de Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) en la estación experimental de Choquenaira* (Tesis pregrado). Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. Bolivia. Recuperado de <https://repositorio.umsa.bo/xmlui/bitstream/handle/123456789/23792/T-2735.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Miller, J. (1994). Conference Report: 6th International Working Conference on Stored-product Protection. *Australian Mycotoxin Newsletter*, 5(2), 1–8.
- Mohammad-Hossein Faghih-Imani, Parissa Taheri, S. T. (2020). View of antifungal and virulence-modulating effects of thyme essential oil against *Fusarium spp.* *Applied Microbiology: Theory & Technology*, 1(1), 1–17. DOI <https://doi.org/https://doi.org/10.37256/amtt.112020132>
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Singh, K. K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 108(February), 162–182. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.039>
- Monkiedje, A., Ilori, M. O., & Spiteller, M. (2002). Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(12), 1939–1948. DOI [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00211-0)
- Monzón, V. (2003). *Evaluación de opciones de manejo de antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) en el cultivo del café en la zona de Boaco* (Tesis pregrado) Universidad Nacional Agraria Managua. Nicaragua. Recuperado de <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnh20m816.pdf>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. (2009). M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. *CLSI Document, M44-A2*(August), 29(17).
- Nitsche M., Gbadamosi R. (2017) Destilación al vapor. En: Guía práctica de diseño de columnas. Springer, Cham. DOI [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51688-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51688-2_7)

- Núñez-torres, D., Bayas-morejón, F., Ramón, R., Vinculación, I., Bolívar, U. E. De, & De, F. (2020). Extraction of Essential Oil From Orange Peel (*Citrus Sinensis* ) By Steam Stripping. *17*(6).
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W., & Geiser, D. M. (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(12), 3851–3861. DOI <https://doi.org/10.1128/JCM.01616-09>
- Oseida, M. Z. V. (2018). *Métodos de extracción de aceite esencial de la semilla de Moringa (Moringa oleífera)* (Tesis pregrado) Universidad Rafael Landívar. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9). DOI <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjrce/2018/06/17/Valencia-Maylin.pdf>
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, *69*(5), 1046–1055. DOI <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1046>
- Oves, M., Khan, M. Z., & Ismail, I. M. I. (2017). Modern age environmental problems and their remediation. *Modern Age Environmental Problems and Their Remediation*, February, 1–237. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64501-8>
- Orjuela, H. B. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de Ciencias Agrícolas*, *33*(2), 117–124.
- Paco-Pérez, V., Loza-Murguía, M. G., VINO-NINA, L., Calani-Bueno, E., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Población fúngica en suelos productores de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), bajo diferentes sistemas de manejo en la comunidad Kerecaya Municipio de Salinas de Garci Mendoza. *Journal of the Selva Andina Research Society*, *8*(1), 26–47. DOI <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2017.080100026>
- Pando, L., Castellanos, E. Aguilar, E. (2017). Guía de Cultivo de la Quinua. In Ediciones Universidad Nacional Agraria (Ed.), Guía de cultivo de la quinua. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (Segunda ed). DOI <https://doi.org/10.1109/JCSSE.2017.8025923>

- Park, J. Y., Kim, S. H., Kim, N. H., Lee, S. W., Jeun, Y. C., & Hong, J. K. (2017). Differential inhibitory activities of four plant essential oils on *In vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* causing *Fusarium* wilt in strawberry plants. *Plant Pathology Journal*, 33(6), 582–588. DOI <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0133>
- Peng, X., Feng, C., Wang, X., Gu, H., Li, J., Zhang, X., Zhang, X., & Yang, L. (2021). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from barks of *Pinus pumila* using microwave-assisted hydrodistillation after screw extrusion treatment. *Industrial Crops and Products*, 166(January), 113489. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113489>
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., & Waśkiewicz, A. (2020). The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. *Growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds*. *Pathogens*, 9(1). DOI <https://doi.org/10.3390/pathogens9010023>
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197, 979–986. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.054>
- Peredo, A., E, Luna, E. Palou – García y López- Malo, A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 9(1), 24–32. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pérez-Corral, D. A., García-González, N. Y., Gallegos-Morales, G., Ruiz-Cisneros, M. F., Berlanga-Reyes, D. I., & Ríos-Velasco, C. (2015). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagónicos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1629. DOI <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i7.555>
- Ramírez, J. G., Osorno, L., & Osorio, N. (2013). Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Caupí Microbiological Alternatives for the Improvement of Cowpea Growth. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(2), 7035–7044.
- Robalino, Alex. Calero, W. (2019). “Eficacia Antimicrobiana de Aceites Esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) Sobre

- Cepas de Pasteurella multocida Y Bordetella bronchiseptica*” (Tesis pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Cevallos – Ecuador. Recuperado de [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30109/1/Tesis\\_157\\_Medicina\\_Veterinaria\\_y\\_Zootecnia\\_-CD\\_641.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30109/1/Tesis_157_Medicina_Veterinaria_y_Zootecnia_-CD_641.pdf)
- Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., Blajos, J., & Santivañez, T. (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. In Oficina Regional para América Latina y el Caribe, FAO, 37. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010>
- Rojas-Armas, Sánchez, J., Ortiz, J., Maldonado, J. J., Quiroz, J. R., Román, R. A., Medicina, F. De, Nacional, U., & San, M. De. (2015). artículos originales Aceite esencial de *Thymus vulgaris L* (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema against *Candida albicans* ; formulation of a cream. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(3), 0–5.
- Romero, G., Heredia, A., & Chaparro Zambrano, H. N. (2018). Germinative potential in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) seeds stored under cool conditions. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(2), 341–350. DOI <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.1076>
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681–687. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007>
- S.A. Palacios, A. Del Canto, J. Erazo, A. M. T. (2021). *Fusarium cerealis* causing *Fusarium* head blight of durum wheat and its associated mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. *International Journal of Food Microbiology*, 346. DOI <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109161>
- Sakkas, H. Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 429–438. DOI <https://doi.org/https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
- Salcedo, S. y T. S. (2014). Recetario Internacional de la Quinoa: Tradición vanguardia. FAO. Recuperado de: <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>

- Sánchez, A. (2019). *Composición química proximal, minerales y capacidad antioxidante de hojas de cuatro variedades de quinua (Chenopodium quinoa) en diferentes etapas fenológicas*. (Tesis pregrado), Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3271>
- Santana, O., Cabrera, R., Giménez, C., González-Colomad, A., Sánchez-Vioquea, R., de los Mozos-Pascuala, M., Rodríguez-Condea, M. F., Laserna-Ruiza, I., & Herraiz, J. U.-A. y D. (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). *Grasas y Aceites*, 63(2), 214–222. <https://doi.org/10.3989/gya.129611>
- Sañudo, B., Arteaga, C. Betancourth, J. Z. & J. B. (2005). Perspectivas de la quinua dulce para la región andina de Nariño.
- Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A. I., Palmateer, A. J., Lopez, P., & Soleymani, A. (2018). In vitro evaluation of eight plant essential oils for controlling *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Fusarium* and *Phytophthora* fruit rots of avocado, mango and papaya. *Plant Protection Science*, 54(3), 153–162. <https://doi.org/10.17221/49/2017-PPS>
- Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
- SEPHU. (2010). Cultivo de la quinua orgánica (*Chenopodium quinoa Willd*) El grano dorado tesoro de los Quechuas y Aymaras. In *Noticias SEPHU*, 51. Recuperado de [https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos\\_y\\_documentos/81972/051---15.07.10---Cultivo-de-la-Qui--769-noa-Orga--769-nica-2.pdf](https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/051---15.07.10---Cultivo-de-la-Qui--769-noa-Orga--769-nica-2.pdf)
- Seufert, V., Ramankutty, N., & Foley, J. A. (2012). Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature*, 485, 229. DOI <https://doi.org/10.1038/nature11069>
- Siroli, Lorenzo, P., Francesca, Montanari, C., Tabanelli, Giulia, B., Eleonora, Gardini, F., & Lanciotti, R. (2014). Characterization of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and definition of its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in vitro system and on foodstuff surfaces. *African Journal of Microbiology Research*, 8(29), 2746–2753. DOI <https://doi.org/10.5897/ajmr2014.6677>
- Sofía, B., Cecilia, D., & Roberto, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Revista Materia*, 20(3), 699–704. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150003.0073>

- Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., Akpulat, H. A., Sahin, F., & Sokmen, A. (2004). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3309–3312. <https://doi.org/10.1021/jf049859g>
- Smith, S. N. (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin*, 16, 97–120. Recuperado de <http://140.112.183.1/cpps/pdf/16-3/p097-120.pdf>
- Soylu, E. M., Kurt, Ş., & Soyly, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Sreenivasa, M. Y., Dass, R. S., Charith Raj, A. P., Nagendra Prasad, M. N., Achar, P. N., & Janardhana, G. R. (2011). Assessment of the growth inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* species isolated from sorghum and maize grains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118(6), 208–213. DOI <https://doi.org/10.1007/BF03356405>
- Střelková, T., Nemes, B., Kovács, A., Novotný, D., Božik, M., & Klouček, P. (2021). Inhibition of fungal strains isolated from cereal grains via vapor phase of essential oils. *Molecules*, 26(5). DOI <https://doi.org/10.3390/molecules26051313>
- Tomazoni, E. Z., Pauletti, G. F., da Silva Ribeiro, R. T., Moura, S., & Schwambach, J. (2017). In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*, 223(April), 72–77. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>
- Torres, J., Romero, H., Santiago, A., & Aritz Castro, R. (2006). Susceptibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* al ajo usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(1), 42–47. Recuperado de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562006000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=e](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562006000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=e)

- Usaquén, María., Zafra, M. (2018). *Evaluación del proceso de obtención de aceite esencial de semilla de mango a nivel laboratorio 1(1)*. (Tesis pregrado). Fundación Universidad de América. Bogotá. Colombia. Recuperado de <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6733/1/1019086449-2018-I-IQ.pdf>
- Valle, V., Aguilar, M., Mercedes, M., Velásquez-valle, R., Mercedes, M., Pabellón, E., & Investigación, L. De. (2004). Características Vegetativas y Susceptibilidad de Variedades de Ajo (*Allium sativum L.*) Infechadas por *Fusarium spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 435–438.
- Vargas Zambrano, P., Arteaga Solorzano, R., & Cruz Viera, L. (2019). Análisis Bibliográfico Sobre El Potencial Nutricional De La Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Como Alimento Funcional. *Centro Azúcar*, 46(4), 89–100.
- Vera, J. L. (2021). Evaluación in planta de la efectividad de cepas de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* como controladores biológicos de *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana L.*). (Tesis pregrado). Pontificia Universidad Católica de Ecuador. Recuperado de [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18704/Trabajo final Johanna Vera.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/18704/Trabajo%20final%20Johanna%20Vera.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales Current situation of *Fusarium spp* in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts Introducción. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. DOI <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007). *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877–885. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>
- Wall, L. G., Gabbarini, L. A., Ferrari, A. E., Frene, J. P., Covelli, J., Reyna, D., & Robledo, N. B. (2019). Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. *Acta Oecologica*, 95(February), 68–73. DOI <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.02.001>

- Wang, M. M., Chen, Q., Diao, Y. Z., Duan, W. J., & Cai, L. (2019). *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 70–89. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.03>
- Wogiatzi, E., Gougoulas, N., Papachatzis, A., Vagelas, I., & Chouliaras, N. (2009). Chemical composition and antimicrobial effects of greek origanum species essential oil. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(3), 1322–1324. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817662>
- Wonglom, P., & Sunpapao, A. (2020). *Fusarium incarnatum* is associated with postharvest fruit rot of muskmelon (*Cucumis melo*). *Journal of Phytopathology*, 168(4), 204–210. <https://doi.org/10.1111/jph.12882>
- Yzarra, W., & López, F. (2011). Manual de Observaciones Fenológicas (p. 98). Ministerio de medio ambiente, Dirección general de agrometeorología (SENAMHI). <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/01401SENA-11.pdf>
- Zapata-Narváez, Y. A., Gómez-Marroquín, M. R., & Botina-Azain, B. L. (2020). Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(2), 1–16. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-2>
- Zaquinaula, H. (2018). “Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Aisladas de Tomate (*Solanum lycopersicum*) Proveniente de la costa central del Perú”. (Tesis pregrado)- Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú. Recuperado de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3513/huarhua-zaquinaula-medali-heidi.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zhu, J. J., Yang, J. J., Wu, G. J., & Jiang, J. G. (2020). Comparative antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of essential oils from *Semen Platycladi* by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 146(February), 112206. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112206>
- Zhu, Z., Chen, L., Zhang, W., Yang, L., Zhu, W., Li, J., Liu, Y., Tong, H., Fu, L., Liu, J., Rasheed, A., Xia, X., He, Z., Hao, Y., & Gao, C. (2020). Genome-Wide Association Analysis of *Fusarium* Head Blight Resistance in Chinese Elite Wheat Lines. *Frontiers in Plant Science*, 11(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00206>

Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*, 53(7), 3347–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>