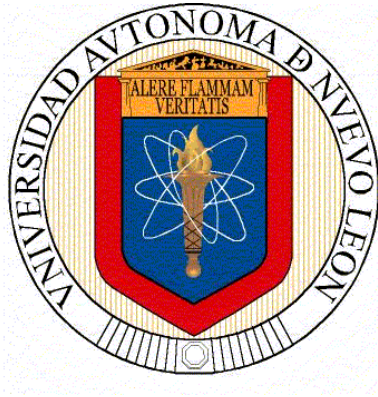


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL Y  
DIFERENTES EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer) SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* TANTO *IN VITRO* COMO EN  
PLÁNTULA DE TOMATE**

**Por**

**MARÍA CRISTINA CUETO WONG**

**Como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS con acentuación en Alimentos**

**Julio 2010**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL Y  
DIFERENTES EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer)  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* TANTO *in vitro* COMO EN  
PLÁNTULA DE TOMATE**



---

**Dra. Catalina Rivas Morales**  
**Director Interno**

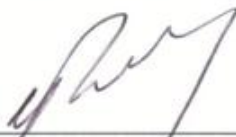
---

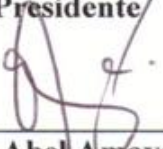
**Dr. Pedro Cano Ríos**  
**Director Externo**

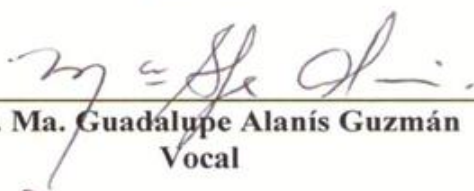
**DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL Y  
DIFERENTES EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer)  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* TANTO *in vitro* COMO EN  
PLÁNTULA DE TOMATE**

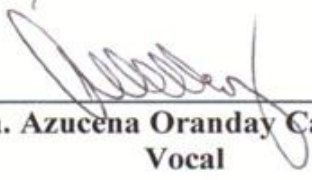



**Comité de Tesis**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Catalina Rivas Morales**  
**Presidente**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Carlos Abel Amaya Guerra**  
**Secretario**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán**  
**Vocal**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Azucena Oranday Cárdenas**  
**Vocal**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ma. Adriana Núñez González**  
**Vocal**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL Y  
DIFERENTES EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer)  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* TANTO *in vitro* COMO EN  
PLÁNTULA DE TOMATE**

Comité Académico de Doctorado

---

---

---

---

---

---

---

---

**Subdirector de Estudios de Posgrado  
Dra. Diana Resendez Pérez**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Catalina Rivas Morales por su apoyo y confianza para realizar este trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán, Dra. Ma. Adriana Núñez González y Dr. Carlos Abel Amaya Guerra por su ayuda y asesoría para llevar a cabo este trabajo y la cordialidad con la que siempre me trataron.

Al Dr. Pedro Cano Ríos por sus consejos y revisiones a este trabajo.

Al Dr. José Alfredo Samaniego Gaxiola por compartir conmigo sus conocimientos.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por brindarme la oportunidad desarrollar parte de este trabajo en sus instalaciones. A la MC Yasmín I. Chew Madinaveitia, IBQ Luis Maconetzin Isidro R., Dr. Urbano Nava C. y Dr. Adrián Vega P.

A mis queridos amigos y compañeros de trabajo, Alejandra, Lourdes, Silvia, Gaby y Fernando por el apoyo y consejos que siempre me han dado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (número de becario: 204383) por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Coahuila por el apoyo brindado para realizar estos estudios.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Aurelio Cueto Nicanor y Ofelia Wong de Cueto por darme la vida y el ejemplo del estudio.

A mi esposo, Juan Carlos por brindarme su amor, apoyo y comprensión y por estar a mi lado.

A mis hijos, Carlos Rodrigo, Abraham Alonso y María Cristina quienes son la bendición más grande que Dios me ha dado y la fuerza que impulsa mi vida.

A mis hermanos y sus familias, Jesús Aurelio, Rosa Ofelia, Rubén, José Antonio, Martha, Cony, Miguel, Román, Luz Elena, Ana, Luis y Lupina, por ser los mejores hermanos y haberme acompañado y apoyado incondicionalmente en todos los momentos importantes y difíciles de mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DIRECCIÓN DE TESIS	i
APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR EL COMITÉ DE TESIS	ii
APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ DE EXAMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos particulares	5
5. ANTECEDENTES	7
5.1 Enfermedades de las plantas	7
5.1.1 Hongos	8
5.1.2 Bacterias	14
5.1.3 Virus	14
5.1.4 Nemátodos	16
5.2 Diseminación de agentes fitopatógenos	16
5.3 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (tomate)	20

5.3.1	Producción de tomate	20
5.3.2	Principales enfermedades del cultivo del tomate	21
5.4	Marchitez causada por <i>Fusarium</i>	22
5.4.1	Agente causal	22
5.4.2	Síntomas	24
5.4.3	Desarrollo de la enfermedad	24
5.4.4	Control	25
5.5	Control de plagas	25
5.5.1	Fungicidas	27
5.5.2	Insecticidas	29
5.5.3	Herbicidas	30
5.5.4	Nematicidas	30
5.6	Uso de aceites esenciales y extractos de plantas para el control de agentes fitopatógenos	30
5.7	Orégano	32
5.7.1	Género <i>Origanum</i>	33
5.7.2	Género <i>Lippia</i>	35
5.8	Capacidad antimicrobiana del género <i>Origanum</i>	37
5.8.1	Extractos crudos	37
5.8.2	Aceites esenciales	38
5.9	Capacidad antimicrobiana del género <i>Lippia</i>	42
6.	MÉTODOS	43
6.1	Origen de los reactivos	43
6.2	Material biológico	43
6.2.1	Material vegetal	43
6.2.2	Aislamiento, producción del inóculo e identificación del microorganismo patógeno	43
6.3	Estrategia de trabajo	44
6.3.1	Obtención del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	44
6.3.2	Análisis químico del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer)	44
6.3.3	Obtención de los extractos	44
6.3.4	Actividad antifúngica del aceite esencial y de los extractos de orégano <i>in vitro</i> por medio de la técnica de difusión en placa	45
6.3.5	Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de <i>F. oxysporum</i> por medio de las fases de contacto y volátil	45
6.3.6	Efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer) sobre la producción de biomasa de <i>F. oxysporum</i>	46
6.3.7	Evaluación de patogenicidad (activación de la virulencia) de <i>F. oxysporum</i>	47



6.3.8	Determinación del nivel óptimo de inóculo y evaluación del efecto antifúngico del aceite esencial de orégano en el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> en semillas de tomate	47
6.3.9	Capacidad desinfectante del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer) en semillas de tomate infestadas con <i>F. oxysporum</i> para el desarrollo de plántulas en cámara de crecimiento	48
6.3.10	Análisis de datos	49
7.	RESULTADOS	50
7.1	Identificación del material vegetal y biológico	52
7.2	Rendimiento y composición química del aceite esencial de orégano	53
7.3	Rendimiento de los extractos	54
7.4	Actividad antifúngica de los extractos obtenidos con hexano, metanol y cloruro de metileno por medio de la prueba de difusión en agar	55
7.5	Inhibición del crecimiento micelial (ICM) de <i>F. oxysporum</i> por medio de las fases de contacto y volátil	56
7.6	Determinación de la producción de la biomasa fúngica	57
7.7	Determinación del nivel de inóculo y efecto antifúngico del aceite esencial de orégano en semillas de tomate infestadas con <i>F. oxysporum</i>	58
7.8	Efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer) sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en plántula de tomate desarrollada en cámara de crecimiento	59
8.	DISCUSIONES	60
9.	CONCLUSIONES	67
10.	LITERATURA CITADA	68
11.	ANEXO Tablas	83
12.	RESUMEN CURRICULAR	87

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Clasificación química de los fungicidas.....	80
II.	Clasificación de los fungicidas en base a su acción sobre las funciones vitales de los hongos.....	81
III.	Especies del género <i>Origanum</i> .....	82
IV.	Resultado del análisis bromatológico de la hojas secas de <i>Poliomintha longiflora</i> y <i>L. berlandieri</i> Schauer.....	83
V.	Principales especies conocidas en México como orégano.....	83
VI.	Rendimiento de los extractos obtenidos.....	51
VII.	Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano sobre <i>F. oxysporum</i> .....	53
VIII.	Actividad antifúngica del extracto hexánico de orégano sobre <i>F. oxysporum</i> .....	54
IX.	Efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano sobre el porcentaje de emergencia de plántulas desarrolladas a partir de semillas infectadas con <i>F. oxysporum</i> .....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de patogénesis genérico de una micosis vegetal.....	11
2. Mecanismo de penetración mecánica fúngica. Haustorio (h) dentro de una célula epidérmica: la punta de penetración del apresorio (ap) atraviesa la cutícula (cu) y la pared de la célula (cw) e invagina la membrana del plasma (pm) y el tonoplasto (t) membrana de la vacuola (vac). Los haustorios con frecuencia penetran hasta las proximidades del núcleo.....	13
3. Estructura química de algunos fungicidas.....	28
4. Estructura química de los componentes mayoritarios en orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer).....	36
5. Amplificaciones por RAPD-PCR con los oligonucleótidos OPB 2 y OPB 8 en Gel de agarosa al 1%. M; marcador de 1Kb. 1; <i>Fusarium oxysporum</i> (cepa caracterizada) 2; <i>Fusarium sp.</i> (aislado de plantas de tomate) 3; <i>Mucor vouxii</i> , 4; <i>Rhizopus nigricans</i> , 5; <i>Trichoderma sp.</i> , 6; <i>Fusarium solani</i> .....	50
6. Cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano ( <i>L. berlandieri</i> Schauer).....	51
7. Actividad antifúngica a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> .....	52
8. Efecto del aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> .....	53
9. Efecto del extracto hexánico de orégano sobre el desarrollo de <i>F. oxysporum</i> .....	53

10.	Efecto a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de <i>F. oxysporum</i> en contacto directo (-●-) y en la fase volátil (-○-)....	54
11.	Actividad antifúngica a diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano sobre el crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> por medio de la fase volátil.....	55
12.	Efecto del aceite esencial de orégano sobre la producción de biomasa de <i>F. oxysporum</i> .....	56
13.	Influencia de diferentes niveles de inóculo en el porcentaje de infestación de semillas de tomate por <i>F. oxysporum</i> . Los datos son el resultado promedio ( $\pm$ SD) de tres repeticiones.....	57
14.	Porcentaje de protección de semillas tratadas con diferentes concentraciones de aceite esencial e infestadas con una suspensión de $10^5$ esporas $\text{ml}^{-1}$ de <i>F. oxysporum</i> . Los datos son promedio ( $\pm$ SD) de tres repeticiones.....	57
15.	Efectividad de la concentración del aceite esencial de orégano sobre la actividad antifúngica en semillas de tomate infestadas con <i>F. oxysporum</i> .....	58
16.	Efecto del aceite esencial de orégano sobre el porcentaje de planta muerta.....	59

## NOMENCLATURA

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
aw	Actividad de agua
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
μl	Microlitros
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo de papa dextrosa
p/v	peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto

## 1. RESUMEN

La marchitez causada por *Fusarium oxysporum* es una de las enfermedades más prevalentes y dañinas en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que causa pérdidas económicas considerables. Para controlar este problema son usados los fungicidas. Desafortunadamente, algunos hongos han desarrollado resistencia a estos productos y tienden a persistir por años en el medio ambiente. Una alternativa a este problema puede ser el uso de aceites esenciales y extractos de plantas. El orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) ha sido reconocido como un importante inhibidor de diferentes microorganismos. En este estudio se determinó la actividad antifúngica del aceite esencial y de los extractos obtenidos con hexano, metanol y cloruro de metileno del orégano Mexicano contra *F. oxysporum*. Los resultados obtenidos por medio de la técnica de difusión en placa indicaron que el aceite esencial del orégano inhibió el crecimiento del hongo en todas las concentraciones probadas, mientras que en los extractos evaluados, la actividad antifúngica sólo fue observada en el extracto hexánico. No se observó diferencia significativa entre los tratamientos de 250 y 500 ppm de dicho extracto y entre las concentraciones de 1.25 y 1.5% en aceite esencial. Las concentraciones mínimas inhibitorias para la fase de contacto y volátil fueron de  $0.2 \mu\text{l ml}^{-1}$  de medio y  $0.15 \mu\text{l ml}^{-1}$  aire respectivamente y la producción de biomasa fue totalmente inhibida a la concentración de  $0.2 \mu\text{l ml}^{-1}$  de caldo. El nivel mínimo de inóculo requerido para producir el 100% de infestación en las semillas fue de  $10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , mientras que la concentración de 0.5 % de aceite esencial inhibió completamente la colonización de las semillas sin afectar su capacidad de germinación. No se encontró diferencia significativa en el porcentaje de germinación de semillas infestadas y tratadas y el porcentaje de mortalidad de plántulas desarrolladas en cámara de crecimiento disminuyó al incrementarse la concentración de aceite esencial empleada para desinfectar las semillas de tomate. Estos resultados muestran el potencial del aceite esencial y del extracto hexánico del orégano Mexicano como un importante inhibidor así como un agente fungicida de *F. oxysporum*.

## ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* is one of the most prevalent and damaging diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) that causes considerable economic losses. Fungicides are used to control this problem. Unfortunately, some fungi have developed resistance to these products and tend to persist for years in the environment. One alternative to this problem could be the use of essential oils and plant extracts. Oregano (*L. berlandieri* Schauer) has been recognized as an important inhibitor of different microorganisms. In this study, the antifungal activity of essential oil and extracts obtained with hexane, methanol and methylene chloride of Mexican oregano was evaluated against *F. oxysporum*. The results obtained by disk diffusion method indicated that oregano essential oil inhibited the growth of the fungus at all concentrations tested, while in the extracts tested, the antifungal activity was only observed in hexane extract. There was no significant difference between treatments of 250 and 500 ppm of the extract and the concentrations of 1.25 and 1.5% essential oil. The minimum inhibitory concentrations of essential oil under contact and volatile phase were  $0.2 \mu\text{l ml}^{-1}$  of medium and  $0.15 \mu\text{l ml}^{-1}$  air respectively and biomass production was totally inhibited at  $0.2 \mu\text{l ml}^{-1}$  of broth. A minimum inoculum of  $10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$  is required to produce 100% of infestation and 0.5% of oregano essential oil completely inhibited the colonization of the fungus without affecting seed germination rates. No significant difference was observed between the percentage of germination of infested and treated seeds, and the percentage of mortality of seedlings developed in growth chamber decreased when the concentration of essential oil used to disinfect tomato seeds was increased. The results of this study clearly showed the capacity of essential oil and hexane extract of Mexican oregano as an important inhibitor as well as fungicide agent against *F. oxysporum*.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades de las plantas que son importantes para los seres humanos. El efecto de estos en los cultivos es devastador y producen pérdidas económicas considerables en todo el mundo. El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las principales hortalizas en un gran número de países ya que posee gran importancia económica. Sin embargo, presenta graves problemas de daños causados por hongos. Entre las enfermedades más importantes de este cultivo se encuentra la Marchitez por *F.oxysporum*.

La marchitez por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans, es una de las enfermedades más dañinas y prevalentes en el cultivo del tomate que causa pérdidas considerables, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables. *F. oxysporum* es un patógeno del suelo; sin embargo, se ha confirmado la introducción de este patógeno a nuevas áreas de producción a través de semillas contaminadas. Por otra parte, algunos estudios han indicado que las semillas infestadas pueden contribuir significativamente a la diseminación de otras especies de *Fusarium* consideradas como patógenos de plantas.

Para controlar el desarrollo de enfermedades producidas por hongos se emplean los fungicidas, desafortunadamente, estos productos químicos no son fácilmente biodegradables; tienden a persistir por años en el medio ambiente y algunos hongos han desarrollado resistencia a ellos. Una alternativa para controlar patógenos de plantas podría ser el uso de aceites esenciales y extractos de plantas. Estos productos han sido estudiados por muchos años y diferentes especies de orégano han demostrado actividad biológica tales como: antifúngica, antibacterial, insecticida, nematicida y antioxidante.



Las especies más comunes de orégano son *Origanum*, nativo de Europa y *Lippia*, nativo de México. Su composición depende de la especie, clima, altitud y etapa de crecimiento. El orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer, *Lippia graveolens*) pertenece a la familia *Verbenaceae*. Es una planta distinta a sus homólogos europeos ya que sus hojas son más grandes y su color verde es de tono oscuro. Así mismo, esta planta posee un sabor mucho más fuerte comparado con otras variedades que es atribuido a su alto contenido de aceites esenciales. En el aceite esencial de esta planta se han identificado más de 25 compuestos volátiles entre los que se encuentran  $\beta$ -mircenol,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno, carvacrol y timol. El aceite esencial de orégano ha sido reconocido como un importante agente antioxidante y se ha demostrado su actividad antifúngica contra hongos contaminantes de alimentos. Además, se ha establecido que tanto el aceite esencial, como el extracto hexánico inhiben el desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

En este trabajo evaluamos la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos obtenidos con metanol, hexano y cloruro de metileno de *L. berlandieri* Schauer (orégano) contra *F. oxysporum* en medio sólido, medio líquido y en plántula de tomate desarrollada en cámara de crecimiento, así como la concentración efectiva de aceite esencial de orégano para la protección de semilla de tomate contra la infestación de *F. oxysporum*.

### **3. HIPÓTESIS**

El aceite esencial y los extractos obtenidos con hexano, metanol y cloruro de metileno de la parte aérea de orégano (*L. berlandieri* Schauer) inhiben el desarrollo de *F. oxysporum* tanto *in vitro* como *in vivo* en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) desarrolladas en cámara de crecimiento.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos hexánico, metanólico y cloruro de metileno de la parte aérea del orégano Mexicano *L. berlandieri* Schauer sobre *F. oxysporum* *in vitro* e *in vivo*.

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1 Obtener el aceite esencial y los extractos hexánico, metanólico y cloruro de metileno, de la parte aérea del orégano (*L. berlandieri* Schauer).
- 2 Determinar la actividad antifúngica y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (CMI) del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en fases de contacto y volátil (*in vitro*).
- 3 Determinar el nivel óptimo de inóculo de *F. oxysporum* para evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial y los extractos de orégano (*L. berlandieri* Schauer) que mostraron esta actividad sobre semillas de tomate (*in vivo*).

- 4 Determinar la concentración del aceite esencial y los extractos de orégano (*L. berlandieri* Schauer) de orégano (*L. berlandieri* Schauer) que actúen como fungicida sobre *F. oxysporum* en la plántula de tomate desarrollada en cámara de crecimiento (*in vivo*).
- 5 Realizar el análisis químico del aceite esencial y/o los extractos de orégano (*L. berlandieri* Schauer) que muestren actividad antifúngica.

## **5. ANTECEDENTES**

### **5.1 Enfermedades de las plantas**

Las enfermedades de las plantas se encuentran entre los factores naturales que más afectan la productividad agrícola (Sosa-Moss *et al.*, 1997). Se clasifican de acuerdo a su efecto sobre el cultivo; es decir, aquellas cuyos daños se manifiestan en la reducción de los rendimientos o bien las que afectan los productos vegetales en sí, aún cuando no ocasionen bajos rendimientos. Las enfermedades aniquiladoras destruyen completamente un cultivo mientras que las enfermedades limitantes hacen incosteable su producción. Las enfermedades devastadoras destruyen cultivos anuales y las debilitantes causan efectos negativos aunque los indicadores son en ocasiones imperceptibles. Finalmente las enfermedades desfigurantes cambian la apariencia de los productos vegetales y en consecuencia su valor comercial, y las enfermedades inhabilitantes imposibilitan a los productos para su consumo (Baver, 1987).

Las enfermedades en las plantas pueden ser causadas por agentes de naturaleza no infecciosa llamados abióticos o bien, por agentes de naturaleza infecciosa o bióticos. Los primeros incluyen factores como temperaturas desfavorables, deficiencia o exceso de humedad en el suelo, desequilibrio de nutrimentos y mala aplicación de pesticidas. Los agentes bióticos son agentes patógenos infecciosos (Díaz, 1993). Cuando los problemas son de tipo abiótico, las plantas quedan debilitadas tornándose menos resistentes frente a los organismos dañinos (Villalva, 2005). Además, las manifestaciones de la enfermedad evolucionan de manera simultánea en toda la planta, pero una vez que el daño completo se ha manifestado no desarrolla más. Cuando se trata de enfermedades de origen biótico las expresiones de la enfermedad van a evolucionar y el daño a aumentar. Este tipo de información permite estimar en qué etapa de daño epidemiológico se encuentra la enfermedad (Durán, 1998).

Para que una enfermedad infecciosa se desarrolle en una planta deben estar presentes tres elementos básicos: un hospedero susceptible, el agente causal u organismo patógeno y las condiciones ambientales propicias para que se desarrolle la infección (Rivera, 2007). Los microorganismos que producen enfermedades en las plantas causan disfunciones que disminuyen su capacidad de supervivencia y, por lo tanto, de mantenerse en su nicho ecológico. En algunas ocasiones las enfermedades microbianas de las plantas han causado migraciones de poblaciones humanas afectadas por el hambre al destruir las cosechas (Atlas y Bartha, 2002).

A las manifestaciones visibles de una enfermedad infecciosa se les denomina síntomas. Los principales síntomas se agrupan en categorías. La marchitez se presenta cuando la planta pierde turgencia y generalmente muere. Las alteraciones del crecimiento incluyen el enanismo, la deformación, las agallas (protuberancias en raíces o tallos por crecimiento o multiplicación celular acelerada) y las llamadas “escobas de bruja” que son proliferaciones anormales de protuberancias laterales cerca del ápice del tallo. Otros síntomas son la muerte de tejido, la cual se puede presentar en distintas formas como necrosis, pudrición y chancro (tejido muerto hundido en tallos y ramas) y las alteraciones en la coloración (Arauz, 1998).

En determinadas enfermedades, además de los síntomas, se presentan signos. Estos pueden ser la producción de estructuras características del agente causal o bien, productos de la enfermedad. Entre las estructuras que producen los agentes causantes de las enfermedades en las partes lesionadas de las plantas y que permiten reconocerlo, se encuentran los esclerocios, clamidosporas, rizomorfos, estomas y exudados en el caso de bacterias y levaduras o micelio en el caso de hongos. Otras estructuras son reproductivas (sexuales o asexuales) como conidios, conidióforos o basidocarpos. Como productos de la enfermedad se tiene a las masas bacteriales, producción de resinas, olores característicos y sabores desagradables. Los microorganismos que tienen más importancia en fitopatología son los hongos, bacterias, virus y nemátodos (Rivera, 2007).

### **5.1.1 Hongos.**

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades de las plantas que son importantes para los seres humanos. El efecto de estos hongos en los cultivos es

devastador y producen pérdidas económicas considerables en todo el mundo (Audesirk *et al.*, 2003).

Los hongos son predominantemente organismos multicelulares, que carecen de clorofila, tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambos componentes y estructuras ramificadas (hifas) que en conjunto se denominan micelio. Una gran variedad de estructuras reproductivas se encuentran en este reino. La taxonomía de los hongos se basa principalmente en la forma y naturaleza de las esporas sexuales, las conidias asexuales y esporangios, la estructura de las hifas, y otras características físicas (morfología). Los perfiles moleculares y bioquímicos también están siendo incorporados a los esquemas taxonómicos (Koike *et al.*, 2007).

De las 100 000 especies de hongos conocidas, se tiene conocimiento que alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y en los animales y que más de 8 000 especies de estos organismos producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2007). Los hongos pueden ser parásitos obligados, es decir, que viven a expensas de plantas vivas, de tal manera que cuando muere la planta que los hospeda, éstos también mueren. Existe otro grupo de hongos que en parte de su ciclo son parásitos en plantas vivas y cuando éstas mueren, ellos continúan viviendo sobre sus despojos. Estos organismos son los parásitos facultativos. Generalmente esto ocurre con hongos cuyo hábitat natural es el suelo. Los hongos saprófitos sólo viven a expensas del tejido muerto o en proceso de necrobiosis (muerte fisiológica de las células o tejidos) y se desarrollan en el tejido que ya ha sido degradado por otros organismos, que ha sido deteriorado por efecto del medio ambiente o que ha sufrido lesiones por golpes o desgarraduras durante la manipulación (Ames, 1997). La mayoría de las plantas pueden ser atacadas por algún tipo de hongo y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a uno o más tipos de plantas aunque sean de diferentes familias (García, 1995).

Los hongos tienen múltiples formas de diseminación. Cuando las esporas son polvosas, el viento, los animales y el hombre pueden transportarlas con relativa facilidad una vez liberadas de la estructura donde se formaron. Si las esporas tienen cubiertas mucilaginosas, las formas de diseminación más eficientes serán el salpique de la lluvia, los insectos y el hombre (Rivera, 2007).

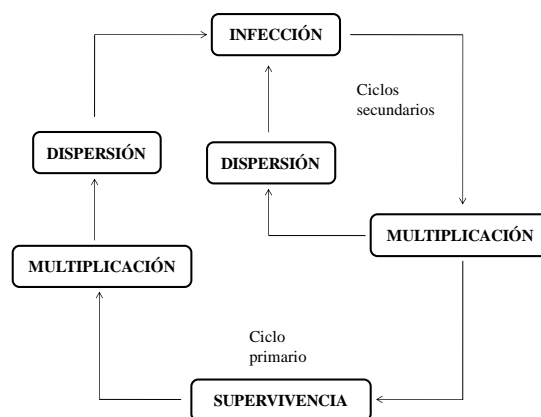
La supervivencia y capacidad de infección de la mayoría de los hongos fitopatógenos depende de condiciones tales como temperatura y humedad. La germinación de los micelios por lo general se da solamente entre los -5 y 45°C en condiciones de humedad adecuadas. Las esporas se mantienen viables durante largos periodos en condiciones ambientales que no permitan la germinación. Algunos cambios en las condiciones ambientales pueden afectar al patógeno, al hospedador o a ambos (Atlas y Bartha, 2002).

En relación a la forma de incubación, se identifican a los hongos endofitos o de desarrollo interno en el huésped. Este es el caso de la mayor parte de los hongos, que sólo desarrollan en la superficie del órgano atacado, el micelio fértil asexual o conidióforos. Por otra parte, los hongos epifitos o de desarrollo externo tienen todo su micelio en el exterior de los órganos vegetales atacados como si fuese un fieltro que los recubre y que, para su alimentación, emiten unas pequeñas ventosas o chupadores llamados haustorios que penetran hasta el interior de las células del huésped (Carrero y Planes, 2008).

El diagnóstico de los hongos fitopatógenos puede efectuarse realizando una prueba preliminar en corto tiempo, esto es, inoculando plantas susceptibles y observando el desarrollo del patógeno dentro de sus tejidos. Otras formas de diagnóstico pueden ser la detección y observación del hongo en los tejidos infectados o bien, la siembra del tejido infectado en un medio sintético para obtener cultivos puros y observar las características de los hongos aislados (Brathwaite y Sosa-Moss, 1995). Para lograr diseñar estrategias para el control de enfermedades, es necesario comprender la epidemiología vegetal, la cual se refiere a la acumulación en el espacio y en el tiempo de numerosos casos de determinada enfermedad. Para que una epidemia se desarrolle se requieren condiciones por parte de la planta (acumulación de individuos susceptibles a ser atacados, aumento en la predisposición a ser atacada y presencia de huéspedes intermediarios adecuados); por parte del patógeno (la presencia de un patógeno agresivo, facultad de reproducción, facilidad de dispersión y capacidad de adaptación) y por parte del ambiente (Heras, 2003).

Una epidemia es la consecuencia de procesos biológicos, designados procesos epidemiológicos. Estos procesos son los ciclos de infección o ciclos de patogénesis.

Cada ciclo de infección es denominado como proceso monocíclico. Por lo tanto, una epidemia es una secuencia de procesos monocíclicos que en conjunto constituyen un proceso policíclico. Este ciclo se constituye por dos sub-ciclos (primario y secundario) y cuatro etapas: supervivencia, multiplicación, dispersión e infección (Figura1). Por lo tanto, en el ciclo vital del patógeno se alternan una fase interactiva con la planta y otra de supervivencia impuesta por la ausencia del huésped o por las condiciones ambientales. En el caso de los hongos, la reproducción sexual suele estar asociada con condiciones ambientales adversas, tales como temperaturas desfavorables o agotamiento del agua o nutrientes. Cuando las condiciones ambientales son favorables y existe disponibilidad de nutrientes, los ciclos que suelen predominar son los secundarios con su producción de esporas asexuales. Estos ciclos secundarios suelen ser los responsables de la mayor parte de los daños económicos. El ciclo primario se inicia después de un periodo de dormancia del patógeno a partir del inóculo producido por las estructuras de supervivencia (inóculo primario). Los ciclos secundarios se inician durante la etapa de actividad del huésped y del patógeno, a partir del inóculo producido tras la multiplicación del patógeno en las infecciones primarias (inóculo secundario). El número de ciclos secundarios, que determina la dinámica de la enfermedad, depende de la estrategia y capacidad reproductiva del patógeno, de la población del huésped y de la favorabilidad del ambiente. Los agentes fitopatógenos se clasifican en dos categorías principales, en relación con los ciclos de patogénesis que originan: monocíclicos y policíclicos. La gran mayoría de los hongos fitopatógenos de suelo son monocíclicos (Hernández y Montoya, 1989).



**Figura 1.** Ciclo de patogénesis genérico de una micosis vegetal



El desarrollo de la enfermedad producida por hongos fitopatógenos es el resultado de su interacción con las plantas, de acuerdo a las etapas de la patogénesis. La etapa de la pre-penetración incluye el crecimiento del patógeno antes de introducirse en el huésped. Durante esta fase, tienen lugar dos importantes eventos: la germinación de las esporas y la formación de estructuras de infección (crecimiento). Para que las esporas germinen se requieren condiciones favorables de temperatura, humedad, etc. La espora debe ser producida asexualmente (clamidospora) o sexualmente (teliospora, oospora, esporangio, etc.), así como también una espora asexual propagativa (de paredes delgadas, de corta duración, con menos nutrientes y de color, forma, estructura y morfología variables). El éxito de la germinación de la espora, está determinada por factores físicos y biológicos. Estos últimos incluyen sustancias secretadas por la superficie de la planta y otros microorganismos presentes en/cercanos a ella. Estos exudados pueden estimular o inhibir la germinación. Los microorganismos no-parasíticos de la rizósfera (zona del suelo alrededor de las raíces que se caracteriza por presentar una intensa actividad biológica), y de la filósfera (superficie de la hoja y el área inmediata adyacente colonizada por una gran variedad de microorganismos no parasíticos) también influyen en la germinación de las esporas. Los exudados de las raíces contienen azúcares y aminoácidos que sirven de nutrientes para los microorganismos. Muchos de estos microorganismos de la filósfera son inhibidores antagonistas de la germinación de las esporas de importantes patógenos de las hojas. Los exudados de las hojas también pueden contener sustancias inhibitorias, inclusive, a hoja por si misma puede contener algunas sustancias inhibitorias (Sharma, 2004).

El mecanismo de penetración ha sido discutido por mucho tiempo. La penetración puede tener lugar de forma mecánica o por digestión enzimática a través de enzimas hidrolíticas secretadas por el patógeno. Estudios citológicos y genéticos indican que una presión generada por los apresorios permite al hongo penetrar la cutícula y la pared celular. Estos son estructuras engrosadas especializadas para la penetración producidas al final del tubo germinativo de la espora (Figura 2). Al madurar el apresorio, su pared incorpora melanina, la cual reduce su porosidad, lo que permite el desarrollo de una alta presión de turgencia dentro de él. Del apresorio se produce una hifa fina de penetración que perfora la cutícula. La penetración de las superficies de la planta puede ser realizada a través de la degradación de la cutícula por enzimas

como las cutinasas que son sintetizadas y secretadas por el hongo. La cutícula tiene tres componentes principales: cutina (matriz polimérica la cual puede ser despolimerizada al romper los enlaces éster); cutano (matriz polimérica resistente a la despolimerización) y ceras (de tipo intra y epicuticulares). La siguiente barrera después de la cutícula es la pared celular. Su degradación requiere de varias enzimas: como celulasas, xilanasas, pectinasas y proteasas (Struck y Mendgen, 1998).

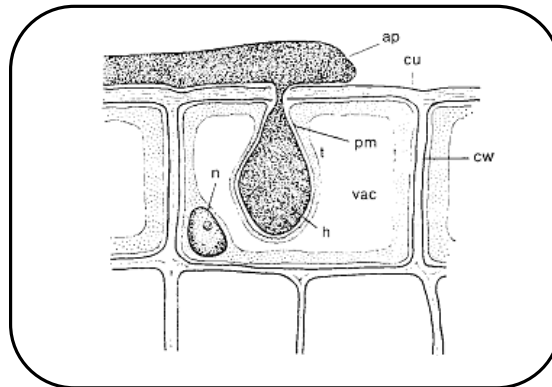


Figura 2. Mecanismo de penetración mecánica fúngica. Haustorio (h) dentro de una célula epidérmica: la punta de penetración del apresorio (ap) atraviesa la cutícula (cu) y la pared de la célula (cw) e invagina la membrana del plasma (pm) y el tonoplasto (t) membrana de la vacuola (vac). Los haustorios con frecuencia penetran hasta las proximidades del núcleo (n).

Los agentes patógenos también pueden penetrar a través de aberturas naturales (como estomas, hidrátodos, nectarios o lenticelas) y a través de heridas. Las plantas sufren rupturas de su cutícula o de su epidermis por varias causas como daño mecánico, daño de insectos, nemátodos y otros herbívoros, cortes de poda, cosecha y otras prácticas y por el crecimiento mismo de la planta (Arauz, 1998).

Posterior a la penetración continúa el proceso de infección y colonización. La infección es el establecimiento del patógeno en el hospedante en condición parasítica. Este término no implica la aparición de síntomas, ya que puede haber un intervalo largo entre los dos. La infección continúa mientras el patógeno actúe dentro del hospedante y este reaccione a su presencia. El patógeno puede colonizar apenas unas pocas células, porciones considerables de tejido o la planta entera. La lesiones pueden localizadas (el área afectada es de tamaño y formas definidas; generalmente son necróticas y de tamaño menor). Las lesiones extensivas se presentan cuando el patógeno avanza por todos los tejidos de uno o varios órganos sin que la lesión se limite a determinada forma y tamaño. Se dice que se tiene una invasión sistémica

cuando el patógeno invade todos los órganos de la planta aunque no llegue a los tejidos de cada órgano. Hay dos tipos de enfermedades sistémicas: las virosis y micoplasmosis, en que el patógeno viaja a través del floema y las marchiteces vasculares (por ej. por *Fusarium*) en que el patógeno se extiende por el xilema. En ambos casos el patógeno alcanza eventualmente tallos, raíces, hojas y frutos; puede quedar limitado al sistema vascular o extenderse hacia los tejidos vecinos (González, 1976).

### **5.1.2 Bacterias.**

La cantidad de enfermedades bacterianas que afecta a los cultivos es menor en comparación con las enfermedades fungosas, ya que existen solamente 200 especies de bacterias fitopatógenas. La mayoría de las bacterias fitopatógenas necesitan cierto grado de asociación con sus hospedantes para sobrevivir en épocas desfavorables. Ninguna especie fitopatógena forma esporas y sólo unas cuantas esporas sobreviven saprofiticamente en el suelo por mucho tiempo, debido a la competencia con otros microorganismos y a la necesidad constante de humedad. Algunas permanecen en hojas caídas, otras son llevadas en las semillas u otros órganos de propagación. Algunas sobreviven en las raíces de hospedantes silvestres y sólo pocas pueden sobrevivir en el suelo por muchos años (González, 1981).

Los géneros de bacterias más comunes asociados a las enfermedades de las plantas son *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Díaz, 1993). Los principales síntomas producidos por bacterias en las plantas son agallas, marchitamientos, secreciones, pudriciones suaves o blandas, pudriciones secas, chancros, quemazones, manchas de las hojas, frutos, y tallos, roñas, etc. (Garcés *et al.*, 1997). Las bacterias fitopatógenas pueden ser diseminadas por lluvia, agua de riego, movimiento de suelo o material de siembra, viento, animales portadores o vectores (Arauz, 1998).

### **5.1.3 Virus.**

Los virus causan una gran variedad de enfermedades en las plantas y serios daños en los cultivos. Las plantas poseen paredes celulares rígidas que los virus no pueden atravesar, de modo que la vía más importante para su propagación lo proporcionan los animales que se alimentan de ellas. A menudo los insectos inoculan en las plantas

sanas los virus que llevan en su aparato bucal, procedentes de otras plantas infectadas. Los virus vegetales pueden acumularse en cantidades enormes en el interior de la célula infectada. Por ejemplo el virus del mosaico del tabaco puede representar hasta el 10% del peso en seco de la planta. Los estudios de la interacción entre estos virus y las células huéspedes son limitados, ya que la infección se realiza a través de un insecto vector. Además no se puede disponer en el laboratorio de los cultivos celulares susceptibles de ser infectados por virus vegetales (Santamarina *et al.*, 1997).

En América Latina, las moscas blancas se convirtieron en plagas de importancia económica alrededor de la década de los 70s debido al uso intensivo de productos químicos en cultivos comerciales. El uso de insecticidas no selectivos elimina los enemigos naturales de la mosca blanca y crea resistencia en estas plagas a los insecticidas tradicionales. Las dos especies más dañinas en América Latina son: *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. *B. tabaci* es sin duda la especie de mayor importancia porque ataca a más de 200 cultivos; transmite más de 150 virus y tiene la capacidad de desarrollar biotipos (poblaciones que se diferencian por sus características fisiológicas; por ser más agresivas; por tener mayor capacidad reproductiva; y/o por ser capaces de colonizar un mayor número de hospederos). *T. vaporariorum*, ataca cerca de 250 especies de plantas, también causa daños directos por extracción de nutrientes y facilita el desarrollo de hongos (fumaginas) sobre las plantas colonizadas (Morales *et al.*, 2006).

Los virus de las plantas hortícolas que presentan el mayor riesgo de introducción son los que pueden estar presentes en los órganos utilizados para la propagación vegetativa, principalmente tubérculos, bulbos y rizomas; en las semillas y en los injertos de los frutales o en plantas ornamentales enraizadas, eventualmente infestados por el correspondiente vector (por ejemplo, ovodeposiciones). Los síntomas más comunes que producen los virus en especies vegetales son los mosaicos, las decoloraciones y las manchas (Conti *et al.*, 2000). Las técnicas más utilizadas para identificar virus en plantas son: plantas diferenciales, observación de inclusiones en células afectadas, microscopía electrónica de transmisión y métodos inmunológicos (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

#### **5.1.4 Nemátodos**

Los nemátodos fitoparásitos causan severas pérdidas en la agricultura. Los nemátodos que infectan raíces causan síntomas semejantes a deficiencias nutricionales o hídricas en la parte aérea. Esto es, plantas de poco crecimiento, cloróticas que pueden presentar defoliación o marchitez. En las raíces se pueden encontrar lesiones necróticas, raíces deformes con agallas, raíces engrosadas, cortas, retorcidas o romas o producción excesiva de raíces secundarias. Cuando el ataque se presenta en partes aéreas puede haber necrosis en el follaje, lesiones necróticas en bulbos y tallos, agallas en flores y necrosis del xilema y marchitez en plantas leñosas. En algunas ocasiones se pueden observar signos externos del nemátodo como masas de huevos o quistes (Arauz, 1998).

Los nemátodos, conocidos también como anguítulas, son pequeñísimos gusanos cilíndricos o fusiformes y suelen medir de 0.3 a 5  $\mu\text{m}$ . Los nemátodos fitoparásitos están ampliamente distribuidos y casi todas las plantas son infestadas por una o más especies. Más de 5000 especies pertenecientes a 200 géneros son reconocidas como parásitos de plantas capaces de causar daño económico a los cultivos (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

Los nemátodos se clasifican de acuerdo a la forma que atacan a los cultivos. Los nemátodos ectoparásitos, viven en el suelo, pican las raíces pero sin quedar fijados en ellas, de forma que al arrancarlas, los nemátodos permanecen en el suelo confundidos con los nemátodos libres o saprófagos que forman parte de los parásitos de origen telúrico y que habitualmente se desarrollan en materias vegetales en descomposición, aunque ocasionalmente pueden ser parásitos facultativos capaces de desarrollarse en tejidos sanos. Los semiendoparásitos son aquellos que fijan la parte anterior de su cuerpo en la raíz, quedando el resto al exterior. Los endoparásitos, viven en el interior de los órganos vegetales atacados (Carrero y Planes, 2008).

#### **5.2 Diseminación de agentes fitopatógenos**

La propagación de agentes fitopatógenos se realiza pasivamente por medio de agentes de dispersión como el aire, el agua, los insectos, otros animales y el hombre. Este último realiza diseminaciones de todo tipo de patógenos, a distancias variables, y en una gran variedad de formas. Dichas dispersiones se llevan a cabo cuando se

manipula sucesivamente plantas sanas y enfermas o cuando se emplean herramientas de trabajo contaminadas. Otras formas de diseminar patógenos se efectúan al transportar suelo contaminado en los zapatos de los trabajadores o equipo agrícola y al utilizar trasplantes, sepas de viveros, yemas y semillas infectadas (Agrios, 2007).

La transmisión de enfermedades en las plantas a través de semillas contaminadas es una de las formas más importantes de introducir agentes fitopatógenos en nuevas áreas de cultivo donde se propagan y posteriormente se establecen. La gran mayoría de los patógenos transmitidos por la semilla se lleva a cabo pasivamente en sus superficies o se establecen como hifas o esporas en, o bajo la cubierta de la semilla. El éxito de transmisión de la infección depende de la localización de la infección en las semillas, de la cantidad de inóculo presente y de las condiciones ambientales (Rennie y Cockerell, 2006).

La presencia de las esporas en la superficie de las semillas puede ser demostrada a través de su lavado con agua seguido de un examen microscópico del sedimento antes o después de su concentración por centrifugación (Gupta, 2004).

Existen reportes que confirman que las semillas son una fuente de contaminación de cultivos para que se establezcan enfermedades producidas por virus, bacterias y hongos. Entre los principales virus transmitidos por esta vía se tiene al virus del mosaico del pepino en espinacas (Cucumber Mosaic Virus, CMV) el cual representa una gran amenaza para la producción de este cultivo ya que produce una condición en la espinaca llamada añublo o quemazón foliar (Yang *et al.*, 1997). Otros virus son el virus *High Plains* (HPV) que se transmite a través de las semillas a muy baja frecuencia en maíz dulce (Forster *et al.*, 2001); el virus del mosaico común de la judía (Bean Common Mosaic Virus, BCMV); el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del bronceado del tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, SWV) (González, 2004).

En el caso de las enfermedades producidas por bacterias y hongos, Randall-Schadel *et al.* (2001) demostraron la transmisión por semilla de *Cylindrocladium parasiticum* en cacahuete. También, al sembrarse bajo condiciones favorables la semilla de girasol (*Helianthus annuus*), proveniente de plantaciones enfermas con la

mancha angular o tizón bacteriano, producida por *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*, se originan plantas con síntomas de la enfermedad (Maselli *et al.*, 2002). Así mismo, *Cephalosporium gramineum*, que desarrolla la enfermedad vascular Cephalosporium stripe en trigo, se transmite en un nivel bajo a las plantas a través de semillas, sin embargo, puede representar una fuente importante de inóculo para introducir el patógeno e iniciar una epidemia en áreas en las que este no se había presentado anteriormente (Murray, 2006).

Algunos de los casos registrados de la presencia de organismos patógenos en la superficie de las semillas son la podredumbre negra (*Pseudomonas compestris*) de la col, el carbón parcial (*Tilletia* spp) del trigo, el carbón cubierto (*Ustilago len's*) de la avena, el carbón cubierto (*Ustilago hordei*) de la cebada, el carbón del tallo (*Urocystis accula*) del centeno, el carbón (*Ustilago crameri*) del mijo y el carbón (*Sphacelotheca sorghi*) del sorgo (Chandniwala, 2005).

No solamente en cultivos para el consumo humano se transmiten enfermedades por medio de semillas contaminadas; también a través de semillas de plantas ornamentales de gran importancia económica como la dalia, se pueden diseminar virus destructores de la producción. Tal es el caso del virus del mosaico de la dalia (*Dahlia mosaic virus*; DMV)(Pahalawatta *et al.*, 2007).

La diseminación de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ocurre mediante semillas contaminadas, plántulas para trasplante infectadas y suelo infestado adherido al cepellón de la plántula de trasplante o diseminado por el viento, el agua y la maquinaria agrícola (The American Phytopathology Society, 2000). Cabe mencionar, que Reis y Boiteux (2007) confirmaron la introducción de este patógeno a nuevas áreas de producción mediante semillas contaminadas.

Por otra parte, la transmisión de diferentes especies de *Fusarium* a través de semillas ha sido reportada en diferentes cultivos. Por ejemplo, García-Garza *et al.* (1999), presentaron evidencia de que *F. oxysporum* f. sp *erythroxyli* puede ser aislado del fruto y la semilla de la coca. Por lo tanto, semillas infestadas pueden contribuir a la diseminación de este patógeno.

Otros autores han referido la transmisión vía semilla contaminada de *F. oxysporum* en naranjilla en Ecuador (Ochoa y Ellis, 2002); de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* en lechuga en Italia (Garibaldi *et al.*, 2004); de *F. verticillioides* en maíz (Wilke *et al.*, 2007) y de *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* en algodón en California (Bennet *et al.*, 2008).

El procedimiento para controlar plagas que afectan a las plántulas consiste en tratar la semilla por medios químicos. Este procedimiento se suele realizar simultáneamente a la preparación y clasificación de la semilla para la siembra y puede realizarse por vía seca y vía húmeda. El primero consiste en recubrir las semillas con un polvo de plaguicida que se adhiere a la superficie. La forma de realizarlo puede ser: discontinua, para pequeñas cantidades de semilla, mediante equipos de desinfección de acondicionamiento manual o mediante un pequeño motor eléctrico, o b) continua, mediante aparatos de dosificación del producto y un sistema de recuperación del producto sobrante. La desinfección por vía húmeda puede realizarse por inmersión o por aspersión. El procedimiento por inmersión sólo es practicable para pequeñas cantidades de semilla mientras que el procedimiento por aspersión también admite las dos modalidades: discontinua rociando un montón de semilla y continua mediante máquinas automáticas (Ortiz-Cañavate, 2003).

Para la desinfección de semillas también se emplean productos como el ácido acético, el hipoclorito de sodio o de calcio y el fosfato trisódico. Así mismo, es de considerar la desinfección por inmersión en soluciones con antibióticos que son efectivos contra algunas bacterias (Nuez, 2003).

Otros métodos para evitar la transmisión de agentes fitopatógenos vía semilla contaminada, es someterlas a diversos tratamientos como: inmersión en agua caliente (48-49°C por 30 min o 50-53°C por 20 min); inmersión en agua fría (6 h) y tratamientos con calor seco por 24 h. Resulta usual que las semillas también se traten con insecticidas o fungicidas. En ocasiones, y a pesar de que la semilla venga desinfectada desde la casa productora, los horticultores tienden a realizar otra desinfección con mezclas de insecticidas o fungicidas previamente a la siembra (Maroto, 2008).



En el caso de semillas de tomate, el tratamiento adicional recomendado para su desinfección, consiste en sumergirlas por 3 min en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% y posteriormente enjuagarlas con agua destilada estéril (Varma *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha confirmado que los tratamientos con NaOCl o HCl, 1N, presentan inhabilidad para desinfectar lotes de semillas de tomate infectadas con *F. oxysporum*, con lo que se demuestra la dificultad de prevenir la diseminación de este patógeno. Dicha inhabilidad probablemente se deba a que las microneuridios, el micelio y algunas veces las clamidosporas del patógeno se encuentran entre las vellosidades de la semilla (Menzies y Jarvis, 1994).

### **5.3 *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate)**

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es una planta originaria de América tropical que fue llevada desde México a Europa y luego propagada por todo el mundo. Es una de las plantas hortícolas de mayor importancia ya que proporciona producto para el consumo fresco y para la industria. Además, es un fruto rico en vitaminas A y C (Giacconi y Escaff, 2004). Esta planta dicotiledónea pertenece a la familia de las *Solanaceae* (subfamilia *Solanoideae*). Actualmente se conocen nueve especies del género *Lycopersicon*; sus semillas son discoidales, amarillentas-grisáceas, velludas, y embebidas en una masa gelatinosa que se encuentra en las cavidades del fruto maduro (Nuez, 2001).

La planta de tomate es clima cálido y sus temperaturas óptimas de crecimiento son de 25°C durante el día y entre 15 y 18°C por la noche. Cuando el cultivo se encuentra a temperaturas por debajo de los 12°C se detiene el crecimiento y por encima de 30-35°C el proceso de polinización se ve afectado, ya que el polen se esteriliza y se presenta aborto floral. Así mismo, la maduración también se ve afectada por la temperatura, tanto en la precocidad como en la coloración, temperaturas cercanas a los 10°C así como superiores a los 30°C desarrollan tonalidades amarillentas (Rodríguez *et al.*, 2006).

#### **5.3.1 Producción de tomate**

Actualmente este cultivo posee una gran importancia económica en todo el mundo. De acuerdo con la FAO la producción mundial de tomate rojo en 2007 fue de 126.2 millones de toneladas. A nivel nacional, el volumen de la producción de

tomate rojo en 2008, según datos preliminares, fue de 2.3 millones de toneladas. Sinaloa es el principal productor a nivel nacional. Se estima que al cierre del 2008 produjo 852.7 mil toneladas que representa el 36.6% de la producción nacional. Baja California y Michoacán son considerados como los estados que ocupan el segundo y tercer lugar de la producción nacional con 206.2 y 175.7 mil toneladas respectivamente (DGAPEAS, 2009).

### **5.3.2 Principales enfermedades que afectan al tomate**

El tomate es una de las hortalizas más importantes cultivadas en México, tanto en superficie como en el valor de su producción. Así mismo, genera empleos y divisas, ya que este cultivo se exporta en grandes cantidades (Valenzuela, 1999). Sin embargo, un número elevado de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus atacan este cultivo desde la siembra hasta la cosecha. Existen cerca de 200 enfermedades del tomate de diversas causas y etiologías, para cuyo control se utilizan cultivares de resistentes, así como medidas de exclusión, erradicación y protección en el contexto de un programa de control integrado. Algunas de estas enfermedades, dependiendo de las condiciones ambientales y de los cuidados pueden causar pérdidas hasta del 100% (Vallejo, 1999).

Entre las enfermedades causadas por bacterias se encuentran: Cáncer bacteriano, Mancha bacteriana, Mancha negra del tomate (*Pseudomonas syringae* p.v. *tomato*), Marchitez bacteriana, Chancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis*), Roña o sarna bacteriana (*Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*) y Podredumbres blandas (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). Dentro de las enfermedades virales se tiene al Virus del bronceado del tomate (TSWV) o Marchitez manchada, Virus del mosaico del pepino (CMV), Virus Y de la patata (PVY), Virus del rizado amarillo del tomate (TYLV), Virus del mosaico del tomate, Virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) y Virus del mosaico del tabaco (TMV) (The American Phytopathological Society, 2000).

La mayoría de las enfermedades en el cultivo del tomate son causadas por hongos. Las enfermedades fungosas son: la Antracnosis, Cáncer del tallo/Alternariosis, Cenicilla, Mancha gris de la hoja, Moho gris, Moho blanco, Tizón temprano, Tizón tardío, Verticilium y La marchitez causada por Fusarium.

#### **5.4 Marchitez causada por *Fusarium***

La Marchitez causada por *Fusarium* o Fusariosis vascular del tomate, fue descrita por primera vez en Europa en 1895 en Guernsey y en la Isla de Wight (Reino Unido) (Smith *et al.*, 1988). Esta enfermedad ha sido señalada en África, Asia, Norte y Suramérica, Australia, Europa, Indias Occidentales y América, en zonas donde el tomate se cultiva desde hace muchos años (Rodríguez *et al.*, 2001). Puede ocasionar pérdidas considerables, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables (Agrios, 2007).

En México se presentan anualmente pérdidas económicas por cientos de millones de pesos a causa de este hongo fitopatógeno ya que limita la explotación de cultivos en regiones completas. Durante el año 2002, en el estado de Sinaloa, el 85% de los campos cultivados con tomate estuvieron infestados con *F. oxysporum* (Apodaca *et al.*, 2002). Además, se dejaron de establecer 13 mil has de tomate entre el año 2001 al 2003 debido en gran parte al ataque de *F. oxysporum* (García citado por Carrillo *et al.*, 2003).

##### **5.4.1 Agente causal**

La marchitez del *Fusarium* es una micosis cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans (Smith *et al.*, 1988). El género *Fusarium* pertenece a la clase *Deuteromycetes* u hongos imperfectos que comprende más de 10 000 especies. Se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza y abundan principalmente en el suelo, materia vegetal y alimentos en descomposición (Pelczar, 1990). Los hongos de esta clase tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular (Ulloa y Hanlin, 1978).

Este grupo incluye a todos los hongos para los cuales no se ha encontrado un ciclo de reproducción sexual, es decir, se reproducen asexualmente, generalmente por medio de conidios (Joklik *et al.*, 1998). Este género comprende muchas especies y muchas variedades dentro de cada especie. Los macronidios son hialinos y fusiformes, a veces pediculados; uni o pluritabcados y con inserción acrógena. Los conidióforos son ramificados, pudiendo aparecer, salpicados o en ramilletes cubiertos por una masa de conidios más o menos mucilaginosos, que forman el cuerpo

fructífero tuberculado conocido como esporodoquio. Este último puede presentar una base plana, conocida como plecténquima. Algunas especies producen macronidios esporádicamente. Las clamidosporas unicelulares o unitabicadas, poseen gruesas paredes y son de inserción terminal o intercalar (Walker, 1975). El micelio es incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido o algo púrpura (Agrios, 2007).

Esta especie produce gran variedad de enzimas líticas que depolimerizan todos los componentes de las paredes vegetales como lo son la celulosa, el xilano, las pectinas, los ácidos poligalacturónicos y las proteínas. Roncero *et al.* (2000), purificó y caracterizó bioquímicamente varias enzimas líticas, una endopoligalacturonasa mayoritaria (PG1), dos exopoligalacturonasas (PG2 y PG3), una endoxilanasas (XYL1), y una endopectato-liasa (PL1). Así mismo, aislaron los genes responsables de algunas de algunas de estas enzimas hidrolíticas: *pg1*, *pgx4*, *pg5*, *xyl2*, *xyl3*, *prt1* y *pl1*.

En el cultivo del tomate, *F.oxysporum* presenta dos formas especializadas que poseen distintas habilidades parasitarias. *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* afecta el sistema vascular de la planta y *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* es capaz de pudrir raíces y cuello hasta ocasionar la muerte de las plantas. Esta última especialización afecta completamente el sistema radical presentándose una podredumbre del córtex y del xilema, seca y de color castaño. Así mismo, pueden desarrollarse chancros en el tallo, generalmente desde la línea del suelo hasta unos 10-30 cm por encima de este (Santos *et al.*, 2004).

*F. oxysporum* tiene una especificidad tal que desarrolla formas especializadas y rasas o patotipos. Actualmente existen 3 rasas o patotipos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Las rasa 0 y 1 se encuentran generalizadas en todo el mundo; la raza 2 se identifica en varios estados de Estados Unidos y en otros países incluyendo Australia, Brasil, Gran Bretaña, Israel, Marruecos, Países Bajos, Iraq y México. Estos patotipos se han inducido por efecto de dos genes de resistencia encontrados en *Lycopersicon pimpinellifolium* e incorporados al tomate (Nuez, 2001).

### **5.4.2 Síntomas**

Los síntomas de la marchitez fusárica varían según el huésped, el patotipo y las condiciones de infección; en general las hojas más viejas muestran al principio un aclarado de venas leve, clorosis de la lámina y/o marchitez, y estos síntomas progresan posteriormente a las hojas jóvenes, a menudo iniciándose unilateralmente en algunas en correspondencia con una infección localizada en parte del sistema vascular de raíz y tallo; las partes afectadas de la planta empardecen. En el tallo aparecen estrías longitudinales necróticas que se extienden hacia el ápice; los síntomas internos pueden verse a simple vista en secciones de raíz, tallo o peciolo. El empardecimiento comienza en el tejido vascular y se extiende al córtex en las fases tardías de la infección. La marchitez se desarrolla con especial rapidez en la floración y fructificación. En los cultivos aparece en focos que se extienden gradualmente, causando la muerte prematura de las plantas afectadas (Smith *et al.*, 1988). Además de los síntomas descritos, pueden aparecer otros como, epinastia de las hojas (curvatura y flacidez sin perder el color verde), formación de botones y raíces adventicias en el tallo (Rodríguez *et al.*, 2001). Cuando las plantas logran sobrevivir, alcanzan escaso desarrollo, sus frutos son pequeños y de mala calidad (Alpi y Tognoni, 1991).

### **5.4.3 Desarrollo de la enfermedad**

El hongo se puede propagar a través de diversas vías. Una vez que el hongo se establece en un campo, se mantiene indefinidamente e invade las plantas sensibles cuando las condiciones son adecuadas (Strand y Flint, 1998). La Fusariosis vascular del tomate es una enfermedad de climas cálidos y prefiere los suelos ácidos y arenosos (Blancard, 1988). El hongo crece por el suelo infestado hasta invadir a través de las heridas que existen en la raíz. Los factores que favorecen el desarrollo de la marchitez son, en general, una temperatura del suelo y del aire de 28°C, una humedad del suelo óptima para el crecimiento vegetal, plantas pre-adaptadas con bajos niveles de N y P y alto de K, bajo pH del suelo, días cortos y baja intensidad de luz. La virulencia del patógeno se ve incrementada por micronutrientes, fósforo y nitrógeno amoniacal, y decrece con el nitrato. La diseminación de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ocurre mediante la semilla, los tutores de tomate, el suelo y las plántulas para trasplante infectadas, o mediante suelo infestado adherido al cepellón de la planta de trasplante infectada. El transporte a larga distancia se produce mediante

semillas y plantas de trasplante, la dispersión a corta distancia se realiza mediante trasplante, tutores, y suelo infestado diseminado por el viento, el agua y maquinaria agrícola (The American Phytopathological Society, 2000).

#### **5.4.4 Control**

Puede realizarse control preventivo y técnicas culturales que consiste en rotación de cultivos, que reduce paulatinamente el patógeno en suelos infectados; eliminación de las plantas enfermas y de los restos del cultivo; utilización de semillas certificadas y trasplantes sanos; utilización de variedades resistentes; desinfección de las estructuras y útiles de trabajo, y solarización. El control químico durante el cultivo no es muy efectivo, aunque pueden realizarse tratamientos preventivos (Smith *et al.*, 1988).

#### **5.5 Control de plagas**

Los pesticidas son sustancias que pueden matar directamente a organismos no deseados o bien controlarlos, esto es, interfiriendo con el proceso reproductivo o bloqueando procesos metabólicos vitales de los organismos (Baird, 2004).

Los plaguicidas juegan un papel importante en la agricultura moderna. En muchos casos, los niveles de producción y rentabilidad de un cultivo sólo se pueden alcanzar mediante la aplicación de estos productos. Sin embargo, frecuentemente el uso indebido de plaguicidas implica una amenaza para los agricultores que los aplican, para los consumidores de los productos agrícolas y para el medio ambiente (Yanggen *et al.*, 2003). A pesar de esto, su consumo se ha incrementado, especialmente en países en vías de desarrollo, donde existe un mayor número de problemas para su control. En 1945, la producción mundial de plaguicidas era de alrededor de 100 000 toneladas, y aumentó a 1 000 000 de toneladas en el año de 1965 y a aproximadamente a 3 000 000 en 1985. Durante las dos últimas décadas el consumo global se mantuvo relativamente estable, hasta 2004, cuando se inició nuevamente un rápido incremento (Ruiz-Frutos *et al.*, 2007).

En México, el uso de plaguicidas se ha concentrado en los estados del noroeste del país, en donde prevalece la agricultura dedicada a cultivos de exportación; no obstante, los estados del sur y centro del país se han ido uniendo poco a poco a esta

tendencia. Actualmente las regiones con mayor uso de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca. Se calcula que en ellas se aplica el 80 % de total de plaguicidas usados en el país. En Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco se consumen cantidades importantes de plaguicidas para producir granos y hortalizas de exportación, como tomate, cucurbitáceas y chile. No hay datos claros sobre la cantidad de plaguicidas que se usa en el país, pero hace pocos años se reportó que se consumían alrededor de 50 000 toneladas anuales de ingrediente activo. El valor actual del mercado se calcula que está entre 400 y 600 millones de dólares US, si bien es posible que este valor subestime la realidad (Albert, 2005). También se ha reportado que los insecticidas emplean las cantidades más altas con un 37% del total, seguido por los fungicidas y herbicidas con un 27 y 26% respectivamente (González-Farías, 2004).

Por lo anterior, los plaguicidas empleados en terapéutica agrícola deben ser efectivos sobre plagas y enfermedades, no ser nocivos para la planta tratada, ser de empleo práctico y económico, ser lo menos tóxico posible para el hombre y los animales domésticos y ser lo menos contaminantes y más respetuosos con el hábitat o el medio ambiente (Carrero y Planes, 2008).

Sin embargo, en México se aplican agroquímicos que han sido restringidos en otros países. De los productos prohibidos en forma total o parcial en México, destaca el paratión etílico que se aplica en 15 estados (en casi el 50% de territorio). Uno de los estados que se caracteriza por emplear con mayor frecuencia este producto es Tamaulipas. En cuanto a productos restringidos en México sobresale el metoxicloro que se aplica en 22 estados (69% del territorio). Entre estos productos se encuentran también los fungicidas Captfol [1,2,3,6-tetrahidro-N-(1,1,2,2-tetracloroetil)ftalimida], Folpet [N-(trichloromethylthio)phthalimide], Maneb ( $C_4H_6N_2S_4Mn$ ) y Quintozeno ( $C_6Cl_5NO_2$ ). Los estados que emplean mayor número de productos restringidos son Aguascalientes, Baja California, Hidalgo, Chihuahua, Colima y el Distrito Federal (Jiménez, 2005).

Resulta importante entonces, antes de aplicar cualquier tipo de plaguicida, considerar la clasificación de estos productos desde el punto de vista toxicológico.

Esta clasificación es: en base a su grado de toxicidad, de acuerdo a su grupo químico y en relación a su acción preferente. El grado de toxicidad se evalúa atendiendo básicamente la toxicidad aguda expresada en DL<sub>50</sub> (por vía oral o dérmica en rata) o en CL<sub>50</sub> (por vía respiratoria en rata). Así se tiene a los plaguicidas nocivos, que son aquellos que por cualquier vía de penetración sólo producen riesgos de gravedad limitada. Los plaguicidas tóxicos producen riesgos graves, agudos o crónicos, mientras que los plaguicidas muy tóxicos producen riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos e incluso la muerte. La clasificación de acuerdo a su grupo químico es la de mayor interés sanitario ya que los efectos sobre la salud son característicos y diferentes para cada uno de los grupos definidos. En relación a su acción preferente, los productos, según su acción específica sobre la plaga o enfermedad que controlen, reciben el nombre de fungicidas, insecticidas, herbicidas, y nematocidas entre otros (Gil, 2005).

### **5.5.1 Fungicidas**

Los fungicidas se han definido como compuestos sintéticos o biosintéticos que se utilizan para controlar las enfermedades de las plantas causadas por hongos (Pelczar, 1990). Para que un producto químico sea considerado como fungicida debe cumplir con ciertos requisitos. En primer lugar, un fungicida debe tener una fitotoxicidad muy baja, de lo contrario causará daño a la planta hospedera durante su aplicación. Así mismo, debe ser fungitóxico por sí mismo o tener la capacidad de convertirse en un fungitóxico dentro de la espora fungosa, además, deberá actuar rápidamente antes de que la infección fungosa penetre la cutícula de la planta. Por otra parte, generalmente el fungicida debe tener la capacidad de penetrar la espora fungosa y alcanzar el sitio de acción fundamental en el hongo. Por último, la mayoría de los fungicidas de protección agrícola se aplican por medio de rociadores foliares, por lo que deberán tener la capacidad de adherirse con firmeza a las plantas y así poder resistir los efectos climatológicos por largos periodos (Cremlyn, 1982).

Durante los últimos años se han sintetizado cientos de fungicidas y varias decenas tienen aplicación en forma de pulverizaciones foliares, de gránulos para tratamiento del suelo, para tratamientos de frutos y como recubrimientos para semillas. Los fungicidas presentan una gran diversidad de estructuras activas con poca relación entre ellas; cada producto se usa, específicamente, contra una o unas pocas especies



de hongos; esto puede deberse a una diversidad en los mecanismos de acción o a sensibilidades específicas de cada patógeno (Primo, 1995).

La clasificación desde el punto de vista químico aparecen en la Tabla I (ANEXO) y las fórmulas de los compuestos de mayor uso se presentan en la Figura 3. También se han clasificado como fungicidas de contacto, translaminares o sistémicos. Los primeros son preventivos, son efectivos frente a diferentes enfermedades, deben penetrar a la planta por lo que son lavados por lluvia o riego y no migran en la planta por lo que los nuevos brotes no están protegidos. Al actuar por contacto no se crean resistencias por parte del hongo. Los fungicidas translaminares entran a la planta no a través de la savia, sino translaminarmente, pasando de una célula a otra; no protegen los órganos de la planta que se han formado después del tratamiento; su modo de acción es preventiva y curativa en los primeros días de la incubación por bloqueo de la protección del micelio; tienen acción antiesporulante al reducir tanto la producción de conidias como su germinación. Los fungicidas sistémicos penetran y emigran por la planta, por lo que no hay riesgo de que sean lavados; tienen acción preventiva y curativa; protegen los nuevos órganos formados después del tratamiento. La efectividad depende de la humedad relativa, temperatura, crecimiento de la planta, presión de la enfermedad, etc. Una desventaja de estos productos es que aparecen cepas del hongo resistentes por lo que no se deben repetir tratamientos con la misma materia activa (Alonso, 2002).

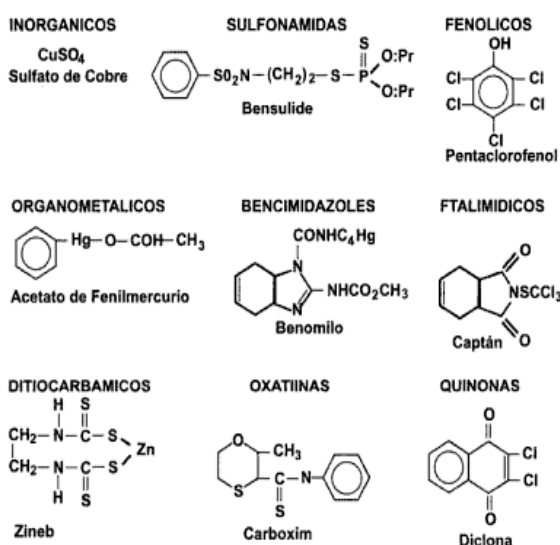


Figura 3. Estructura química de algunos fungicidas

Otra manera más de clasificar a los hongos es en base a su acción sobre las funciones vitales de los hongos (Tabla II) (ANEXO).

Cabe resaltar que a pesar de su importancia para la agricultura, algunos de estos fungicidas representan efectos adversos en el ambiente, por ejemplo, todos los fungicidas ditiocarbamáticos contienen un átomo metálico el cual es un contaminante permanente; en consecuencia, el uso de estos productos aumenta la concentración de dichos metales en el suelo y modifica los ciclos biogeoquímicos respectivos con todas las consecuencias adversas que se derivan de esto. También el fungicida fenólico pentaclorofenol (PCP) es altamente tóxico y, como resultado de sus propiedades biocidas, afecta adversamente a los organismos en suelo y agua en concentraciones relativamente bajas (Bárcenas, 2005).

Por lo anterior, en los últimos años la opinión pública para reducir el uso de fungicidas sintéticos en la agricultura ha aumentado. Se han expresado inquietudes tanto en el impacto ambiental así como un riesgo potencial para la salud relacionados con el uso de estos compuestos (Abad *et al.*, 2007)

### **5.5.2 Insecticidas**

De manera general los insecticidas se clasifican en insecticidas gaseosos, insecticidas de ingestión e insecticidas de contacto. Los primeros son gases propiamente dichos o vapores de productos volátiles. Su empleo exige precaución con la finalidad de evitar accidentes. Los insecticidas de ingestión incluyen sustancias minerales como compuestos arsenicales, compuestos fluorados y compuestos forforados. Los insecticidas de contacto comprenden sustancias de origen mineral y vegetal, así como aceites y carburos. Entre los insecticidas de origen mineral se encuentran los polisulfuros, mientras que en los de origen vegetal figura la nicotina (Martí y Desoille, 2002). Los insecticidas organoclorados, contienen carbono, cloro e hidrógeno. Uno de los productos más representativos de este grupo es el DDT, el cual se biomagnifica en la cadena alimentaria debido a su persistencia, baja solubilidad en agua, elevada solubilidad en tejido graso y alta resistencia al metabolismo de los seres vivos. Los organofosforados son bastante tóxicos a los vertebrados, pero de poca persistencia. Los organosulfurosos son mejores acaricidas

que insecticidas. Por otra parte, los carbamánicos combaten a los insectos inhibiendo una enzima en las células nerviosas causando parálisis (Campos, 2003).

### **5.5.3 Herbicidas**

Los herbicidas se clasifican de acuerdo a su acción en: herbicidas de contacto, que actúan destruyendo únicamente lo que tocan; herbicidas de translocación, son los que después de haber sido absorbidos por las hojas se trasladan al resto de la planta y matan por toxicidad; herbicidas de preemergencia que son los que se aplican cuando el terreno está limpio de malas hierbas o bien cuando la semilla recién germinada posee unas pocas hojas pequeñas, es decir, su principal acción va encaminada a inutilizar la semilla y los herbicidas de pre y post-emergencia que actúan sobre las malas hierbas establecidas e impiden el nacimiento de otras (Amorós, 2003).

### **5.5.4 Nematicidas**

Estos productos atacan los nemátodos del suelo que producen graves daños en frutales y hortalizas al atacar raíces, bulbos y tubérculos y su toxicidad es generalmente alta. Un grupo de nematicidas son gaseosos o volátiles (bromuro de metilo, di-bromocloropropano); otros se convierten en productos gaseosos después de su aplicación (meta, dazomet); ambos son empleados como fumigantes del suelo y pueden destruir también insectos y hongos (Primo, 1995).

En los últimos años se desarrollaron varios nematicidas de amplio espectro que fueron ampliamente efectivos. Sin embargo, varios de estos productos han sido retirados del mercado como consecuencia de las regulaciones establecidas. Los trabajos de investigación han intensificado el desarrollo de plantas resistentes al ataque por nemátodos por medio de genes de resistencia. También, varios agentes para control biológico han sido identificados, pero sus usos prácticos en el campo están todavía por demostrar (Vidhyasekaran, 2004).

## **5.6 Uso de aceites esenciales y extractos de plantas para el control de agentes fitopatógenos.**

En los últimos años la sociedad ha priorizado los aspectos ambientales y ha dirigido un importante número de investigaciones hacia el hallazgo y establecimiento

de nuevas alternativas para el manejo integrado de plagas y enfermedades de las plantas con menos efectos negativos al ambiente (Vaillant *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales y extractos de plantas han demostrado su efectividad antimicrobiana contra agentes fitopatógenos. Tal es el caso de formulaciones a base de extractos de chile en combinación con aceite esencial de mostaza, extractos de casia y extractos de clavo, que reducen la densidad de la población de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* en suelos infestados en un 99.9, 96.1 y 97.5% respectivamente (Bowers y Locke, 2000). Los aceites esenciales de palmarosa y de limón también han demostrado su efectividad como fumigantes de suelo para controlar la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* en tomate en concentraciones de 400 y 700 mg por 425 g de suelo (Pradhanang *et al.*, 2003). Además, las poblaciones en el suelo de *Phytophthora nicotianae* se reducen empleando formulaciones de aceite esencial de clavo y neem en concentraciones de 49.7 y 55.6% respectivamente (Bowers y Locke, 2004).

Otras investigaciones han establecido la actividad antifúngica del extracto acuoso de semillas de *Moringa* spp. para el control de pudriciones en cacahuete (*Arachis hypogea* L.) y de otros hongos postcosecha como *R. stolonifer* (Donli y Dauda, 2003); y de los extractos acuoso y etanólico de Cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert) sobre el desarrollo micelial de importantes hongos fitopatógenos, como *Phytophthora infestans*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cúbense*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Lasiodiplodia teobroma* (Zapata *et al.*, 2003). Por otra parte, bajas concentraciones (10-30%) de extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* pueden ser empleados de manera efectiva para inhibir la producción de biomasa de *Drechsleria tetramera*, *Aspergillus niger* y *Phoma glomerata* (Bajwa *et al.*, 2003).

Destaca también la demostración de las propiedades biocidas del ajo, cebolla y puerro para inhibir el desarrollo *F.moniliforme* y *F. oxysporum radices cucumerinum* (Auger *et al.*, 2004). Otros resultados confirman que los extractos etanólicos el ajo (*Allium sativum* L.), la hierba santa (*Piper auritum*) y el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) reducen significativamente del crecimiento micelial de

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en un 54.34, 48.82 y 39.03% respectivamente (Baños *et al.*, 2004). Además, los sulfuros volátiles: disulfuro de dimetilo (DMDS), disulfuro de dipropilo (DPDS) y disulfuro de dialilo, producidos durante la degradación de los tejidos del género *Allium*, inhiben diferentes especies fúngicas como *Aphanomyces euteiches*, *Colletotrichum coccodes*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum radialis cucumerinum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Auger *et al.*, 2004).

Entre los agentes importantes productores de enfermedades en plantas se encuentra *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind. que produce la pudrición blanda de frutas y hortalizas. El aceite esencial de tomillo (*Thymus glandulosus* Lag. Ex H del Villar) (Plotto *et al.*, 2003) y los extractos de semillas de paraíso blanco (*Moringa oleífera* Lam.) (Velázquez-Gurrola *et al.*, 2005), tienen un efecto fungicida sobre el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *R. stolonifer* en condiciones *in vitro*. Otros extractos de semillas, como los de *Lupinus exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. montanus* (concentración respectiva en alcaloides de 2.42, 1.93 y 1.84%) han demostrado también su capacidad antifúngica sobre el desarrollo del micelio de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum* (Bernal *et al.*, 2005).

También se ha evaluado la actividad fungicida *in vitro* de monoterpenos comúnmente encontrados en aceites esenciales (mentol, timol, alcanfor, citronelal y 1,8 cineol) a concentraciones de 0,5,0,1 y 0,05% p/v sobre *Rhizoctonia solani* que produce enfermedades en papa. Timol, mentol y citronelal inhiben el 100% el crecimiento del hongo empleando concentraciones de 0,1 y 0,5%; mientras que, alcanfor y 1,8 cineol muestran porcentajes menores (Vaillant *et al.*, 2009).

### **5.7 Orégano**

Orégano (*oros*, montaña y *ganos*, ornamenta) es el nombre común que se da a más de 60 especies de plantas de aroma y sabor característicos utilizadas principalmente como especias en diversas partes del mundo. La mayoría de ellas pertenece a las familias Lamiaceae y Verbenaceae de las cuales las más importantes

son las del orégano europeo (*Origanum* sp) y del orégano mexicano (*Lippia* sp.) (Kintzios 2002).

### 5.7.1 Género *Origanum*

El género *Origanum* (tribu Mentheae, familia Labiatae) se caracteriza por poseer una gran diversidad morfológica y química. A este género pertenecen 49 taxones divididos en 10 secciones (Tabla III) (ANEXO) (Padulosi, 1997). Las principales especies comerciales son *O. majorana* L. y *O. vulgare* L., subsp. *hirtum* (Link). Ambas se distribuyen en toda Europa especialmente en los países mediterráneos y están naturalizadas en el Continente Americano.

La subespecie *O. majorana* es una hierba con tallos leñosos y hojas ovaladas blanquecinas; las flores son blancas o rosadas y se acomodan en espigas cortas. Su fruto es seco, con semillas redondas y rojizas (López, 2006). Esta planta contiene sustancias minerales que son fuente importante de componentes aceptados en la dieta como Fe, Zn, Mn y Cu en concentraciones de 612.9, 41.28, 46.53 y 12.38 mg/kg, respectivamente (Golcz y Seidler-Łożykowska, 2009). Requiere temperaturas de 6-28 °C y pH del suelo de 4.9 a 8.7. Las plantas se recolectan en plena floración y se secan en la sombra para reducir la pérdida de color y aroma. Sus hojas se emplean con fines culinarios y terapéuticos (Langer y Hill, 1991).

El aceite esencial se usa en perfumes y cosméticos y su consumo en dosis seguras mejora la función pulmonar en pacientes adultos (42.5±2.0 años) con asma (Mohamed *et al.*, 2008). Otras investigaciones revelan que el extracto etanólico extraído de las flores posee capacidades antioxidantes (Muñoz *et al.*, 2007) y que su extracto acuoso inhibe la acción mutagénica de azida de sodio cuando es empleado como pretratamiento en sistemas vegetales en concentraciones de 50, 100 y 200 µg ml<sup>-1</sup> durante 20 h (Qari, 2008).

Estudios químicos indican que el aceite esencial de *O. majorana* contiene principalmente terpineol-4 (30.3%) (Vági *et al.*, 2005). Otros compuestos como el sesquiterpeno trans sabineno hidrato, 3-ciclo hexen-1-ol y g-terpieno son detectados en aceites extraídos tanto por hidrodestilación como por arrastre de vapor (Meza *et al.*, 2007).

La planta de *O. vulgare* L., subsp. *hirtum* (Link) comúnmente conocida como orégano griego es más aceptada por su gran calidad basada en su elevado contenido en aceite esencial. Requiere suelos ácidos provistos de materia orgánica y se seca a una temperatura inferior a 35°C (Arvy y Gallouin, 2006). Toda la planta está cubierta de pelos glandulares; su tallo es rojizo, anguloso y ramificado. Sus hojas son opuestas, de ovales a elípticas, su ápice es agudo y en las márgenes presenta glándulas ciliadas llenas de aceites esenciales. Sus flores son pedunculadas, labiadas, de color rosa púrpura y blanco (Fonnegra y Jiménez, 2007). Su aceite esencial es amarillo claro que se oxida rápidamente, sobre todo en contacto con el hierro y entonces adquiere una coloración rojiza (Castillo y Martínez, 2007). De manera popular se utiliza para dolores musculares, afecciones respiratorias y trastornos digestivos (Pamplona, 2006). Su acción expectorante se debe a que actúa directamente sobre el epitelio bronquial ejerciendo un efecto irritante y aumentando las secreciones bronquiales. El efecto digestivo y antiespasmódico se justifica por el aumento en la producción de jugos gastrointestinales y por el efecto relajante de la musculatura lisa. No obstante, está contraindicado durante el embarazo y la lactancia. Además, en dosis extraterapéuticas puede tener efectos estupefacientes (Vanaclocha y Cañigüeral, 2006). El aceite esencial de esta especie tiene un buen efecto antioxidante en margarina (Tafur *et al.*, 2005) y en yema de huevo (Bernal *et al.*, 2003). También los extractos obtenidos con etanol y cloroformo evitan la oxidación y el deterioro del color en piezas de carne de cerdo (Hernández-Hernández *et al.*, 2009).

Análisis realizados al aceite esencial por cromatografía de gases con detector de masas reportan un total de 64 compuestos. Los componentes principales son los monoterpenos fenólicos oxigenados carvacrol (59-61.3%) y timol (6.5-13.9%) (Bozin *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Otros compuestos identificados son monoterpenos hidrocarbonados en concentraciones de 11.60 a 26.30%. De estos,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno son los más abundantes. Los monoterpenos oxigenados detectados representan del 5.60 al 33.70% y se detectan además 22 sesquiterpenos hidrocarbonatos. Los compuestos  $\gamma$ -muurolene, (E)- $\beta$ -cariophyllene,  $\beta$ -bisaboleno y  $\delta$ -cadineno se encuentran en mayor concentración. Los sesquiterpenos oxigenados más abundantes son  $\alpha$ -cadinol y spathulenol (Martino *et al.*, 2009).

### 5.7.2 Género *Lippia*

El orégano mexicano pertenece a la familia *Verbenaceae*. Existen diferencias entre este género (*Lippia* sp.) y sus homólogos europeos (*Origanum* sp.); esta planta posee un fuerte aroma y un sabor más nítido y pungente que el de otras variedades. Tales características son atribuidas a su alto contenido en aceites esenciales. Además, sus hojas son más grandes y de color verde oscuro (Dunford y Silva, 2005).

La distribución general de esta especie abarca Estados Unidos (sur de Texas), México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras Nicaragua y Costa Rica. En México, los principales estados productores son Chihuahua, Durango, Nuevo León, Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla y Jalisco. Las especies *Lippia* y *Poliomintha* son las de mayor relevancia comercial. Esta última se distribuye en Coahuila y Nuevo León, particularmente en Allende, Higuera, Linares y Monterrey (Alanís y Ballester, 2007). Estudios realizados demuestran que ambas especies tienen características bromatológicas similares (Tabla IV)(ANEXO) (Aranda *et al.*, 2009).

El volumen de producción del orégano mexicano ha llegado a ser de 2 559 ton anuales, lo que ha representado un valor monetario de 3.2 millones de dólares (Sánchez *et al.*, 2001). Esta planta tiene una gran demanda a nivel mundial. Los principales países importadores de Europa son Alemania, Italia, Grecia, Francia y España. Estados Unidos es el principal país importador de orégano en el mundo. Turquía (61.8%) y México (30.6%) acaparan más del 90% de su abastecimiento (Arizio y Curioni, 2003).

Sin embargo, a pesar de su producción y calidad, su aprovechamiento coincide con el periodo de floración de la planta, limitando la formación de frutos y semillas y, por lo tanto, su reproducción (Ocampo-Velázquez *et al.*, 2009). Para tratar de evitar lo anterior, en México existen dependencias como el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENa), donde han establecido la metodología para desarrollar orégano como cultivo y la extracción del aceite esencial como una alternativa de producción agrícola sustentable (Jacinto *et al.*, 2007).

En la República Mexicana se conocen con el nombre de orégano a aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas que pertenecen a cuatro familias



botánicas y que reciben otros nombres comunes (Tabla V) (ANEXO). Este cultivo es tolerante a distintas condiciones del ambiente físico. Las plantas de estas familias son arbustos que alcanzan hasta 2.5 m de alto y que desarrollan promedio 1.20 m de follaje. Crecen en suelos pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 metros de altitud. Sus usos, tanto culinarios como terapéuticos son los mismos que los de las especies europeas (Huerta, 1997). En la Comarca Lagunera el orégano se desarrolla bajo condiciones naturales y representa una fuente de ingresos económicos extra para los campesinos de las zonas marginadas de esta región. Esto es debido a que su recolección de efectúa después de la temporada de lluvias, una vez que han disminuido las actividades agrícolas en las regiones de temporal (Reyes y Ortega, 2002).

En el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer, *Lippia graveolens* HBK), se han identificado 33 compuestos que incluyen alcoholes, éteres, fenoles y una cetona. Los componentes mayoritarios son timol, carvacrol,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno (Figura 4). Timol es el componente principal que representa del 40% al 60% del total de los compuestos volátiles, mientras que del 5 al 25% corresponde a carvacrol (Lawrence, 1984; 1989; Uribe-Hernández *et al.*, 1992). Otros autores mencionan que estos compuestos se encuentran en concentraciones entre 20-40%, (Yousif *et al.*, 2000) y que timol, carvacrol, *p*-cimeno, 1,8-cineol y  $\gamma$ -terpineno contribuyen con un 63 a 69% (w/w) del aceite (Silva y Dunford, 2005).

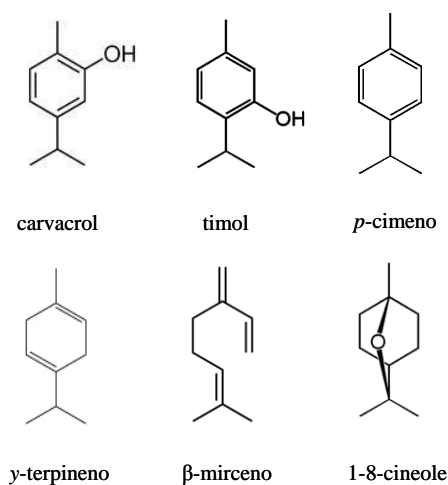


Figura 4. Estructura química de los componentes mayoritarios en orégano (*L. berlandieri* Schauer)

## 5.9 Capacidad antimicrobiana del género *Origanum*

Numerosas investigaciones sobre diferentes especies del género *Origanum* han sido realizadas a través del tiempo con diversos propósitos. La mayoría de estos estudios se enfocan en determinar el potencial antimicrobiano de diversos extractos y de sus aceites esenciales contra microorganismos considerados como patógenos de humanos, animales, plantas y agentes relacionados con la contaminación de los alimentos.

### 5.9.1 Extractos crudos

Trabajos realizados reportan que diferentes extractos de diversas especies del género *Origanum* presentan efectos tanto antibacterianos como antifúngicos. Por ejemplo, medios enriquecidos con extractos acuosos de *O. dictamnus* y *O. majorana* crean un ambiente inapropiado para la producción de biomasa de *Yarrowia lipolytica* (Karanika *et al.*, 2000). Otro efecto fungistático se presenta con el extracto metanólico de *O. majorana* sobre *Rhizoctonia solani* Kühn a las 48 y 96 h de incubación. Con dosis altas sólo alcanza un 78% de inhibición a las 48 h y un 80% a las 96 h. Así mismo, una inhibición total se presenta contra *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) a 8 000 ppm desde las 48 h (Gamboa-Alvarado *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que el extracto etanólico de una línea clonal de *O. vulgare* inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* en caldo y productos cárnicos (Saeberg *et al.*, 2003). Sin embargo, este mismo extracto presenta actividad antimicrobiana moderada contra *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Mycobacterium smegmatis* y *Micrococcus luteus*. Por otra parte, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *C. albicans*, *Rhodotorula rubra* y *Kluyveromyces fragilis* son resistentes a su acción (Dulger y Gonuz, 2004). También se ha establecido que los extractos acuosos no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* a un pH de 6 cuando son adicionados a medios de cultivo, así como también a filetes de carne de res y pescado (Lin *et al.*, 2004). Además, el extracto metanólico de *O. majorana* presenta acción antimicrobiana contra *E. coli* produciendo zonas de inhibición de 12 mm (Shahidi, 2004). De manera similar, este mismo extracto inhibe a *A. niger* y *Penicillium cyclopium* pero no a *Trichoderma viride*. Así mismo, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *B. cereus* son inhibidas en concentraciones de 0.2-0.4% (p/v) (Vági *et al.*, 2005). Por otra parte, los extractos metanólicos de *O. solymicum* y *O. bilgeri*

inhiben a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *B. cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *C. albicans*, *Rhodotorula rubra* y *Kluyveromyces fragilis*. *O. solymicum* produce mayor grado de inhibición pero es inactivo contra *Mycobacterium smegmatis*, mientras que *O. bilgeri* presenta menores zonas de inhibición pero presenta inhibición en todos los microorganismos estudiados (Dulger, 2005). Otros estudios reportan una CMI de 1.6 mg ml<sup>-1</sup> de los extractos metanólicos de *O. vulgare* subsp. *hirtum* y *O. minutiflorum* contra especies toxicogénicas como *Aspergillus flavus* Link., *A. niger* Raper, *A. ochraceus* K. Wilh., y *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (Askun *et al.*, 2008). Recientemente se determinó el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de *O. vulgare* contra *E. coli* por los métodos turbidimétrico y de difusión en agar. Con el método turbidimétrico se obtiene un 50% de inhibición a partir de una concentración de 50 µg ml<sup>-1</sup>, sin embargo no se obtiene el 100% de inhibición aún con las concentraciones más altas empleadas (600 µg/ml) (Amrita *et al.*, 2009).

### 5.9.2 Aceites esenciales

La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de diversas especies del género *Origanum* ha sido ampliamente demostrada. Tal es el caso de la especie *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letsw que inhibe considerablemente el desarrollo de diferentes géneros de bacterias como *Aeromonas hydrophila*, *Brevibacterium linens*, *Clostridium sporogenes*, *Leuconostoc cremoris* y *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman y Deans, 2000). Además, el envasado al vacío, en combinación con este aceite (0.8% v/w) presenta un efecto sinérgico en la inhibición de *Listeria monocytogenes* en filetes de carne de res (Tsigarida *et al.*, 2000).

También se ha observado que por medio del empleo de pruebas de difusión en agar y de técnicas de evaluación basadas en procesos matemáticos, el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella cholerae suis*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolica*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* y *Rhodotorula*. No obstante, también se ha establecido que la inhibición contra *P. aeruginosa* es significativamente menor o nula (Albado *et al.*, 2001; Elgayyar, *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2001).

Existen especies de orégano que no han sido ampliamente investigadas. Tal es el caso de *O. scabrum* y *O. microphyllum*. Los aceites esenciales de ambas especies poseen actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas, gram-negativas (CMI de 0.28-1.27 mg ml<sup>-1</sup>) y hongos (CMI de 0.65-1.27 mg ml<sup>-1</sup>) (Aligiannis *et al.*, 2001). Otro ejemplo es *O. bargyli* Mouterde. Esta planta es una especie rara del género *Origanum*. Su aceite esencial, empleado a bajas concentraciones (0.1-1.6 µl; 7-23 mm zonas de inhibición) impide el crecimiento de *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Listeria iivnocuto*, *Micrococcus luteus*, *K. pneumoniae*, *Mycobacterium megmatis*, *P. vulgaris*, *Torulopsis holmii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans* y *C. tropicales*. Sin embargo, *E. coli* y *P. aeruginosa* presentan resistencia a este aceite (Karaman *et al.*, 2004).

El tiempo y los medios de cultivo empleados son factores que han sido considerados en algunos estudios. Así, en medio líquido, la actividad bactericida del AEO contra *E. coli* O157:H7 se presenta con una concentración de 625 µl l<sup>-1</sup> al exponerse durante un minuto al aceite mientras que a los 5 minutos de exposición se requiere de 156 y 312 µl l<sup>-1</sup> (Burt y Reinders, 2003). En medio sólido, CMI es de 300 ppm y produce zonas de inhibición de 21.3 mm (Ceylan y Fung, 2003).

Como puede observarse, la capacidad del aceite esencial de orégano para inhibir a *L. monocytogenes*, así como a diversos microorganismos contaminantes de alimentos, está bien documentada (Faleiro *et al.*, 2005; Pasqua *et al.*, 2005). De hecho, el desarrollo tanto de *L. monocytogenes* como de *E. coli* O157:H7 se ve afectado aún cuando las concentraciones de aceite empleadas son muy bajas (1 µl). No obstante, *L. monocytogenes* es más sensible al AEO que *E. coli* O157:H7. Es importante mencionar que la efectividad antimicrobiana también se observa cuando el AE se incorpora en películas de quitosano y en carne procesada (Zivanovic *et al.*, 2005). Esta inhibición se presenta además en cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de pollo mediante el empleo de pruebas de difusión en agar (Horošová *et al.*, 2006). La CMI establecida para *L. monocytogenes* y *Salmonella choleraesius* es de 80 µl ml<sup>-1</sup>; *Aeromonas hydrophilla*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella choleraesius*, *S. enterica*, *S. mercencens*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei* y *Y. enterocolitica* presentan CMI que se encuentran en rangos de 20-40 µl ml<sup>-1</sup> (Souza *et*

al., 2006). Otros estudios confirman que el AE de *O. majorana* obtenido de diferentes estados de Venezuela (Mérida y Táchira) y por diferentes métodos (hidrodestilación y por arrastre de vapor) tiene acción bactericida sobre *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas* sp., desarrollando diámetros de inhibición de 14-23 mm (Meza et al., 2007). Además *O. majorana* L. también ha demostrado su capacidad en sistemas alimenticios como embutidos con un rango de valores de CMI de 0.069 a 2.3 mg ml<sup>-1</sup> para *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia* sp. y *Streptococcus mutans* (Busatta et al., 2008).

La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano también se presenta contra diversas especies fúngicas. Por ejemplo, los aceites esenciales de *O. vulgare*, *O. dictamnus* y *O. majorana*, inhiben completamente el crecimiento micelial, la germinación de conidias y la producción de *Penicillium digitatum* en concentraciones relativamente bajas (250–400 µg ml<sup>-1</sup>) (Daferera et al., 2000). Del mismo modo, el aceite esencial de *O. vulgare* inhibe un 75% de crecimiento micelial de *C. albicans* con una concentración de 0.125 mg ml<sup>-1</sup> (Manohar et al., 2001). También es efectivo contra *F. solani* var. *coeruleum* a concentraciones de 80-300 µg ml<sup>-1</sup> (Daferera et al., 2003). Lo mismo le sucede a *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* que son tres de las especies más comunes que atacan maíz en diferentes condiciones de laboratorio. Con una actividad de agua de 0.995a<sub>w</sub>, el porcentaje de reducción del crecimiento micelial es mayor del 33% mientras que a 0.95a<sub>w</sub> es superior del 68% cuando la concentración se incrementa de 0-1000 µg ml<sup>-1</sup> (Velluti et al., 2004). El potencial antifúngico del aceite esencial de *O. vulgare* también ha sido demostrado contra dos hongos relacionados con daños a alimentos como *A. niger* y *A. flavus* (Viuda-Martos et al., 2007). Así mismo, existen diferencias en el grado de inhibición del aceite esencial cuando se emplea sólo la fase volátil o cuando éste se incorpora en el medio de cultivo. La fase volátil del aceite esencial de *O. syriacum* var. *bavani*, muestra una mayor inhibición del crecimiento micelial que la fase de contacto contra *Sclerotinia sclerotiorum* aislado de plantas infectadas de tomate (Soylu et al., 2007). Wogiatzi, (2009) por su parte, realizó pruebas *in vitro* con tres biotipos de *O. vulgare* y un botipo de *O. onites* L. y confirmó su actividad antifúngica contra patógenos importantes del cultivo del tomate como *Pythium* spp., *Verticillium dahliae* y *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* empleando dosis bajas (4 µl).

Otras especies que han demostrado su actividad antimicrobiana contra microorganismos contaminantes de alimentos son *O. acutidens* y *O. rotundifolium*. Ambas inhiben a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis*, *B. subtilis*, *S. pyogenes* y *Enterococcus faecalis*. Los rangos de las CMI obtenidos son de 6.25-50 y 12.5-50  $\mu\text{l ml}^{-1}$  para las cepas Gram-positivas y Gram-negativas respectivamente. Sin embargo, no se presenta diferencia significativa en ambas especies en relación con el diámetro de las zonas de inhibición (Dikbas *et al.*, 2009).

Estudios recientes reportan que existe un efecto antibacteriano sinérgico entre el aceite esencial de *O. vulgare* y algunos compuestos químicos. Por ejemplo, el empleo de aceite esencial al 75% de *O. vulgare* en combinación con gentamicina inhibe totalmente el desarrollo de *E. coli* aislada de muestras clínicas (Chávez *et al.*, 2008); en combinación con ácido láctico inhibe el desarrollo de coliformes fecales (Vatansever *et al.*, 2008) y al emplearlo en combinación con ácido acético presenta actividad bactericida contra *S. aureus* (Souza *et al.*, 2009).

Otros estudios comparativos entre especies indican que *O. vulgare* es más efectivo que *O. compactum* y *O. majorana* en ensayos *in vitro* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), y *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*) agentes causantes de enfermedades en el cultivo de la papa y la alfalfa. El índice de actividad antimicrobiana contra *Cms* fue de 60.7% y contra *Cmi* de 53.7% (Pouvova *et al.*, 2008).

En el área clínica, también se ha destacado la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales de *O. vulgare* L. y *O. majorana*. Ambos impiden el crecimiento de diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con conjuntivitis, desarrollando zonas claras de inhibición de 27-32 mm y 15-24 mm, respectivamente. El valor de la CMI reportada es de 10  $\mu\text{l ml}^{-1}$  para las cepas estudiadas. El aceite esencial de *O. majorana* mostró la menor CMI (2.5  $\mu\text{l ml}^{-1}$  para *S. aureus* BH2 y *Enterobacter* spp. BH15) mientras que la mayor (20  $\mu\text{l ml}^{-1}$  *S. aureus*) fue encontrada para el aceite esencial de *O. vulgare* (Oliveira *et al.*, 2009). El aceite esencial de *O. vulgare* empleado en bajas concentraciones (0.125-0.5%) es capaz de impedir el crecimiento de cepas de *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *S. aureus* aisladas de muestras de sangre y orina. Además, la mayoría de estas bacterias

presentan las mismas CMI y CMB y no existe diferencia en el efecto entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Coelho *et al.*, 2009).

### 5.9 Capacidad antimicrobiana del género *Lippia*

La cantidad de estudios efectuados para evaluar la capacidad antimicrobiana de las especies del género *Lippia* son menores a los realizados a las especies del género *Origanum*. A pesar de esto, el aceite esencial y algunos extractos de esta especie han sido reconocidos como importantes agentes inhibidores de hongos y bacterias. Por ejemplo, el aceite esencial de *Lippia chevalieri*, *L. multiflora* y *L. graveolens* impiden el desarrollo de bacterias Gram-negativas (Bassole *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003). Otras investigaciones confirman que el extracto hexánico de *Lippia graveolens* H.B. et K (Verbenaceae) presenta efectos antibacteriales contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas causantes de enfermedades gastrointestinales (Hernández *et al.*, 2003) y que el extracto etanólico de *L. origanoides* inhibe el desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis*, dos hongos que atacan el maíz. Con una concentración de 1.5% se produce una inhibición total y al 0.5%, el grado de inhibición es de 70 y 84% para *R. solani* y *B. maydis* respectivamente (Rodríguez y Sanabria, 2005).

Por otra parte, Portillo-Ruiz *et al.* (2005) demostraron la actividad antifúngica *L. berlandieri* Schauer contra hongos contaminantes de alimentos, y Paredes *et al.* (2007) contra diferentes especies de *Vibrio*. También, se ha reportado su actividad antibacterial contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Avila-Sosa *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que el aceite esencial de *L. graveolens* H.B.K. presenta una alta actividad antifúngica ( $IC_{50} = 10-90 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) contra *A. niger*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani* (Hernández *et al.*, 2008) así como contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *B. subtilis*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* *E. coli* y cuatro cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de agua y muestras clínicas (MIC y MBC de 7-125 y 15-258  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Hernández *et al.*, 2009).

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Origen de los reactivos

Los reactivos empleados para el desarrollo del presente trabajo fueron: agar de papa y dextrosa (PDA;BIOXON) y agar bacteriológico (Difco); para retirar el exceso de humedad del aceite esencial se utilizó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; Analytyca); la obtención de extractos se realizó mediante el empleo de hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (en los tres casos: Baker Analyzed); en las pruebas de inhibición en placa se empleó como control positivo para la inhibición el fungicida comercial Tecto 60 (Tiabendazol); como desinfectante se utilizó hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ; producto comercial) y para preparar las emulsiones de trabajo se empleó Tween 20; (Monolaurato sorbitan 20;Sigma).

### 6.2 Material biológico

#### 6.2.1 Material vegetal

Las plantas de orégano empleadas para el desarrollo de este estudio fueron recolectadas en el Ejido Barreal de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coah., mediante un muestreo aleatorio simple y el depósito de la muestra y su identificación botánica se realizó en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (ANUL).

#### 6.2.2 Aislamiento, producción de inóculo e identificación del microorganismo patógeno.

*F. oxysporum* fue aislado a de plantas de tomate infectadas que fueron obtenidas durante el mes de Julio del 2006 en el Ejido Monterreycito, Durango. Las plantas enfermas fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología del INIFAP en donde se procedió a identificar partes de la planta con signos característicos de daño por *F. oxysporum*. Posteriormente se realizaron cortes de tejido de raíces y tallos dañados que fueron colocados en cajas Petri y lavados, en primer lugar, con agua destilada, desinfectadas con una solución al 0.3% de  $\text{NaClO}$  y enjuagadas con agua destilada



estéril. Después de permitir su secado a temperatura ambiente, estos cortes fueron colocados en agar PDA y se incubaron a 28°C por 7 d. Finalmente se realizaron resiembras periódicas hasta lograr el aislamiento. El inóculo se llevó a cabo arrastrando las esporas de cultivos de *F. oxysporum* de 15 d de crecimiento en cajas Petri con agar PDA. Se realizaron diluciones con agua destilada estéril hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  las cuales fueron contabilizadas por medio de un hematocímetro. Este hongo fue identificado en base a sus características macro y microscópicas (Summerell *et al.*, 2003) y por medio de la técnica RAPD-PCR (DNA polimórfico amplificado al azar por reacción en cadena de la polimerasa) en el Departamento de Microbiología del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Posteriormente se depositó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria. Matamoros, Coahuila, México.

### **6.3 Estrategia de trabajo**

#### **6.3.1 Obtención del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer)**

El aceite esencial de orégano se obtuvo de hojas y flores de la planta a través del método de arrastre de vapor a partir de 2 k de muestra seca con un tiempo de 3 h. El aceite fue separado y el exceso de humedad fue retirado haciendo pasar el aceite por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para posteriormente almacenarlo en un frasco ámbar a 4°C.

#### **6.3.2. Análisis químico del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer)**

El análisis químico se realizó en el Centro para los Recursos Naturales (CIRENA) de Salta Chihuahua, empleando un Cromatógrafo de Gases (GC) Clarus 500 marca PerkinElmer con automuestreador. Se utilizó un detector FID con una columna capilar PE-5 (30 m x 0.25 mm), con un film de espesor 0.25 mm (DI) y empleando Helio como gas acarreador. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura inicial 40°C. Gradiente 5°C/min., Flujo 10 ml/min, temperatura final 250°C.

#### **6.3.3 Obtención de los extractos**

Para la obtención de los extractos se emplearon las partes aéreas (hojas y flores). Estas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se trituraron en un molino para sólidos. A 100 g de este material se le agregó los solventes correspondientes a

cada tipo de extracto (hexano, metanol y cloruro de metileno). Se colocaron en un agitador durante 24 h a temperatura ambiente. Al término de este periodo, se filtró la mezcla de la planta con los diferentes solventes y los extractos resultantes se colocaron en un Rotavapor Büchi R-114, donde se llevó a cabo la concentración de las muestras.

#### **6.3.4 Actividad antifúngica del aceite esencial y de los extractos de orégano *in vitro* por medio de la técnica de difusión en placa.**

Se preparó medio de cultivo PDA y se mantuvo en baño María a 45°C. Posteriormente se colocó en cada caja 0.5 ml del inóculo descrito anteriormente y se agregó en ellas 15 ml de agar y ambos se distribuyeron uniformemente en la caja. Una vez solidificado el medio, se realizaron perforaciones distribuidas equidistantemente de 5 mm de diámetro y se colocó en cada pozo 100 µl de las soluciones estudiadas. Inmediatamente después, las cajas se incubaron a 28° C durante 7 d y se midió el halo alrededor del pozo para determinar el área de inhibición en mm<sup>2</sup> de acuerdo a la fórmula:

$$A = \pi r^2 = \pi (D/2)^2 = \pi D^2/4$$

Las concentraciones de aceite esencial fueron de 0.5, 1.0, 1.25, 1.5 y 1.75% p/v en base seca. Dada la insolubilidad del aceite en agua, se recurrió al uso de metanol al 95% como solvente. Por tal motivo, fue necesario realizar pruebas con dicho compuesto para conocer su posible efecto sobre el desarrollo del hongo. En el caso de los extractos obtenidos con hexano, metanol y cloruro de metileno, las concentraciones estudiadas fueron de 250, 500 750 y 1000 ppm. Como control negativo se empleó agua estéril y como positivo el fungicida comercial Tecto 60 (Tiabendazol).

#### **6.3.5 Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de *F. oxysporum* por medio de las fases de contacto y volátil.**

El efecto antifúngico de las fases de contacto y volátil fue evaluado de acuerdo a la metodología propuesta por Soylyu *et al.* (2007). Diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 µl ml<sup>-1</sup> de medio) de medio se prepararon en Tween 20 (0.5% v/v) y se adicionaron a agar PDA fundido. Posteriormente, cajas Petri fueron llenadas con 20 ml de agar PDA y discos de agar de 5 mm de diámetro obtenidas del margen de una colonia de *F.*

*oxysporum* de 7 d de crecimiento fueron colocados en el centro de las cajas e incubadas por 7 d a 28°C. Para determinar la efectividad de los compuestos volátiles del aceite esencial, discos de agar de 5 mm de diámetro obtenidas de la misma forma mencionada anteriormente fueron colocados en el centro de las cajas Petri (20 ml de PDA y 50 ml de aire). Posteriormente, diferentes concentraciones de aceite esencial (1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 µl), equivalentes a 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25 µl de aceite esencial ml<sup>-1</sup> de aire fueron colocados directamente en la superficie interna de la caja Petri invertida. Después de que el aceite fue aplicado, las cajas fueron selladas e incubadas 7 d a 28°C. Como control positivo se emplearon cajas sólo con agar PDA y Tween 20. En ambos métodos el diámetro de la colonia fue medido y fue expresado como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial empleando la fórmula:

$$\% \text{ ICM} = [(d_c - d_t)/d_c] \times 100$$

Donde  $d_c$  = diámetro del crecimiento micelial del control y  $d_t$  = diámetro del crecimiento micelial de los tratamientos. El experimento fue realizado por triplicado. La concentración menor de aceite que presentó el 100% de inhibición del crecimiento micelial fue considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Daouk *et al.*, 1995).

### **6.3.6 Efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) sobre la producción de biomasa de *F. oxysporum***

Para el establecimiento de las curvas del crecimiento de *F. oxysporum* se determinó la cantidad de biomasa deshidratada del micelio producido en Caldo de papa-dextrosa (PDB). En el caso del aceite esencial de orégano, se prepararon 100 ml de soluciones de 0, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.015 y 0.175 y 0.2 µl ml<sup>-1</sup> de medio de aceite esencial de orégano con una suspensión de 1x10<sup>5</sup> esporas/ml y se colocaron en frascos de 25 ml de capacidad (5 ml/frasco). Dada la insolubilidad del aceite en el medio se empleó Tween 20 estéril como emulsificante en una concentración de 0.5% (v/v) acuerdo a lo reportado por Hammer *et al.* (1999). Posteriormente se trasvasaron 5 ml de cada suspensión en cada uno de los 112 frascos, es decir, 16 frascos (correspondientes a los 7 tiempos a evaluar) por cada una de las concentraciones con su duplicado. Todos los frascos se incubaron a 28°C con una agitación de 150 rpm y se fueron retirando 2 frascos de cada concentración cada 24 h hasta llegar a un periodo de 7 d. Todos los frascos retirados se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 min a

4°C en una centrífuga refrigerada y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se determinó la biomasa producida después de deshidratarla a 60°C hasta peso constante. Se determinó el porcentaje de inhibición de la producción de biomasa por medio de la fórmula:

$$\% \text{ IPB} = [(C - T)/C] \times 100$$

Donde C y T representan el peso del micelio del control y de las soluciones de trabajo respectivamente. El experimento fue realizado por triplicado.

### **6.3.7 Evaluación de la patogenicidad (activación de la virulencia) de *F. oxysporum***

Se determinó la capacidad de patogenicidad del hongo, para lo cual las semillas de tomate tipo saladet recolectado en el Rancho “Lucero”, Municipio de Tlahualilo, Dgo, se sumergieron por 10 min en una solución al 0.3% de hipoclorito de sodio; posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril, se colocaron en papel filtro estéril en una caja Petri y se colocaron en desecador por 24 h. Las semillas se transfirieron a cajas Petri conteniendo 1.5% (p/v) de agar bacteriológico para su germinación a 25°C. Cuando las raíces alcanzaron una longitud de 2-3 cm, fueron inoculadas por inmersión durante un minuto en una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. Posteriormente 5 semillas inoculadas fueron colocadas en recipientes de plástico estériles que contenían 25 ml del medio Murashige y Skoog modificado (1.5 g de KNO<sub>3</sub>, 0.4 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.15 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 7.0 g de agar bacteriológico por 1 litro de agua). Las plantas en los recipientes de plástico fueron mantenidas durante 12 h con luz y por 12 h en oscuridad a 25°C (Bao y Lazarovits, 2001). Después de 10 d se realizaron cortes de tejidos de raíz y tallo. Se lavaron con hipoclorito de sodio, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en papel filtro estéril en cajas Petri. Finalmente se colocaron en PDA para observar el desarrollo el hongo y confirmar su virulencia o grado de patogenicidad (Cerón *et al.*, 2006).

### **6.3.8 Determinación del nivel óptimo de inóculo y evaluación del efecto antifúngico del aceite esencial de orégano en el desarrollo de *F. oxysporum* en semillas de tomate.**

Para determinar la concentración mínima de inóculo necesaria para infestar el 100% de las semillas tratadas, se prepararon suspensiones de  $10^2 - 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  de *F. oxysporum* y se colocaron en cajas Petri. Por otra parte, se preparan lotes de 10 semillas desinfectadas como se mencionó anteriormente, y se sumergen por 5 min en cada suspensión. Posteriormente el inóculo fue retirado, las semillas se colocaron primero en toallas de papel estéril para retirar el exceso de humedad y posteriormente en papel filtro estéril dentro de cajas Petri para ser mantenidas en desecador por 5 d (Punja y Parker, 2000). Al término de este periodo, las semillas se depositan en cajas con medio PDA por 7 d a  $28^\circ\text{C}$  para observar el desarrollo del hongo alrededor de la semilla. Para determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de orégano en el desarrollo de *F. oxysporum* en semillas de tomate, primero, semillas desinfectadas fueron sumergidas por 5 min en una suspensión de  $10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Después de este periodo, las semillas fueron colocadas en papel filtro estéril dentro de cajas Petri y conservadas en desecador por 5 d. Por otra parte, diferentes concentraciones de aceite esencial (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0%) fueron preparadas disolviendo las cantidades adecuadas en Tween 20 estéril. Posteriormente, las semillas inoculadas fueron sumergidas por 10 min en todas las emulsiones de prueba. Finalmente las semillas se colocaron en medio PDA y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 7 d para observar el desarrollo del hongo alrededor de la semilla. En ambas técnicas, semillas tratadas con Tween 20 (0.5% v/v) estéril y con el fungicida comercial fueron usados como controles. Además, para establecer si las diferentes concentraciones de aceite esencial tienen algún efecto en la capacidad de germinación de las semillas, lotes de 10 semillas fueron sumergidas por 10 min en cada una de las emulsiones estudiadas; posteriormente estas fueron descartadas y las semillas permanecieron en papel filtro colocado en cajas Petri dentro del desecador. Finalmente fueron colocadas en agar nutritivo por 10 d a  $28^\circ\text{C}$  hasta observar su germinación. En todos los casos, se utilizaron 10 semillas por tratamiento, y el experimento se realizó tres veces por triplicado.

### **6.3.9 Capacidad desinfectante del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) en semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum* para el desarrollo de plántulas en cámara de crecimiento.**

Se prepararon emulsiones de aceite esencial de orégano en Tween-20 (0.5% v/v) en concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 % que fueron agitadas a alta

velocidad hasta su total dispersión. Posteriormente, lotes de 10 semillas inoculadas con una suspensión de  $10^5$  esp/ml (3 réplicas de 10c/u) fueron sumergidas por 30 min en cada una de estas emulsiones y transferidas a papel filtro estéril colocado en cajas Petri para retirar exceso de humedad. La siembra se efectuó en macetas (cinco semilla/maceta) con mezcla comercial BM2 para germinación tipo "peat-moss" (turba de esfegno, perlita fina, vermiculita fina, cal dolomítica y calcítica, carga fertilizante inicial y agente humectante) esterilizada 30 min a  $121^\circ\text{C}$  por 2 ocasiones. (Rose *et al.*, 2003). Como controles se emplearon semillas tratadas de la misma forma con Tween-20, con el fungicida comercial Tecto 60 y sin inocular. Las charolas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El experimento se realizó 3 veces. Se evaluó el porcentaje de emergencia del 7° y 14° d y porcentaje de planta muerta y presencia de *F. oxysporum* en tejidos vegetales afectados a los 30 d (se tomó como positivo a la inhibición las plantas cuyos cortes de tejidos al ser sembradas en medio PDA no presenten el desarrollo del hongo).

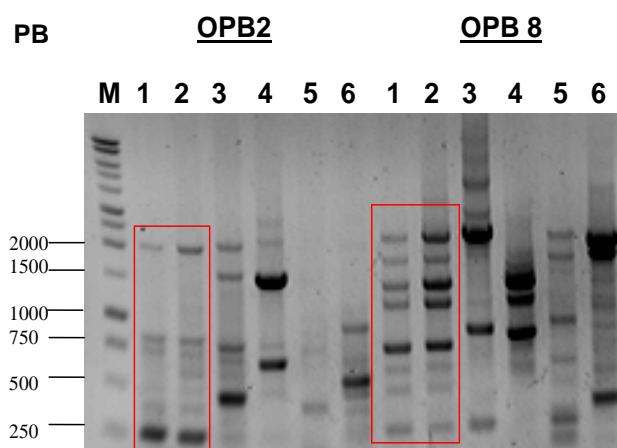
#### **6.3.10 Análisis de Datos.**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo usando un diseño completamente al azar. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) empleando un nivel de significancia de 0.05 por medio del programa estadístico SAS versión 8.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Las diferencias significativas entre medias se realizó por el método de la LSD (Least Significant Difference;  $P = 0.05$ ) de Fisher.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Identificación del material vegetal y microbiológico

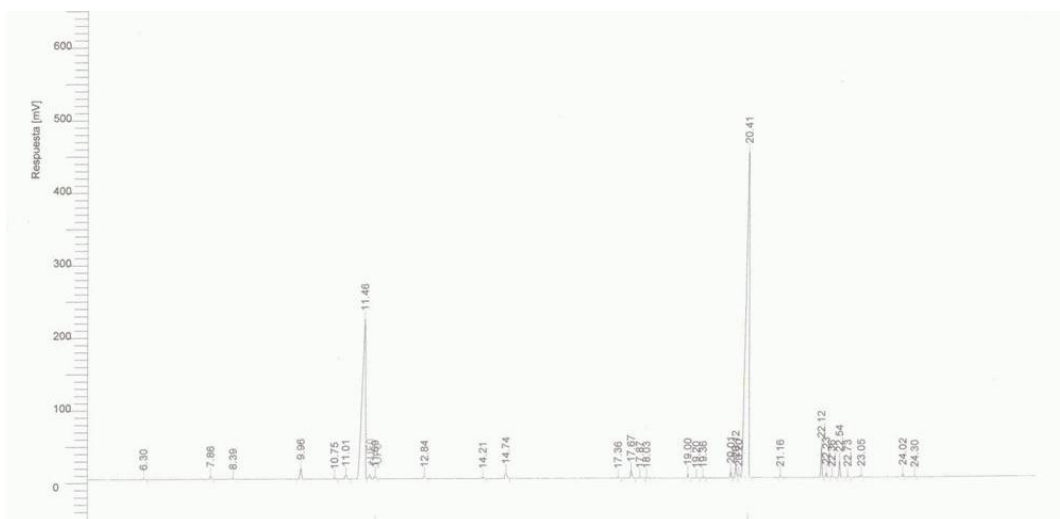
El material vegetal fue identificado como *Lippia berlandieri* Schauer en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna (ANUL), donde quedaron depositadas con el número de ejemplar 1839 y el número de registro 00045. Por otra parte, el microorganismo aislado fue identificado en base a sus características coloniales y de conidias. Así mismo se confirmó su identidad mediante la técnica RAPD-PCR comparándolo con un patrón específico de *Fusarium*, donde además se amplificaron cepas de otros hongos empleando los oligonucleótidos OPB2 Y OPB8. En el gel de la Figura 5 se muestra en el carril M el marcador de 1 Kb, en el carril 1, una cepa de *Fusarium oxysporum* previamente caracterizada (ICA, Universidad de Guanajuato), en el carril 2, la cepa de *Fusarium* aislada de plantas de tomate, en el carril 3, *Mucor vouxii*, en el carril 4, *Rhizopus nigricans*, en el carril 5, *Trichoderma sp.* y en el carril 6, *Fusarium solani*.



**Figura 5.** Amplificaciones por RAPD-PCR con los oligonucleótidos OPB 2 y OPB 8 en Gel de agarosa al 1%. **M**; marcador de 1 Kb. **1**; *Fusarium oxysporum* (cepa caracterizada) **2**; *Fusarium sp.* (aislado de plantas de tomate), **3**; *Mucor vouxii*, **4**; *Rhizopus nigricans*, **5**; *Trichoderma sp.*, **6**; *Fusarium solani*.

## 7.2 Rendimiento y composición química del aceite esencial de orégano

El rendimiento del aceite esencial fue de 4% v/p en base seca y su densidad de 0.96 g ml<sup>-1</sup> a temperatura ambiente. El cromatograma presentado en la Figura 6 muestra la composición porcentual de los componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano (1.55% de timol y 49.07% de carvacrol).



**Figura 6.** Cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer)

## 7.3 Rendimiento de los extractos

Se evaluó el rendimiento de tres tipos de extractos obtenidos de la planta de orégano mediante el empleo hexano, metanol y cloruro de metileno. Los resultados del porcentaje de rendimiento se presentan en la tabla VI.

TABLA VI

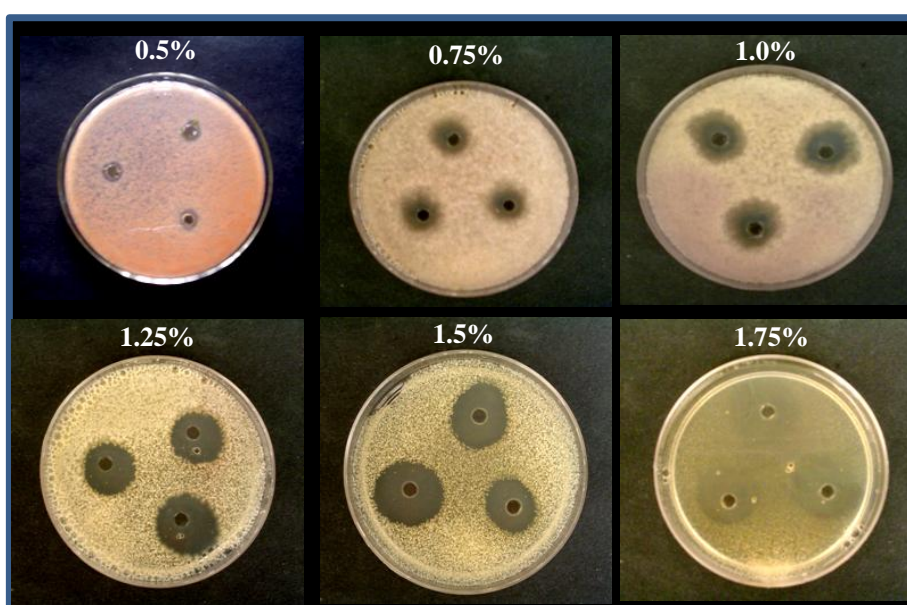
Rendimiento de los extractos obtenidos

Extractos de orégano	Rendimiento (%)
Cloruro de metileno	4.05
Hexano	4.13
Metanol	20.06



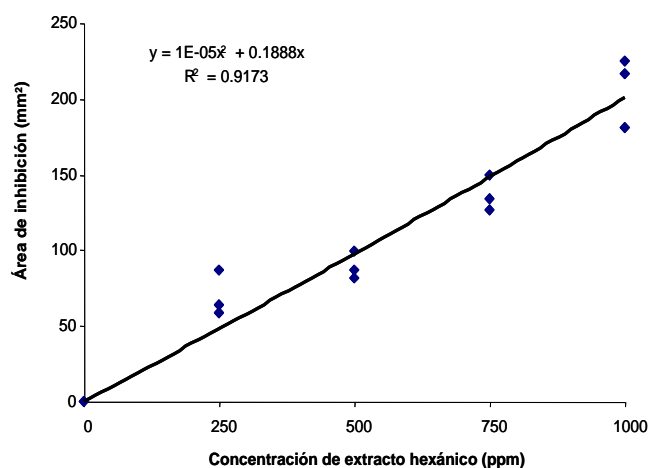
#### 7.4 Actividad antifúngica de los extractos hexánico, metanólico y cloruro de metileno por medio de la prueba de difusión en agar

De los tres extractos estudiados, sólo el extracto hexánico presentó actividad antifúngica sobre el desarrollo de *F. oxysporum* en las concentraciones estudiadas (250, 500, 750 y 1 000 ppm). La capacidad de inhibición tanto del aceite esencial como del extracto hexánico sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, quedó demostrada por la presencia de zonas de inhibición alrededor de los pozos en donde fueron depositadas las soluciones de estudio (Figura 7).

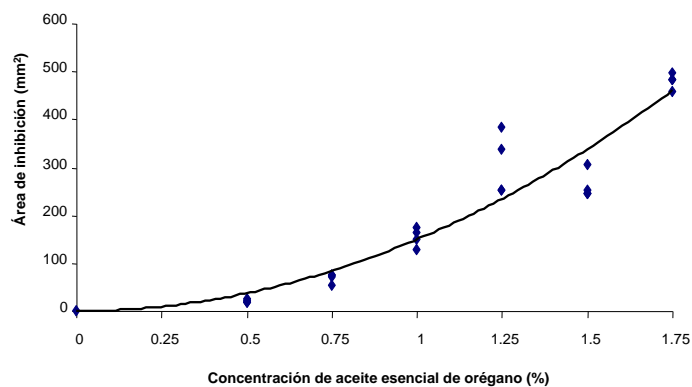


**Figura 7.** Actividad antifúngica a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de *F. oxysporum*

El aceite esencial de orégano y el extracto hexánico presentaron inhibición en todas las concentraciones estudiadas, observándose aumento en el área de inhibición de manera directamente proporcional a las concentraciones empleadas (Figuras 8 y 9). No se observó diferencia significativa entre las concentraciones de 1.25 y 1.5% de aceite esencial (Tabla VII), tampoco entre las concentraciones de 250 y 500 ppm en el caso del extracto hexánico (Tabla VIII).



**Figura 8.** Efecto del aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de *F. oxysporum*



**Figura 9.** Efecto del extracto hexánico de orégano sobre el desarrollo de *F. oxysporum*

TABLA VII

Actividad antifúngica del aceite esencial de orégano sobre *F. oxysporum*

Concentración de aceite esencial de orégano (%) p/v	Área de inhibición (mm <sup>2</sup> )
1.75	481.01a
1.50	307.25b
1.25	261.83b
1.00	153.37c
0.75	68.28d
0.50	21.67e

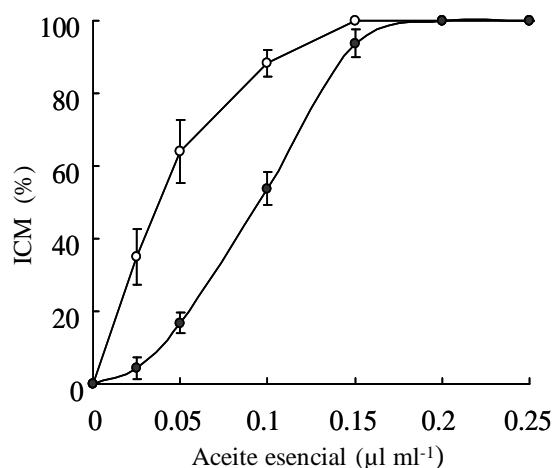
TABLA VIII

Actividad antifúngica del extracto hexánico de orégano sobre *F. oxysporum*

Concentración de extracto (ppm)	Área de inhibición (mm <sup>2</sup> )
1000	207.66a
750	136.79b
500	89.26c
250	70.07c

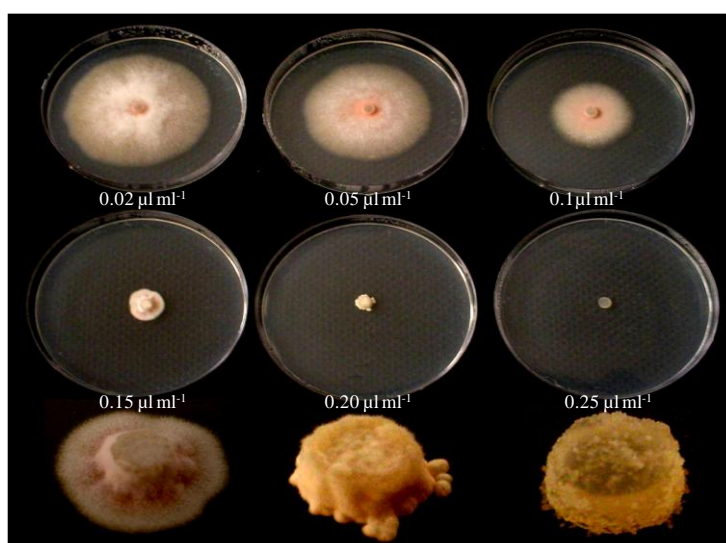
### 7.5 Capacidad de inhibición del aceite esencial de orégano sobre el crecimiento micelial (ICM) de *F. oxysporum* por medio de las fases de contacto y volátil.

La demostración de actividad antifúngica y El porcentaje de inhibición del aceite esencial de orégano sobre del crecimiento micelial de *F. oxysporum* a través de las fases de contacto directo y volátil se muestran en la Figura 10. Se observó que el aceite esencial presentó efecto antifúngico en todas las concentraciones evaluadas. En el método de contacto directo se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las concentraciones 0.025, 0.5, 0.1 y 0.15  $\mu\text{l ml}^{-1}$  de medio correspondiente al 4.2, 16.8, 53.6 y 93.8 % de inhibición del crecimiento micelial. Una total inhibición se presentó con las concentraciones de 0.2 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  de aceite esencial.



**Figura 10.** Efecto de las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de *F. oxysporum* en contacto directo (●) y en fase volátil (○).

En el caso de la fase volátil, también se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre las concentraciones 0.02, 0.05 y 0.1  $\mu\text{l ml}^{-1}$  aire de aceite esencial que correspondieron al 35, 64 y 88.3 % porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Estos resultados demostraron que la fase volátil produce un efecto mayor que la fase de contacto empleando las mismas concentraciones (Figura 11). La concentración mínima de aceite esencial requerida para producir la inhibición total del crecimiento micelial fue de 0.15  $\mu\text{l ml}^{-1}$  aire, y de 0.2  $\mu\text{l ml}^{-1}$  en el caso de la fase de contacto. Estas concentraciones se consideraron como los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

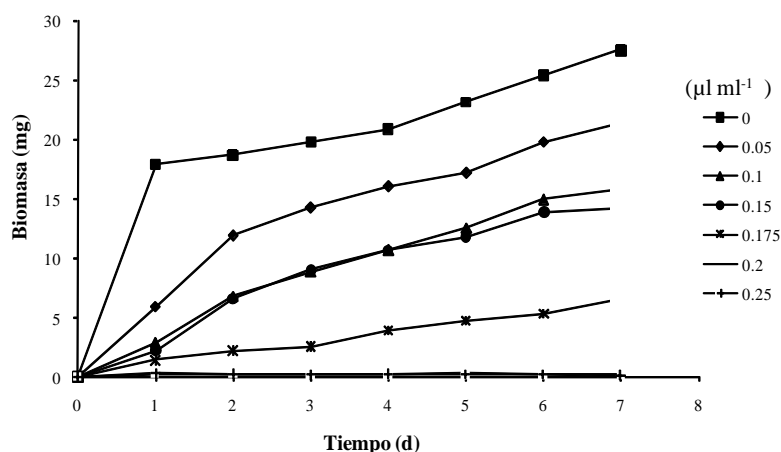


**Figura 11.** Actividad antifúngica a diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* por medio de la fase volátil.

### 7.6 Determinación de la producción de la biomasa fúngica

Los resultados obtenidos cada 24 h indicaron que la producción de la biomasa de *F. oxysporum* fue influenciada por la presencia de las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano en el medio de cultivo. En el caso del extracto hexánico los resultados fueron significativamente menores, ya que las concentraciones de 250, 500 y 750 ppm no presentaron algún grado de inhibición en la biomasa fúngica. En relación al aceite esencial, en la Figura 12 puede observarse una marcada diferencia entre la biomasa producida por el testigo y las concentraciones estudiadas. A partir del primer día se observó una destacada diferencia entre la biomasa producida por el

tratamiento de  $0.05 \mu\text{l ml}^{-1}$  en relación con el testigo. No se encontró diferencia significativa ( $P>0.05$ ) durante los siete días entre las concentraciones de  $0.1$  y  $0.15 \mu\text{l ml}^{-1}$ . Con la concentración de  $0.175 \mu\text{l ml}^{-1}$  el hongo resultó afectado significativamente en su crecimiento, mientras que las concentraciones de  $0.2$  y  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$  lo inhibieron totalmente. Cabe destacar que el comportamiento en cuanto al crecimiento del hongo es muy similar entre tiempos y concentraciones a partir de las 24 h y hasta los 7 d al término de la cinética. No se observó diferencia significativa entre todas las concentraciones entre el cuarto y el séptimo día y las concentraciones de  $0.20$  y  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$  presentaron un 100% de inhibición de la producción de biomasa durante los 7 d de experimentación.

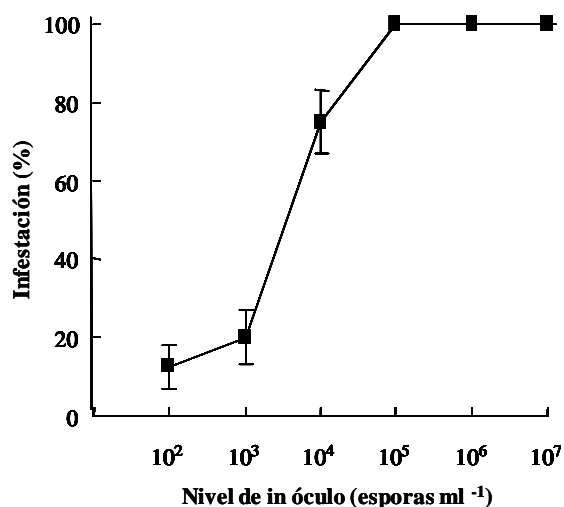


**Figura 12.** Efecto del aceite esencial de orégano sobre la producción de biomasa de *F. oxysporum*

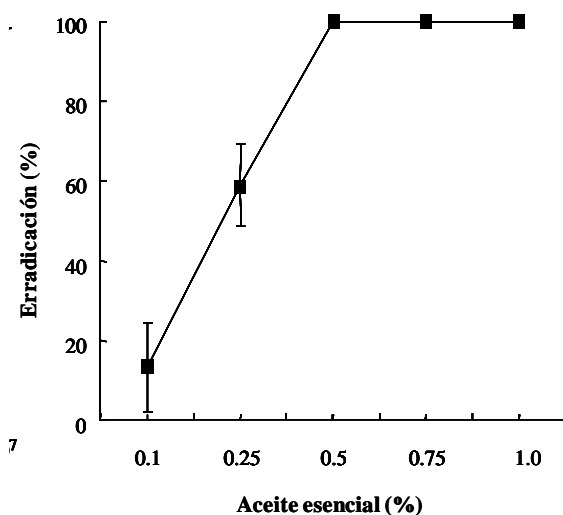
### 7.7 Determinación del nivel de inóculo y efecto antifúngico del extracto hexánico y del aceite esencial de orégano en semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum*

En este estudio fue observado que el nivel más bajo de inóculo requerido para producir el 100% de infestación en semillas de tomate fue de  $10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  (Figura 13). Se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los niveles de inóculo de  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , los cuales presentaron un 12.5, 20 y 75 % de infestación respectivamente. Con respecto al efecto antifúngico del aceite esencial en el desarrollo de *F. oxysporum* inoculado en semillas de tomate, se encontró que el extracto hexánico no presentó inhibición en el desarrollo de hongo a las concentraciones estudiadas. Por otra parte, las diferentes concentraciones del aceite esencial inhibieron significativamente el desarrollo del hongo en comparación con

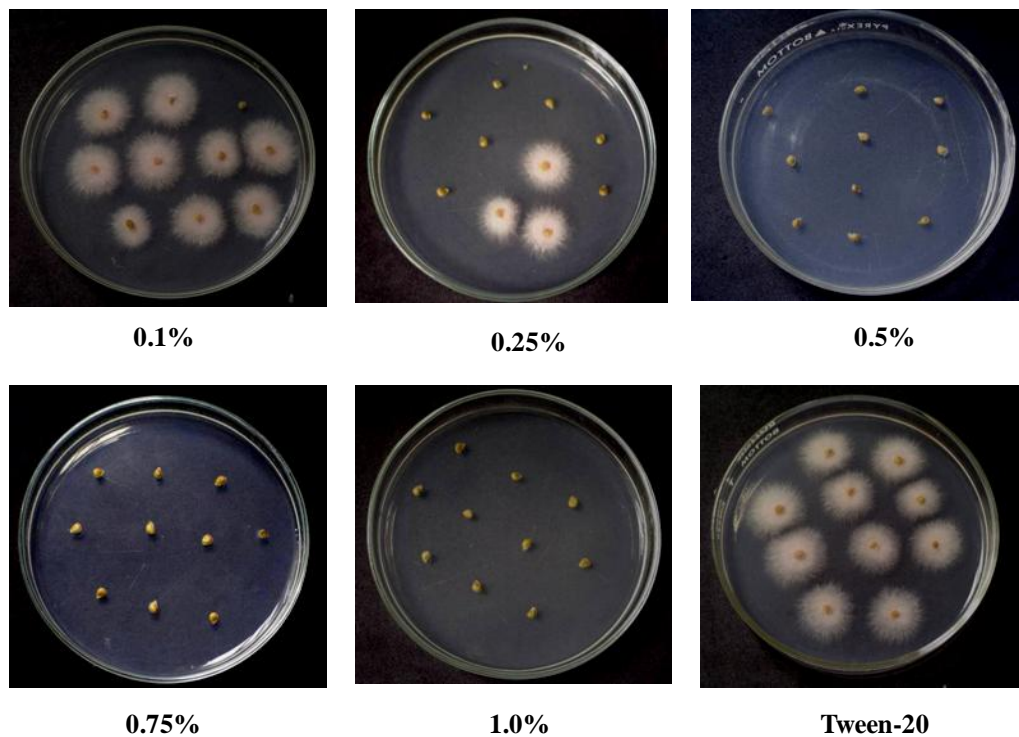
los controles. Así mismo, quedó establecido que la concentración de 0.5% de aceite esencial inhibió completamente la colonización de las semillas (Figuras 14 y 15).



**Figura 13.** Influencia de los diferentes niveles de inóculo en el porcentaje de infestación de semillas de tomate por *F. oxysporum*. Los datos son el resultado promedio ( $\pm$  SD) de tres repeticiones.



**Figura 14.** Porcentaje de protección de semillas tratadas con diferentes concentraciones de aceite esencial e infestadas con una suspensión de 10<sup>5</sup> esporas ml<sup>-1</sup> de *F. oxysporum*. Los datos son el resultado promedio ( $\pm$  SD) de tres repeticiones.



**Figura 15.** Efectividad de la concentración del aceite esencial de orégano sobre la actividad antifúngica en semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum*.

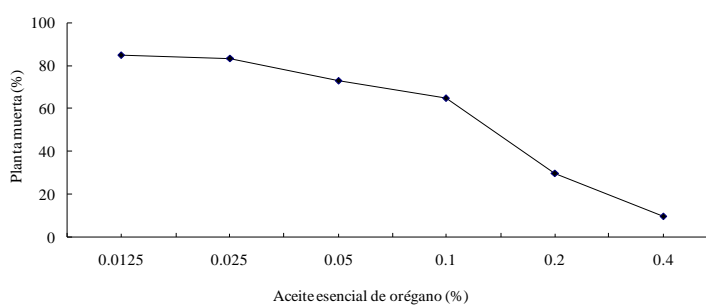
### **7.8 Capacidad desinfectante del aceite esencial de orégano (*L. berlandieri* Schauer) en semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum* para el desarrollo de plántulas en cámara de crecimiento.**

El porcentaje de emergencia de las plántulas tanto al 7° como al 14° día se presentan en la tabla IX. En ambos periodos no se encontró diferencia en el porcentaje de germinación, tanto en los testigos como en los tratamientos estudiados. Es decir, durante este tiempo la germinación no se ve afectada ni se observa planta muerta. Sin embargo, a partir del día 16° inició la mortalidad de las plántulas, específicamente las desarrolladas a partir de semillas desinfectadas con las concentraciones menores de aceite esencial. Esto es, el porcentaje de mortalidad de la plántula disminuyó al incrementarse la concentración de aceite esencial empleada para desinfectar las semillas de tomate (Figura 16).

TABLA IX

Efecto de las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano sobre el porcentaje de emergencia de plántulas desarrolladas a partir de semillas infestadas con *F. oxysporum*

Tiempo d	Concentración del aceite esencial de orégano en %					
	0.0125	0.0250	0.05	0.1	0.2	0.4
7	65a	58a	62a	68a	71a	75a
14	93b	90b	90b	94b	94b	92b



**Figura 16.** Efecto del aceite esencial de orégano sobre el porcentaje de planta muerta

Finalmente se observó la ausencia y el desarrollo del hongo alrededor de cortes de tejidos provenientes de plántula sana y muerta colocados en agar PDA. Con lo anterior, se comprobó la efectividad del aceite esencial de orégano para inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* en plántula desarrollada en cámara de crecimiento.



## 8. DISCUSIONES

Numerosas investigaciones sobre las diferentes especies de orégano han sido realizadas a través del tiempo con diversos propósitos. La mayoría de estos estudios se han dirigido a evaluar el potencial antimicrobiano de diversos extractos y de sus aceites esenciales contra microorganismos considerados como patógenos de humanos, animales, plantas y agentes relacionados con la contaminación de los alimentos. Sin embargo la mayoría de estos estudios se han realizado con especies europeas. En el presente estudio, la capacidad antifúngica del aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de *F. oxysporum*, quedó demostrada en medio sólido, en términos de producción de biomasa, como agente desinfectante de semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum* y en plántulas de tomate desarrolladas en cámara de crecimiento.

El rendimiento de cada extracto se obtuvo determinando su peso después de la evaporación total realizada a temperatura ambiente de cada uno de los solventes empleados. Los resultados muestran que el extracto que presentó menor rendimiento fue el obtenido con cloruro de metileno (4.05%), mientras que el de mayor rendimiento fue el extracto metanólico (20.06%), no obstante, este último resultado no representa ventaja alguna, ya que sólo el extracto hexánico (4.13%) presentó una escasa actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* en las cuatro concentraciones estudiadas. Este leve o nulo efecto antimicrobiano concuerda con lo presentado por Vági *et al.* (2005) que reportan una ligera inhibición del extracto etanólico de *O. majorana* L. en concentraciones de 0.05-2.5% g de extracto/100 ml de medio. Se ha sugerido que dicha inactividad se debe a la polaridad de los compuestos a los que se les atribuye la capacidad antifúngica. Esto significa que no pueden ser extraídos con solventes medianamente polares (cloruro de metileno) y polares (metanol). Cabe mencionar, que existe relación de la actividad antifúngica del aceite esencial y del extracto hexánico ya que este solubiliza las grasas y los aceites.

Existen numerosas investigaciones que indican que las diferentes especies de esta planta se caracterizan por poseer un aceite esencial de color amarillento y color intenso. El rendimiento del aceite esencial de la muestra de orégano (*L. berlandieri* Schauer) evaluada fue de 4% en base seca. Los reportes acerca de la producción de aceite esencial de las diferentes especies de orégano son variados. Análisis químicos realizados a *O. vulgare* y *O. syriacum* var. *bavani* indican un rendimiento de 1.3% y 6.7% respectivamente (Albado *et al.*, 2001; Soylu *et al.*, 2007). De las especies mexicanas, el aceite esencial de *Poliomintha longiflora*, tiene un rendimiento de 0.7% (Aranda, 2009), mientras que los resultados reportados para la especie *Lippia* difieren entre autores. Báez *et al.* (2005) indican un porcentaje de recuperación de 2.5 a 3%.; Dunford y Silva (2005), confirman que el rendimiento del aceite esencial varía de 0.7-2.5%; Vázquez y Dunford obtienen una producción del 2.0% y Jacinto *et al.* (2007) reportan un elevado rendimiento del genotipo X6 de 6.3%. Existen diversas opiniones acerca de los factores de los que depende la producción de aceite. Albado *et al.* (2001) menciona que existen publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de *O. vulgare*, que indican que los diferentes rendimientos se deben al tiempo y modo de proceso desde su recolección hasta su extracción. Por otra parte, Jacinto *et al.* (2007) señala que investigaciones anteriores atribuyen estas variaciones factores de calor y sequía o factores de tipo ambiental. Sin embargo no comparte estas opiniones y afirma que la producción y calidad del aceite son atributos ligados a la variabilidad genética de las poblaciones de orégano.

El aceite esencial de orégano, tiene en particular dos componentes principales: carvacrol y timol. La calidad del aceite esencial se basa en la proporción de estos compuestos debido a que son los que representan mayor interés comercial. La composición porcentual de los principales componentes del aceite esencial del orégano evaluado fue de 1.55% de timol y 49.07% de carvacrol.

Diversos estudios han señalado una gran variedad de resultados en la composición fitoquímica del aceite esencial entre las diferentes especies de orégano. *O. vulgare* L., subsp. *hirtum* (Link) es la especie más aceptada por su gran calidad basada en su elevado contenido en aceite esencial. Las concentraciones reportadas de estos compuestos son de 0.2, 6.5, 13.9 y 0.75% de timol y 70.0, 59.0, 61.3 y 44.01 % de

carvacrol (Velluti *et al.*, 2004; Bozin *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Martino *et al.*, 2009).

En el caso de *L. berlandieri* Schauer, reportes indican variaciones en la concentración de ambos compuestos. Lawrence (1984) y Yousif *et al.* (2000), reportan mayor concentración de timol (40-60%) que de carvacrol (5-25%); Hernández *et al.* (2008) y Hernández *et al.* (2009) indican una relación carvacrol-timol de 37.84-6.72% y Dunford y Silva (2005), al someter plantas a condiciones de estrés hídrico, revelan diversas concentraciones de timol y carvacrol (22.7-53.9%) (15.7-50.0%).

La diferencia en las concentraciones detectadas de timol y carvacrol se ha relacionado con la etapa de la plántula, con la madurez fisiológica y con diferentes condiciones de humedad. Los componentes principales del aceite esencial de orégano mexicano son, además de timol y carvacrol, *p*-cimeno, cineole y  $\gamma$ -terpineno (Silva y Dunford, 2005). El aceite esencial obtenido de plantas jóvenes contiene mayores concentraciones de estos compuestos (timol + carvacrol+ *p*-cimene + cineole +  $\gamma$ -terpinene = 60-80%) que las plantas maduras (40-60%) (Dunford y Silva, 2005). Además, las plantas en estado de madurez fisiológica presentan cantidades significativamente mayores de carvacrol (Silva y Dunford, 2005). Jacinto *et al.* (2007) reportan que la mejor calidad de aceite en etapa de plántula se obtiene de los genotipos Z1 (96.96 % de timol) y B1 (82.84 % de carvacrol), mientras que en la etapa de madurez, la mejor calidad se obtiene de los genotipos F4 (99.79 % de timol) y F1 (83.92 % de carvacrol). Finalmente, Dunford y Silva (2005) y Vázquez y Dunford (2005) aseguran que la cantidad de humedad recibida por las plantas no afecta de manera significativa la composición química del aceite esencial orégano mexicano en relación a timol y carvacrol.

En cuanto a su efecto biocida, los resultados presentados en este estudio demostraron claramente que el aceite esencial de orégano Mexicano (*L. berlandieri* Schauer) inhibe considerablemente el desarrollo de *F. oxysporum*. Estos resultados concuerdan con una gran cantidad de publicaciones que han documentado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las diferentes especies de orégano. Así mismo, estudios previos han confirmado la efectividad de diferentes especies de

orégano contra diversas especies de *Fusarium*. Daferera *et al.* (2003) demostraron la efectividad del aceite esencial de *O. vulgare* contra *Fusarium solani* var. *Coeruleum* y Velluti *et al.* (2004) evaluaron la habilidad de 37 aceites esenciales a diferentes condiciones de actividad de agua ( $a_w$ ) y temperatura y reportaron una importante actividad antifúngica contra *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Posteriormente, Lee *et al.* (2007) reporta la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* a través de la fase volátil de *O. vulgare*. Recientemente, Wogiatzi, (2009) realizó pruebas *in vitro* con tres biotipos de *O. vulgare* y un biotipo de *O. onites* L. y confirmó su actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Con respecto a la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, se registraron diferencias entre el método de contacto directo y de la fase volátil. Se observó que el grado de inhibición de la fase volátil fue mayor que el de la fase de contacto. Resultados similares a los presentados en este estudio fueron presentados por Soyly *et al.* (2007) donde reportaron que la fase volátil del aceite esencial de *O. syriacum* var. *bavani* tiene una actividad antifúngica mayor que la fase de contacto en el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotium* en condiciones *in vitro*. Inouye *et al.* (2000), estableció que esta acción fungicida y fungistática se debe a que el micelio fúngico absorbe los vapores del aceite esencial con lo cual se impide el desarrollo del hongo.

En este estudio también pudo ser observado que diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano Mexicano causan una disminución significativa en la producción de biomasa ya que las concentraciones de 0.20 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  mostraron el 100% de inhibición en la producción de biomasa fúngica desde el primer día de experimentación. Con estos resultados quedó demostrado que este aceite crea un ambiente inapropiado para el crecimiento de *F. oxysporum* en medio líquido. Estos resultados concuerdan con los estudios previos presentados por Daouk *et al.* (1995) quienes reportaron la acción antifúngica del aceite esencial de *Origanum syriacum* L. sobre la producción de biomasa de *F.oxysporum* en caldo de extracto de levadura-sucrosa (YES).

En este estudio se observó que la concentración mínima de inóculo requerida para infestar el 100% de las semillas tratadas fue de  $10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Con inóculos de concentración de  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  se obtuvieron porcentajes de infestación de 12.5, 20 y 75 %. En un trabajo similar, Punja y Parker (2000), reportaron que con inóculos de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  tuvieron un porcentaje de mortalidad de 44, 67, 80 y 100 % respectivamente de plantas cucurbitáceas infestadas con *F. oxysporum* f. sp. radicis-cucumerinum.

Las semillas son uno de los principales mecanismos de propagación de enfermedades ocasionadas hongos, bacterias y virus. Esta forma de propagación de enfermedades es una gran preocupación en la agricultura moderna donde es común que grandes cantidades de lotes de semillas sean movidas entre regiones o continentes. En este trabajo se encontró, que a una concentración de 0.5%, el aceite esencial de orégano ejerce un efecto fungicida sobre las semillas de tomate infestadas y no se observaron efectos desfavorables en su germinación debido a la aplicación del aceite. Estos resultados son considerados relevantes ya que existe evidencia de que algunos agentes fitopatógenos pueden infestar nuevas áreas de cultivo vía semillas contaminadas (Menzies y Jarvis, 1994; García-Garza *et al.*, 1999; Ochoa y Ellis, 2002; Garibaldi *et al.*, 2004; Reis y Boiteux, 2007; Bennet *et al.*, 2008). Para evitar lo anterior, los horticultores normalmente realizan otra desinfección de las semillas previa a la siembra a pesar de que estas vengán desinfectadas desde la casa productora (Maroto, 2008). Estos tratamientos previos normalmente son con agua caliente o hipoclorito de sodio. Sin embargo, Menzies y Jarvis (1994) confirmaron que los tratamientos con NaOCl o HCl, 1N, presentan inhabilidad para desinfectar lotes de semillas de tomate infectadas con *F. oxysporum*, Además mencionan que dicha incapacidad para desinfectar las semillas se debe probablemente a que las micronidias, el micelio y algunas veces las clamidosporas del patógeno se encuentran entre las vellosidades de la semilla.

El efecto antimicrobiano del orégano se atribuye a la presencia en el aceite esencial de diversos componentes entre los que se encuentran timol y carvacrol. De hecho estos compuestos se han evaluado de manera independiente y han demostrado ser efectivos agentes antibacterianos y antifúngicos. Por medio de la técnica de difusión en placa, carvacrol inhibe 24 diferentes bacterias (zonas de inhibición de

14.1-45.3 mm de diámetro) que incluyen patógenos de plantas y animales y bacterias que ocasionan putrefacción y deterioro de los alimentos (Dorman y Deans, 2000), y a través de su fase volátil, inhibe el crecimiento micelial de *Monilinia laxa*, causante de la marchitez marrón que es una de las principales enfermedades de las frutas de hueso tanto en el campo como después de la cosecha (Neri *et al.*, 2007). Timol por otra parte, es un importante fumigante del suelo para controlar la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* en el cultivo del tomate (Pradhanang *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción de estos compuestos ha sido ya discutido. De acuerdo a Conner y Beuchat (1984) la acción antimicrobiana de los aceites esenciales se debe al deterioro de una gran variedad de sistemas enzimáticos. Dichos sistemas incluyen a los involucrados en la producción de energía y en la síntesis de compuestos estructurales. Farag *et al.* (1995) mencionan que sus grupos hidroxifenólicos reaccionan formando enlaces puente de hidrógeno con los sitios activos de ciertas enzimas. Por su parte, Nychas (1995) reporta que estos compuestos actúan sobre la membrana citoplasmática de los microorganismos destruyendo su capacidad selectiva, permitiendo con esto la salida de componentes intracelulares. Este hecho, aunado a la capacidad de inactivar enzimas podía explicar la actividad antimicrobiana de estos compuestos. En el caso específico de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, el efecto antimicrobiano se atribuye al daño que producen estos componentes sobre la integridad de la membrana celular lo cual afecta posteriormente la homeostasis del pH así como el equilibrio de los iones inorgánicos (Lambert *et al.*, 2001).

Los resultados presentados en este estudio mostraron claramente la capacidad del aceite esencial del orégano mexicano como un importante inhibidor y agente desinfectante contra *F. oxysporum* en semillas de tomate y en plántulas desarrolladas en cámaras de crecimiento.

Estos resultados son considerados relevantes ya que como se mencionó anteriormente, la industria agroquímica, argumenta que los plaguicidas son indispensables en la agricultura moderna y que sin su uso no se podría alimentar a las poblaciones urbanas crecientes. Sin embargo, la sociedad responde que las

consecuencias sobre la salud humana y el ambiente son muy altas, y que una agricultura sostenible con una reducción drástica de plaguicidas es económicamente posible.

En varios países de América, Asia y Europa, la agricultura orgánica está ganando espacios importantes. Hay cada vez más evidencia científica de que la agricultura orgánica y la agricultura basada en prácticas sostenibles como el manejo integrado de plagas son más rentables a mediano y largo plazo que la agricultura basada en un alto consumo de agroquímicos.

Por lo anterior, el aceite esencial de orégano mexicano podría ser una alternativa para el control de *F. oxysporum*, considerado como uno de los agentes más destructivos y dañinos del cultivo del tomate. Esto basado en que, el aceite esencial de orégano es un producto de origen natural lo que lo convierte en un producto seguro para humanos, animales y medio ambiente. Además la FDA (Food and Drug Administration) lo tiene clasificado como producto GRAS (Generally Recognized as Safe).

## 10. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos concluimos lo siguiente:

- ✓ Los rendimientos obtenidos del aceite esencial y del extracto con cloruro de metileno del orégano mexicano *L. berlandieri* fueron similares con un 4% aprox. y este fue mayor para el extracto metanólico con un 20% aprox.
- ✓ De los extractos evaluados de orégano mexicano *L. berlandieri*, solamente el hexánico mostró actividad fungicida sobre el *F. oxysporum* a concentraciones de 250-1000 ppm.
- ✓ Se confirmó la patogenicidad de *F. oxysporum*, produciendo lesiones sobre plántulas de tomate (*L. esculentum*).
- ✓ El aceite esencial de orégano mexicano *L. berlandieri* mostró actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* en medio líquido con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.2  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ .
- ✓ La concentración mínima de inóculo para infestar el 100% de las semillas de tomate (*L. esculentum*) fue de  $10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ .
- ✓ La concentración efectiva para desinfestar en un 100% las semillas de tomate (*L. esculentum*) es de 0.5 % de aceite esencial de orégano mexicano *L. berlandieri*.
- ✓ La semillas de tomate (*L. esculentum*) tienen la capacidad de germinar en un 88.5% después de ser tratadas con las diferentes concentraciones de aceite esencial orégano mexicano *L. berlandieri*.
- ✓ El porcentaje de mortalidad de la plántula de tomate (*L. esculentum*) disminuyó al incrementar la concentración de aceite esencial de orégano mexicano *L. berlandieri* empleada para desinfectar sus semillas.



## 10. LITERATURA CITADA

Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. ISSN 1424-6376. ARKAT ARKIVOC (vii). pp.116-145

Agrios GN. 2007. Fitopatología. Limusa. México. pp. 57-60:273

Alanís FGJ, Ballester C. 2007. El valor de nuestras plantas. Fondo Editorial de Nuevo León. p. 148.

Alonso AF. 2002. El cultivo de la papa. Mundi-Prensa. España. pp. 228-229

Albert LA. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. Revista de Toxicología en Línea. 1-17.

Albado PE, Saenz FG, Gabriel AS. 2001. Composición química y actividad bacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Revista Médica Herediana. 12: 16-19.

Alpi A, Tognoni F. 1991. Cultivo en invernadero. Editorial Edigrafos. España. p. 266.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4168-4170.

Ames IT. 1997. Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la papa. Pp. 5-7.

Amorós CM. 2003. Producción de Agrios. Mundi-Prensa. España. pp.130-131

Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, García-Espinoza R, Osada-Kawasoe S, Valenzuela-Ureta. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control. Revista Mexicana de Fitopatología. 20: 1-7.

Aranda RJ, Silva VR, Franco HDI. 2009. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) de la localidad Infiernillo en el Municipio de Higuera, N.L., México. Revista de Salud Pública y Nutrición. 10:

Arauz CLF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 137-139; 166-167.

- Arıcı M, Sagdic O, Gecgel U. 2005. Antibacterial effect of Turkish Black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas y Aceites*. 56:259-262.
- Arvy MP, Gallouin F, 2006. Especies, aromatizantes y condimentos. Mundi-Prensa. España. p. 188.
- Askun T, Tumen G, Satil F, Kilic T. 2008. Effects of some Lamiaceae species methanol extracts on potential mycotoxin producer fungi. *Pharmaceutical Biology*. 46: 688-694.
- Atlas RM, Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson-Educación. España. 97-137. (pag 118)
- Auger J, Arnault I, Diwo-Allain S, Ravier M, Molia F, Pettiti M. 2004. Insecticidal and fungicidal potential of *Allium* substances as biofumigants. *Agroindustria*. 3:5-8.
- Audesirk, T., Audesirk, G. y Byers , B.E. 2003. Biología. Evolución y Ecología. Pearson-Educación. México, D.F. 125-138.
- Avila-Sosa R, Gastélum-Franco MG, Camacho-Dávila A, Torres-Muñoz JV, Nevárez-Moorillón GV. 2010. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology* 3: 434-440.
- Baird C. 2004. Química Ambiental. Editorial Reverté S.A. España. pp. 202-203.
- Bajwa R, Khalid A, Shahid T. 2003. Antifungal activity of allelopathic plant extracts III: Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Pathenium hystrophorus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology*. 3: 145-156.
- Baños GPE, Zavaleta ME, Colinas LMT, Luna RI, Gutiérrez AJG. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22:198-205.
- Báez F, Orozco G, Silva R. 2005. Uso de aceite esencial de orégano para el control de enfermedades en hortalizas. Memoria técnica. Segunda reunión nacional sobre orégano. México. Febrero de 2005. pp. 201-207.
- Bao JR, Lazarovits G. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence Fusarium Wilt control. *Phytopathology*. 91:449-456.
- Bárceñas, C. 2005. Química y ecotoxicología de los fungicidas. En: Botello AV, Rendón-von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C. (Eds). Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. 2da Edición, Universidad Autónoma de Campeche. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. p.696.

Bassole HN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 62:209-212.

Baver L. 1987. *Fitopatología*. Limusa. pp. 9-12.

Bennett, R.S., R.B. Hutmacher, R.M. Davis, 2008. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* race 4 in California. *The Journal of Cotton Science* 12: 160-164.

Bernal GME, Mendonça-Junior CG, Mancini-Filho G. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 39: 425-432.

Blancard D. 1990. *Enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa. México. p.179.

Brathwaite CWD, Sosa-Moss C. 1995. *Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México. pp. 39-46.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1822–1828.

Bowers JH, Locke JC. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of Fusarium Wilt in the greenhouse. *Plant Disease*. 84:300-305.

Bowers JH, Locke JC. 2004. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of Phytophthora blight in the greenhouse. *Plant Disease*. 88:11-16.

Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plants essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*.

Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, Corazza FC, Oliveira JV, Cansian RL. 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25:207-211.

Campos GI. 2003. *Saneamiento Ambiental*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. EUNED. Costa Rica. p. 168.

Carrero JM, Planes S. 2008. *Plagas del campo*. Mundi-Prensa. España. p.101; 39-42; 180

Carillo FJA, Montoya RT, García ERS, Cruz OJG, Márquez ZI, Sañudo BAJ. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 123-127.

Casseres E. 1980. Producción de hortalizas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. pp. 96-97.

Castellanos JZ. 2004. Manual de Producción Hortícola en Invernadero. Impresos Profesionales del Centro. Celaya, Gto., México. 318-332.

Castillo GE, Martínez SI. 2007. Manual de Fitoterapia. Masson. Elsevier. p.118.

Cerón RLE, Higuera MBL, Sánchez NJ, Bustamante S, Buitrago G. 2006. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides f. alatae* durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biológica Colombiana. 11:99-109.

Ceylan E, Fung DY. 2003. Comparison and determination of minimum inhibitory concentration of essential oils against *Escherichia coli* O 157:H7. The Bulletin of the Istanbul Technical University. 53: 93-97.

Coelho CA, Cavalcanti SBH, Santos FL, Oliveira LE. 2008. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. Revista Brasileira de Farmacognosia. 19: 236-241.

Conti M, Galitelli D, Lisa V, Lovisolo O, Martelli GP, Ragozzino A, Rana GL, Vovias C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi-Prensa. México. p. 87.

Conner DE y Beuchat LR. 1984. Effect of essential oils from plants on growth of spoilage yeasts. Journal of Food Science. 49:429-434.

Cremlyn R. 1982. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Limusa. México. pp.149-154.

Chandniwala KM. 2005. Recent advances in plant pathology. Printed at Mehra Press, Delhi. India. p. 183.

Chávez TL, Díaz C.F, Escalante RG, Estrada ME. 2008. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. CIMEL. 13: 45-48.

Díaz FA. 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Trillas. pp.9-15.

Dikbas N, Kotan R, Dadasoglu F, Karagoz K, Cacmarkci R. 2009. Correlation between major constituents and antibacterial activities of some plant essential oils against some pathogenic bacteria. Turkish Journal of Science and Technology. 4:57-64.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2000. GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 2576-2581.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003. The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22:39-44.

Daouk RK, Dagher SM, Sattout EJ. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*. 58: 1147-1149.

DGAPEAS. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. 2009. Monografía Tomate Rojo (Jitomate). Con datos de elaboración del Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON) y Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP) (SAGARPA)

Donli P, Dauda H. 2003. Evaluation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts. *Pest Management Science*. 59:1060-1062.

Dorman HJD y Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.

Dulger B. An investigation on antimicrobial activity of endemic *Origanum solymicum* and *Origanum bilgery* from Turkey. *Afr. J. Traditional*. 2: 259-263.

Dunford NT, Silva-Vazquez R, 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture* 7: 20-22.

Durán QA, Mora AD, Ramírez OL. 1998. Enfermedades y otros problemas de las plantas: reconocimiento de campo. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. pp. 46-48.

Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 64: 1019-1024.

Faleiro L, Graça M, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2005, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8162–8168

Farag RS, Daw ZY, Abo-Raya SH. 1995. Influence of some spice essentials oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science*. 54:74-76.

Fonnegra GR, Jiménez RSL. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia, 2007.p. 368.

Forster RL, Seifers DL, Strausbaugh CA, Jensen SG, Ball EM, Harvey TL. 2001. Seed Transmission of the *High Plains virus* in Sweet Corn. *Plant Disease*. 85:696-699.

Gamboa AR, Hernández CFD, Guerrero RE, Sáncnez AA, Lira SSH. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont (De Barry) con extractos vegetales metanólicos de hojaseén (*Flourensia cernua* D.C.). 2003. Revista Mexicana de Fitopatología. 21:13-18.

Garcés GE, Coba GB, Castillo ONI. 1997. Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 5-8.

García-Garza, J.A., D.R. Fravel, A.J. Nelson, K.S. Elias, B.A. Bailey, E.G. Arévalo, L.C. Darlington, 1999. Potential for dispersal of *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythoxyl* by infested seed. Plant Disease 83: 451-455.

García V. 1995. Introducción a la Microbiología. Editorial Universidad Editorial A Distancia. Costa Rica. pp. 103-106.

Garibaldi A, Gilardi G, Gullino ML. 2004. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Phytoparasitica 32: 61-65.

Giacconi MV, Escaff GM. 2004. Cultivo de Hortalizas. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. p. 267

Gil HF. 2005. Tratado de medicina del trabajo. MASSON S.A. España. p. 823

Gilchrist-Saavedra L, Fuentes-Dávila G, Martínez-Cano C, López-Atilano RM, Duveiller E, Singh RP, Henry M, García AI. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. p.48.

Golcz A, Seidler-Łożykowska K. 2009. content of microelements in raw materials of Basil (*ocimum basilicum* L.), Savory (*satureja hortensis* L.) and Marjoram (*Origanum majorana* L.) collected in the different stages of plant development. Nauka Przyroda Technologie.3: 1-7.

Gómez I. 2003. Saneamiento Ambiental. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica. pp. 167-169

González LC. 1976. Introducción a la Fitopatología. Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. pp. 78-79.

González LC. 1981. Introducción a la Fitopatología. Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. pp. 39-43.

González AJ. 2004. Virus fitopatógenos transmisibles por semilla en judía tipo "granja asturiana". Patología Bol. San. Veg. Plagas. 30: 595-603

González-Farías F. 2004. Pesticides in the coastal zone of Mexico. En: Pesticide residues in coastal tropical ecosystems: distribution, fate and effects. Taylor MD, Klaine SJ, Carvalho FP, Barceló D, Everaarts J. Published by Routledge.USA. Canada. p. 318

Gupta GP. 2004. Text book of plant disease. Tarun Offset Printers, Dehli. India. p.77

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extrats. Journal of Applied Microbiology. 86:985-990.

Hayes AJ, Markovik B. 2002. Toxicity of Australian Essentials oil *Backhousia citradora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food and Chemical Toxicology. 40:535-543.

Heras J, Fabeiro C, Meco R. 2003. Fundamentos de agricultura ecológica: realidad actual y perspectivas. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. España. pp. 166-167.

Hernandez-Hernandez, E, Ponce-Alquicira, E, Jaramillo-Flores, ME, Guerrero-Legarreta I. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Science. 81: 410-417.

Hernández TTA, Montoya HR. 1989. Epidemiología cuantitativa aplicada al análisis de algunas enfermedades de cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. OEA. Costa Rica. pp. 11-17.

Hernández T, Canales M, Ávila J, Durán A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Journal of Ethnopharmacology. 88:181-188.

Hernández T, Canales M, Ávila JG, García AM, Meraz S, Caballero J, Lira R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8: 295-300.

Hernández T, Canales M, García AM, Durán A, Meráz S, Dávila P, Ávila JG. 2008. Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 7:202 – 206.

Huerta CM. 1997. Orégano Mexicano: Oro vegetales. Biodiversitas. 15: 8-13.

Inouye, Tsuruoka, Watanabe, Takeo, Akao, Nishiyama, Yamaguchi. 2001. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. Mycoses. 43: 17-23.

Jacinto SR, A. Flores Hernández; R. Castro Franco; R. Silva V. 2007. Identificación y selección de genotipos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobresalientes en producción de timol y carvacrol. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. 6: 25-36.

Jiménez, CBE. 2005. La contaminación ambiental en México. Limusa. México. pp. 88-91.

Kintzios SE. 2002. Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. International Ltd. Padstow. Cornwall. pp.3-6.

Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. 1998. Zinsser Microbiología. Panamericana. Argentina.1427-1440.

Karaman, Sengul, Ilcim, Ahmet, Digrak, Metin. 2004. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Origanum bargyli* Mouterde from Turkey. Journal of Essential Oil Research.

Karanika MS, Komaitis M, Aggelis G. 2001. Effect of aqueous extracts of some plants of Lamiaceae family on the growth of *Yarrowia lipolytica*. International Journal of Food Microbiology. 64: 175-181.

Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, Siddiqui MU, Khan AU. 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules. 14, 586-597.

Koike ST, Gladders P, Paulus AO. 2007. Vegetable disease. A color handbook. Academic Press. London. p.22.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G.-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. 91: 453-462.

Langer RHM y Hill GD. Agricultural plants. Cambridge University Press. United States. p. 288.

Lawrence BM, 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. Perfum. Flavor 9:41-51.

Lee SO, G.K. Ja, K.J. Soo, H.L. Kyoung, K.C. Yun, K. Jin-Cheol, 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal 23:97-102.

López BA, López-Betancourt SR, Mendoza EM. 2005. Efecto de extractos vegetales en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kun *in vitro* y en plantas de frijol susceptible. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. CIGA, ITA, No. 33 Celaya, Guanajuato.

López GGA. 2006. Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Mundi-Prensa. España. p. 1359.



Maldonado ALJ. 1990. Descripción botánica, distribución y usos del orégano en México. El estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Primera reunión nacional sobre orégano. Bermejillo, Dgo. México. 2:41-44.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Harry G. Preuss HG. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 228:111-117.

Maroto JV. 2008. Elementos de Horticultura General. Mundi-Prensa. España. p. 315.

Martí MJA, Desoille H. 2002. Medicina del trabajo. Editorial Masson, S.A. España. pp. 271-274.

Martino DL, Vincenzo DF, Nazzaro F. 2009. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules*. 14: 4213-4230.

Maselli A, Guevara Y, Subero L. 2002. Detección y transmisión de *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* a través de semillas de girasol. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:114-117.

Menzies JG, Jarvis WR. 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology* 43: 378-386.

Meza M, González CN, Usubillaga A. 2007. Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. *Revista de la Facultad de Agronomía. (LUZ)*. 24: 725-738.

Morales F, Cardona C, Bueno JM, Rodríguez I. 2006. Manejo integrado de enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. Centro Internacional de Agricultura Tropical. pp. 1-8.

Müller, G. 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Acribia. España. 59-64.

Muñoz AA, Castañeda ML, Blanco KM, Cárdenas CY, Reyes JA, Kouznetsov VV. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et Technica*. 13:125-128.

Murray TD. 2006. Seed Transmission of *Cephalosporium gramineum* in Winter Wheat. *Plant Disease*. 90:803-806.

Neri F, Mari M, Brigati S, Bertolini P. 2007. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. *Plant Disease*. 91:30-35.

Nuez F. 2001. El cultivo del tomate. Capítulo 1. Situación Taxonómica, Domesticación y difusión del tomate. Por: José Esquinas-Alcázar y Fernando Nuez Viñals. pp. 15-42. Ediciones Mundi Prensa. Bilbao España. Obra Coordinada y Dirigida por Fernando Nuez. p.538.

- Nuez VF, Gil OR, Costa GJ. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi Prensa. España. p.199.
- Nychas GJE. 1995. Natural antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation, ed. Gould, G.W. pp. 58-89. London: Blackie Academic Professional.
- Ocampo-Velázquez RV, Malda-Barrera GX, Suárez-Ramos G. 2009. Biología reproductiva del orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. NOTA en Agrociencia. 43: 475-482.
- Ochoa JB, Ellis MA. 2002. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* in common naranjilla (*Solanum quitoense*) in Ecuador. Online. Plant Health Progress DOI:10.1094/PHP-2002-0719-01-HN.
- Odum EP. 2003. Ecología: El vínculo entre las ciencias naturales y las sociales. Continental. México. pp. 250-259.
- Oliveira JLTM, Melo DMF, Oliveira LE, Souza EL, Nogueira TV, Cavalcante SBH. 2009. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. Brazilian Archives of Biology and Technology. 52: 45-50
- Ortiz-Cañavate J. 2003. Las máquinas agrícolas y su aplicación. Mundi-Prensa. España. pp. 226-227
- Özbay H, Alim A. 2009. Antimicrobial activity of some water plants from the Northeastern Anatolian Region of Turkey. Molecules. 14, 321-328.
- Pahalawatta V, Druffel K, Pappu HR. 2007. Seed transmission of *Dahlia mosaic virus* in *Dahlia pinnata*. Plant Disease. 91:88-91.
- Padulosi S. 1997. Oregano. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Italia. pp.1-12.
- Pamplona RJD. 2006. Salud por las plantas medicinales. Editorial Safeliz SL.
- Paredes AMC, Gastélum FMG, Silva VR. 2007. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género vibrio. Revista Fitotecnia Mexicana. 30:261-267.
- Pasqua DR, De Feo V, Villani F, Mauriello G. 2005. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Vervenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and bacteria. Annals of Microbiology. 55:139-143.
- Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection. 58:81-85.
- Pelczar MJ, Reid RD, Chan EC. 1990. Microbiología. Mc. Graw Hill. México. pp. 247-269.

Plotto A, Roberts DD, Roberts RG. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) ISHS. Acta Horticulture. 22:279-283.

Portillo-Ruiz MC, Viramontes-Ramos S, Muñoz-Castellenos LN, Gastélum-Franco M G, Nevárez-Moorillón GV. 2005. Antifungal activity of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). Journal of Food Protection. 12:2713-2717.

Pouvova D, Kokoskova B, Pavela R, Rysanek P. 2008. Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, *in vitro*. Zemdirbyste-Agriculture. 95 : 440–446.

Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones, JB. 2003. Effects of plant essential oil on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant Disease. 84:423-427.

Primo YE. 1995. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria Editorial Reverté. Tomo II. España. pp. 1185-1194.

Punja PK, Parker M. 2000. Development of Fusarium root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumbers in British Columbia caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. Canadian Journal of Plant Pathology. 22:349-363.

Qari SH. 2008. *In vitro* evaluation of the anti-mutagenic effect of *Origanum majorana* extract on the meristemetic root cells of *Vicia faba*. Journal for Science of Taibah University. 1: 6-11.

Randall-Schadel BL, Bailey JE, Beute MK. 2001. Seed transmission of *Cylindrocladium parasiticum* in Peanut. Plant Disease. 85:362-370.

Reddy AS, Hobbs HA, Delfosse P, Murthy AK, Reddy DVR. 1998. Seed transmission of Indian peanut clump virus (IPCV) in peanut and millets. Plant Disease. 82:343-346.

Reis A, Boitetux LS. 2007. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. Horticultura Brasileira. 25: 451-454.

Rennie WJ, Cockerell V. 2006. Seedborne diseases. En: The epidemiology of plant diseases. Cooke BM, Jones DG, Kaye B. Springer. Dordrecht Netherlands. pp.357

Reyes CJ, Ortega RS. 2005. Aprovechamiento, manejo y cultivo del orégano en la Región Lagunera. Folleto para productores. INIFAP.

Rivera CG. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Pp. 6-13.

Rivero LM, Álvarez GM, López AT, González CJ. 1997. Actividad antifúngica *in vitro* del *Pinus caribaea* (Pino macho). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2:25-29.

Rodríguez DA, Sanabria ME. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniasis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *Interciencia*. 30:739-734.

Rodríguez SD, Harue EE, Prado DFB, Vataru NC, Estivaleti STI, Souza, A, Rodríguez FH, Muñoz LS, Alcorta GE. 2006. El Tomate Rojo. Sistema Hidropónico. Trillas. 43-61

Rodríguez RR, Tabares RJM, Medina SJJA. 2001. Cultivo moderno del tomate. Mundi-Prensa. España. p.168.

MIG, Di Pietro A, Ruiz-Roldán MC, Huertas-González MD, Garcia- Maceira FI, Jiménez EMA, Caracuel Z, Sancho-Zapatero R, Hera C, Gómez-Gómez E, Ruiz-Rubio M, González-Verdejo CI, Páez MJ. 2000. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 47-53.

Rose S, Parker M, Punja ZK. 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber. *Plant Disease*. 87:1462-1470.

Rubies-Autonell C, Turina M. 1997. Seed transmission of hibiscus latent ringspot virus (HLRSV). *Plant Disease*. 81:1082-1084.

Ruiz-Frutos C, García AM, Delclos J, Benavides FG. 2007. Salud laboral: conceptos y técnicas para la prevención de riesgos laborales. Editorial Masson. España. pp. 437-438.

Saeberg AC, Labbe RG, Shetty K. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by ethyl clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). *Food Biotechnology*. 17:129-149.

Sagdic O, Kuscu A, Ozcelik S. 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 19:473-480.

Salgueiro LR, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Cunha AP. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*. 69:80-83.

Sánchez CM. 2001. Manejo de enfermedades del tomate. Curso del INCAPA. Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 22-39.

Santamarina SP, García BFJ, Roselló CJ. 1997. Biología y Botánica. Universidad Politécnica de Valencia. España. p. 59

Santos M, Diáñez F, Cara M, Tello JC. 2004. Tomates. Producción y Comercio. Ediciones Horticultura. España. pp. 47-61.

Shahidi BGH, Aghighi S, Karimi NA. 2004. Antibacterial and antifungal survey in planta used in indigenous herbal-medicine of South East Regions of Iran. *Journal of Biological Sciences*. 4: 405-412.

Sharma PD. 2004. *Plant Pathology*. Printed at Rajsons Printers. New Deli, India. pp 40-41.

Silva VR, Dunford NT, 2005. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant growth. *Journal of Essential Oil Research* 17: 668-671.

Smith IM, Dunez J, Lelliot RA, Phillips DH, Archer SA. 1988. *Manual de Enfermedades de las plantas*. Mundi-Prensa. España. p.334- 337.

Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Dejan D, Brkić DD, Vlatka VV, Griensven LJLD. 2009. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*. 14: 238-249.

Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Bostoglou N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*. 25:120-127.

Sosa-Moss C, Perdomo RF, Brathwaite CWD, Salazar CJJ. *Manual de técnicas para diagnóstico de las enfermedades de la plantas*. 1999. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. Agencia de Cooperación Técnica. IICA. México. pp .11:162-186.

Souza EL, Stamford TLM, LimaEO. 2006. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:527-532.

Soylu S, Yigitbas H, Soyly EM, Kurt S. 2007. Antifungal effects of essential oil of oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1021-1030.

Strand LR, Mary L. Flint ML. 1998. *Integrated pest management for tomatoes*. University of California. Statewide integrated pest management project division of agriculture and natural resources. Publication 3274. United States of America. pp 78-79.

Struck C, Mendgen K. 1998. Infection strategies. En: Gareth JD. 1998. *The epidemiology of plant diseases*. Kluwer Academic Publishers. Great Britain. pp. 110-113.

Summerell BA, Baharuddin S, Leslie JF, 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87: 117-128.

The American Phytopathological Society. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa. España. p.15.

Tafur GG., Martínez JR., Stashenko EE. 2005. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*. 34: 43-55.

Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*. 89:901-909.

Ulloa M, Hanlin RT.1978. Atlas de Micología Básica. Concepto. México. 29-56.

Uribe-Hernández CJ. 1992. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B. K. from Jalisco, México. *Journal of Essential Oil Research*. 4: 647-649.

Vági E, Simándi B, Suhajda Á, Héthelyi É. 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*. 38: 51-57.

Vaillant FD, Romeu CC, Ramos RE, González GM, Ramírez OR, González PJ. 2009. Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislados de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.) *Fitosanidad*. 13:197-200.

Valenzuela UJG. 1997. La situación y perspectivas comerciales de la actividad hortofrutícola en México y sus implicaciones dentro del TLC. En: *Producción y Mercados Competitivos para Frutas y Hortalizas de la Región Andina*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura/Centro Regional Andino. pp. 41-44.

Vallejo CA.1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp. 136.

Vanaclocha B, Cañigüeral S. 2006. *Fitoterapia*. Masson. Elsevier. España. p.392.

Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, 2004. *Plant Surface Microbiology*. Sringer. Germany p.16

Vatansever L, Gülmez M, Oral N, Güven A, Otlu S. 2008. Effects of sumac (*Rhus coriaria* L), oregano (*Oreganum vulgare* L) and lactic acid on microbiological decontamination and shelf-life of raw broiler drumsticks. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*.14: 211-216.

Vázquez, S.R., N.T. Dunford, 2005. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant growth. *Journal of Essential Oil Research* 17: 668-671.

Velázquez-Gurrola A, Angulo-Escalante MA, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, Guerrero- Ontiveros C. 2005. Actividad antifúngica de extractos con metabolitos secundarios de semillas de *Moringa oleífera* para el control de *Rhizopus stolonifer* .

Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, México. Resumen L-40.

Velluti A, Marín S, Gonzalez P, Ramos AJ, Vicente Sanchis V. 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*.21: 649-656.

Vidhyasekaran P. 2004. Concise Encyclopedia of Plant Pathology. The Haworth Press Inc. United States of America. p. 83.

Villalva QS. 2005. Plagas y enfermedades de jardines. Mundi-Prensa. España. p. 27.

Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez, 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety* 27: 91-101.

Walker JC. 1975. Patología Vegetal. Omega. España. 299-302.

Wilke AL, Bronson CR, Tomas A, Munkvold GP. 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Disease*. 91:1109-1115.

Wogiatzi E, Gougoulas N, Papachatzis A, Vagelas I, Chouliaras N. 2009. Chemical composition and antimicrobial effects of Greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnol. & Biotechnol.* 23:1322-1324.

Yang Y, Kim KS, Anderson EJ. 1997. Seed transmission of cucumber mosaic virus in spinach. *Phytopathology* 87:924-931.

Yanggen D, Crissman C, Espinosa P. 2003. Los plaguicidas: Impacto en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Ediciones Abya-Yala. Ecuador. P. 49.

Young MMC, Ueda-Nakamura T, Garcia CDA. 2009. Chemical composition and antimicrobial properties of *Piper ovatum* Vahl. *Molecules*. 14, 1171-1182.

Yousif AN, Durance TD, Scaman CH, Girard B. 2000. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air, and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *Food Chemistry and Toxicology*. 65:926-930.

Zapata R, Sanabria ME, Rodríguez D. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de Cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert). *Interciencia*. 28:302-306.

Zhang JW, Li SK, Wu WJ. 2009. The main chemical composition and *in vitro* antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules*.14, 273-278.

Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. 2005. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of Food Science*.70: M45-M51.

## ANEXO

TABLA I

**Clasificación química de los fungicidas**

<b>Grupo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Ejemplos</b>
Inorgánicos	Azufre	Caldo bordelés
	Derivados del cobre	Sulfato de cobre
Organometálicos	Organoestáticos	Acetato de fenilestaño
	Organomercuriales	Derivados de alquimercurio
	Ditiocarbámicos	Zineb, Mancozeb, Maneb
	Fenólicos	Pentaclorofenol, DNOC
Orgánicos	Ftalímicos	Captán, Foltep, Captafol
	Sulfonamidas	Bensulide
	Bencimidazoles	Benomilo, Tiabendazol
	Quinonas	Cloranilo
	Tiofanatos	Tiofanato
	Oxatinas	Carboxim



TABLA II

**Clasificación de los fungicidas en base a su acción sobre las funciones vitales de los hongos.**

Tipo	Ejemplo	Características
Fungicidas que actúan como tóxicos generales	Azufre elemental	Se aplica como polvo o Azufre coloidal, previene enfermedades de hongos epífitos, sublimándose como gas y sustituyendo el oxígeno del citoplasma de las esporas provocando su muerte. Se utilizan en fruticultura, en grandes dosis y como parte del Azufre cae al suelo, puede ser aprovechado como fertilizante.
	Ftalamidas	Son derivados del ácido ftálico. Utilizados por su eficacia y baja toxicidad para animales. Actúan como tóxicos generales ya que reaccionan con grupos -tiol desnaturalizando proteínas y provocando la muerte del hongo.
	Fungicidas a base de cobre	Están desarrollados a partir de CuSO <sub>4</sub> que neutralizado con otras sustancias forman un caldo viscoso que se adhiere a la superficie de las plantas, hojas y frutos. Se utiliza para hongos endófitos. El ión cúprico (Cu <sup>2+</sup> ) penetra en la espora alterando el metabolismo, sustituyendo metales de metaloenzimas, inactivándolas. Actualmente se utiliza el caldo bordelés en dosis que no afectan a las plantas.
	Dialquilditiocarbamatos	Son moléculas que pueden inhibir el sistema enzimático piruvatodescarboxilasa, esencial en la respiración. Además se degrada con facilidad y tienen toxicidad muy baja.
	Dimetilditiocarbamatos	Con presencia de Cobre en el medio, lo acompañan permitiendo la penetración en el hongo.
	Etilen-bis-ditiocarbamatos	Son derivados del ácido etilen-bis-ditiocarbámico. Se formulan como: sal sódica (Nabam), complejo con Manganeso (Maneb), complejo con Zinc (Zineb), o mezclas de complejos Zinc y Manganeso (Mancozeb). También actúan desnaturalizando proteínas del hongo y generando su muerte.
	Monometilditiocarbamatos	Derivan del ácido monometil ditiocarbámico, que también desnaturaliza proteínas reaccionando con los grupos -tirol de estas. Es utilizado como sal sódica (Metam sodio), es utilizado en tratamientos de suelo por su gran volatilidad.
Fungicidas que actúan sobre la respiración	Carboxamidas Estrobilurinas	Actúan a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Tienen la particularidad de actuar sobre hongos externos (oidios) e internos (mildius). Son muy importantes en horti-fruticultura y pueden sustituir tratamientos de Azufre y Cobre.
Fungicidas que actúan sobre división celular, la síntesis de ácidos nucleicos y la biosíntesis de proteínas	Imidazoles	Alteran la biosíntesis de tubulina impidiendo la división celular.
	Fenilcarbamatos	Actúan de igual manera, aunque se utilizan más los Bencimidazoles, en mayores dosis para evitar resistencia y debido a que tienen una mayor selectividad
	Triazoles	Estos productos alteran la biosíntesis de esteroides, impidiendo que los hongos crezcan, por alteración de la permeabilidad de la membrana. Suelen actuar en las últimas etapas y son muy selectivos.
Fungicidas que actúan sobre la integridad de la pared celular.	Imidazoles, Pirimidinas, Piperazinas, Morfolinas y Guanidinas	Compuestos por un heterociclo con 5 eslabones y 3 átomos de N, uno de los cuales se une a un C. Todo este forma el grupo reactivo, el resto de la molécula sólo influye en la solubilidad del agua. Tienen carácter surfactante, que son moléculas que se pueden repartir en una interfase agua-lípido y consiguen generar una emulsión alterando la integridad de la membrana afectando su selectividad.
Fungicidas sin un mecanismo de acción definido	Dicarboximidias	Tienen importancia en fruticultura, ya que controlan el crecimiento de un hongo endófito, el <i>Botrytis cinera</i> , la molécula está formada por un anillo bencénico enlazado a un heterociclo de 5 eslabones con 1 ó 2 heteroátomos.

Jiménez, 2005

TABLA III  
Especies del género *Origanum*

SECCIÓN	ESPECIE
<b>Amaracus</b> (Gleditsch) Benth	<i>O. boissieri</i> Ietswaart
	<i>O. calcaratum</i> Jussieu
	<i>O. cordifolium</i> (Montbret et Aucher ex Benth) Vogel
	<i>O. dictamnus</i> L.
	<i>O. saccatum</i> Davis
	<i>O. solymicum</i> Davis
	<i>O. symes</i> Carlström
<b>Anatolicon</b> Benth	<i>O. akhdarensense</i> Ietswaart et Boulos
	<i>O. cyrenaicum</i> Beguinot et Vaccari
	<i>O. hypericifolium</i> Schwarz et Davis
	<i>O. libanoticum</i> Boissier
	<i>O. scabrum</i> Boissier et Heldreich
	<i>O. sipyleum</i> L.
	<i>O. vetteri</i> Briquet et Barbey
<b>Brevifilamentum</b> Ietswaart	<i>O. pampaninii</i> (Brullo et Furnari) Ietswaart
	<i>O. acutidens</i> (Handel-Mazzetii) Ietswaart
	<i>O. bargyli</i> Mouterde
	<i>O. brevidens</i> (Bornmüller) Dinsmore
	<i>O. haussknechtii</i> Boissier
<b>Longitubus</b> Ietswaart	<i>O. roundifolium</i> Boissier
	<i>O. amanu</i> Ietswaart m Post
Chilocalyx (Briquet) Ietswaart	<i>O. bigleri</i> Davis
	<i>O. micranthum</i> Vogel
	<i>O. microphyllum</i> (Benth) Vogel
	<i>O. minutiflorum</i> Schwartz et Davis
	<i>O. majorana</i> L.
<b>Majorana</b> (Miller) Benth	<i>O. onites</i> L.
	<i>O. syriacum</i> L. var. <i>Syriacum</i>
	var. <i>bevanii</i> (Holmes) Ietswaart
	var. <i>sinaicum</i> (Boissier) Ietswaart
	<i>O. dayi</i> Post
<b>Campanulaticalyx</b> Ietswaart	<i>O. isthmicum</i> Danin
	<i>O. ramonense</i> Danin
	<i>O. petraeum</i> Danin
	<i>O. punonense</i> Danin
	<i>O. jordanicum</i> Danin & Künne
<b>Elongatispica</b> Ietswaart	<i>O. elongatum</i> (Bonnet) Emberger et Maire
	<i>O. floribundum</i> Munby
	<i>O. grosii</i> Pau et Font Quer ex Ietswaart
<b>Origanum</b>	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>Vulgare</i>
	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>glandulosum</i> (Desfontaines) Ietswaart.
	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>gracile</i> (Koch) Ietswaart.
	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>hirtum</i> (Link) Ietswaart.
	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>viridulum</i> (Martrin-Dons) Nyman.
	<i>O. vulgare</i> L., subsp. <i>virens</i> (Hoffmannsegg & Link) Ietswaart.
	<i>O. compactum</i> Benth
<b>Prolaticorolla</b> Ietswaart	<i>O. ehrenbergii</i> Boissier
	<i>O. laevigatum</i> Boissier

Padulosi, 1997

TABLA VI

Resultados del análisis bromatológico de las hojas secas de *Poliomintha longiflora* y *Lippia berlandieri*.

Análisis	Orégano base seca ( <i>Poliomintha longiflora</i> ) (%)	Orégano base seca ( <i>Lippia berlandieri</i> ) (%) (Silva, 2005)
Materia seca	88.39	----
Humedad	11.60	----
Proteína cruda	12.07	11.7
Nitrógeno	1.93	----
Cenizas	10.17	9
Extracto etéreo	3.35	6.4
Fibra cruda	10.37	11
Extracto libre de nitrógeno (carbohidratos)	63.74	53.9

Fuente: Aranda *et al.*, 2009

TABLA V

Principales especies conocidas en México como orégano

Nombre científico	Familia	Nombres comunes y distribución geográfica
<i>Lippia berlandieri</i> Schauer	Verbenaceae	Orégano de Castilla, salvia (Coahuila, Durango, Jalisco, Querétaro, Sinaloa, Zacatecas.)
<i>Paliomintha longiflora</i> Gray	Labiatae	Orégano (Coahuila, Nuevo León)
<i>Brickellia veronicaefolia</i> H.B.K.	Asteraceae (Compositae)	Orégano de cerro (Chihuahua), orégano de campo (México), orégano de monte (Puebla.)
<i>Calamiutha potosina</i> Schaff.	Labiatae	Orégano de Sierra (S.L.P.),
<i>Dalea greggi</i> Gray	Fabaceae (Leguminosae)	Orégano cimarrón (Chihuahua, Oaxaca, Puebla, S.L.P., Sonora.)
<i>Gardoquia micromerioide</i> Hemsl. (Schaffner)	Labiatae	Orégano (S.L.P.)
<i>Hedeoma floribunda</i> Standl.	Labiatae	Orégano (Chihuahua, S.L.P., Sonora.)
<i>Hedeoma patens</i> Jones	Labiatae	Orégano salvia real (Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Sinaloa, Sonora.)
<i>Lantana involucrata</i> L.	Verbenaceae	Orégano, peonía, colorada, tareté (Michoacán, Sinaloa, Tamaulipas)
<i>Lantana velutina</i> Mart.	Verbenaceae	Orégano (Guanajuato, S.L.P., Tamaulipas.)
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	Verbenaceae	Orégano (Campeche, Yucatán)
<i>Lippia palmeri</i> Watson	Verbenaceae	Orégano (Baja California, Chihuahua, Sinaloa, Sonora)
<i>Monarda austromontana</i> Epl.	Labiatae	Orégano (Chihuahua, Sonora)
<i>Monarda citriodora</i> Cerv	Labiatae	Orégano (Chihuahua, Nuevo León., Sonora)
<i>Origanum mejorana</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, huertos familiares)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, parcelas y huertos familiares)

Huerta, 1997

## RESUMEN CURRICULAR

María Cristina Cueto Wong

Candidato para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL Y DIFERENTES EXTRACTOS DE ORÉGANO (*Lippia berlandieri* Schauer) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum* TANTO *in vitro* COMO EN PLÁNTULA DE TOMATE

Campo de Estudio: Ciencias de los Alimentos

### DATOS PERSONALES:

Nacionalidad: Mexicana

Fecha de Nacimiento: 19 de Mayo 1962

Puesto Actual: Catedrático J-21, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Torreón, Coah.

### ESTUDIOS REALIZADOS:

Maestro en Ciencias en Desarrollo y Procesamiento de Alimentos.

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Juárez del Estado de Durango.

Gómez Palacio, Dgo. 2003.

Químico Farmacobiólogo.

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Coahuila.

Saltillo, Coah., 1984.

### PUBLICACIONES

Cueto, W. C. y Rivas, M.C. 2007. Determinación del efecto antifúngico del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* aislado de plantas de tomate. RESPYN. (1)

Cueto-Wong, M.C., Rivas-Morales, C., Alanís-Guzmán, M.G., Oranday-Cárdenas, A., Amaya-Guerra<sup>2</sup>; C.A., Núñez-González A., José Alfredo Samaniego-Gaxiola J.A., Pedro Cano-Ríos, P. 2009. Fungicida a base de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) para el control de *Fusarium oxysporum* en semilla de tomate. Revista Latinoamericana de Química. Suplemento especial. p. 119.

Cueto-Wong, M.C., Rivas-Morales, C., Alanís-Guzmán, M.G., Oranday-Cárdenas, A., Amaya-Guerra, C.A., Núñez-González A., José Alfredo Samaniego-Gaxiola J.A., Pedro Cano-Ríos, P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Que será publicado en el volumen 31 de la Revista Mexicana de Micología que aparecerá en junio de 2010.

## **PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

Cueto, W. C., Samaniego, G. J. A., Rivas, M. C. y Cano, R. P. 2008. Uso del Aceite Esencial de Orégano Mexicano (*Lippia berlandieri* Shauer) como tratamiento-fungicida in vitro en semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para el control de *Fusarium oxysporum* Schltdl. Memeoria de la XX Semana Internacional de Agronomía. UJED - FAZ. 5-7 de Noviembre. Gómez Palacio, Durango, México. P 190-192.

Cueto-Wong C. Comunidad de Instituciones de Educación Superior de la Laguna. Marzo, 2010. Ponente. Productos Naturales para el Control de Agentes Fitopatógenos. Segundo Encuentro Regional de Investigadores.