

Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio

Effect of some essential oils on the growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary under laboratory conditions

Yazmid Adriana Carrillo¹, María Isabel Gómez¹, José Miguel Cotes² y Carlos Eduardo Núñez^{1,3}

RESUMEN

Entre los factores más limitantes del cultivo de papa se encuentra *Phytophthora infestans*, agente causal de la llamada “gota”. El control químico de esta enfermedad representa entre el 7 y el 10% de los costos totales del cultivo, y tiene un alto impacto ambiental por la contaminación que ocasiona. La búsqueda y aplicación de prácticas alternativas para el control de este patógeno es importante para disminuir tanto la utilización de fungicidas como los costos de producción del cultivo. Numerosos estudios realizados *in vitro* demuestran que algunos aceites esenciales tienen propiedades fungicidas y fungistáticas sobre diferentes patógenos. Por ello, el objetivo del presente estudio consistió en la evaluación de ocho aceites esenciales extraídos de algunas especies aromáticas de la familia Lamiaceae sobre el crecimiento de *P. infestans* en condiciones de laboratorio. Se evaluaron diferentes metodologías de aplicación de los productos en estudio, encontrándose que las más apropiadas son aquellas en que el aceite ejerce un efecto volátil. Los aceites esenciales fueron *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* y *Pogostemon cablin* se evaluaron en su fase volátil, a través de su efecto sobre dos aislamientos de *P. infestans* (A13 y A15). Los aceites que mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans* fueron los de *T. vulgaris* y *M. piperita*, los cuales redujeron el crecimiento del hongo en 92,1 y 89,9%, respectivamente; y por ello pueden ser considerados promisorios para ser evaluados en campo.

Palabras clave: papa, gota, especies aromáticas, Lamiaceae.

ABSTRACT

One of the most limiting factors of potato cultivation is *Phytophthora infestans*, the causal agent of “Late blight”. The chemical control of this disease not only responds for 7 to 10% of total crop costs, but also takes a considerable toll on the environment due to resulting pollution. Thus, the search and application of alternative practices for the control of this pathogen is of central importance for reducing the use of fungicides and, consequently, the cultivation costs. Given that several *in vitro* studies have shown certain essential oils to have fungicidal and fungistatic properties on different pathogens, the present research study was aimed at assessing the effect of eight essential oils extracted from equal number of aromatic species of the family Lamiaceae, on the growth of *P. infestans* under laboratory conditions. Different essential oil application methodologies were tested, the most appropriate ones being those that produced a volatile effect. Evaluated in terms of the performance of the volatile phase of their extracted oils against two isolates of *P. infestans* (A13 and A15), the studied species were *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris*, and *Pogostemon cablin*. *T. vulgaris* and *M. piperita* oils were the ones found to inhibit the growth of *P. infestans* cultures, by 92.1 and 89.9%, respectively. These results allow considering them as promissory for field evaluation.

Key words: potato, late blight, aromatic species, Lamiaceae

Introducción

La papa es el cuarto cultivo más importante en producción a nivel mundial después del maíz, el trigo y el arroz (Faostat, 2008), y el tubérculo más relevante en los Andes colombianos (Cevipapa, 2004). Aproximadamente 134.812 ha se siembran con papa en Colombia (Faostat, 2008), distribuidas en 250 municipios entre 2.000 y 3.500 m de altitud, donde el cultivo es una fuente primordial de empleo, ya que ocupa cerca de 20 millones de jornales al año, y a

esta actividad se encuentran vinculadas de forma directa aproximadamente 90.000 familias (Villarreal, *et al.*, 2007).

P. infestans es el agente causal de la llamada “gota” o “tizón tardío” de la papa, considerada la enfermedad más importante a nivel mundial y el problema de mayor prioridad en América Latina de este cultivo (Núñez, 1999). Se registró inicialmente en Toluca (región central de México) afectando variedades silvestres de papa (Jaramillo *et al.*, 1997); en la actualidad, este patógeno se encuentra ampliamente

Fecha de recepción: 05 de octubre de 2009. Aceptado para publicación: 28 de julio de 2010

¹ Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

² Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia).

³ Autor de correspondencia. cenutzetl@unal.edu.co

difundido en todos los lugares del mundo donde se desarrolla el cultivo de la papa, así como en las zonas donde se produce tomate, especie en la que igualmente causa grandes pérdidas debido a la reducción en rendimientos y los altos costos de su manejo (Hooker, 1980). Los reportes indican que en Colombia fue observada por primera vez alrededor de 1762 -1767 (Jaramillo *et al.*, 1997), y está presente en todas las regiones productoras de papa, debido a que el desarrollo del patógeno se ve favorecido por las condiciones climáticas presentes (García *et al.*, 2008). Su importancia se reconoce desde 1845, año en que causó la llamada “hambruna de Irlanda”, en la que ocasionó la pérdida de una considerable zona sembrada y miles de vidas humanas. Desde entonces su estudio ha sido prioridad para los científicos de diversas áreas a nivel mundial (Jaramillo *et al.*, 1997; Agrios, 2005).

Los síntomas iniciales de la enfermedad son pequeñas manchas húmedas de color verde oscuro, de forma irregular en los bordes de las hojas inferiores; posteriormente la mancha se torna de color pardo. En condiciones de humedad se forma un mildew veloso conformado por esporangios y esporangióforos en el borde de las lesiones, generalmente en el envés de las hojas (Agrios, 2005). Cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado puede producir la destrucción o quemazón total del follaje y la pudrición seca de los tubérculos (Estrada, 2000).

La prevención y el manejo de esta enfermedad ha sido una gran preocupación en diferentes áreas a nivel mundial (Jaramillo, 2003). En la actualidad se ha logrado avanzar en el conocimiento del patógeno y en la búsqueda de resistencia de la planta de papa a través del mejoramiento genético, mediante el desarrollo de variedades resistentes y tolerantes; tal es el caso de las variedades Pastusa Suprema, Punto Azul y Roja Nariño (Ñústez, 2010), pero aun así su control efectivo se basa en el uso de fungicidas de síntesis química (Jaramillo *et al.*, 1997). Hoy en día el control de esta enfermedad es esencialmente químico, representa en variedades susceptibles entre el 7 y 10% de los costos totales de producción, dependiendo de la región. (Villarreal *et al.*, 2007). Con el propósito de minimizar las pérdidas por causa de esta enfermedad generalmente se hace un uso indiscriminado de los fungicidas, incrementando así los costos tanto económicos como ambientales y la probabilidad de generar resistencias en el patógeno (Jaramillo, 2003). En Colombia, “actualmente, las principales zonas productoras de papa en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Nariño se superponen de manera significativa sobre las áreas de localización de ecosistemas de Páramo, ya que en ellos se encuentra el 40% de los ecosistemas de Páramo del país”. Esta situación es importante si se tiene en cuenta la

funcionalidad ecológica que estos prestan en la oferta del recurso hídrico, además de la conservación de flora y fauna endémicas y otros servicios ambientales (Fedepapa, 2004).

Una alternativa para el control de enfermedades y plagas en los cultivos es el uso de productos vegetales. Extractos vegetales fermentados de ajo (*Allium sativum*) y ajeno (*Artemisia absinthium*) fueron reportados con efecto de reducción en la severidad de *P. infestans* en papa criolla (*Solanum phureja*) (Granada, 2002), al igual que el extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens*) con efecto de reducción entre el 70 y 94% en el crecimiento micelial de *P. infestans* y *Sclerotium rolfsii* (Zapata *et al.*, 2003). En estudios *in vitro* donde se evalúa el efecto de aceites esenciales sobre patógenos se han reportado resultados favorables en varios casos: *Colletotrichum gloeosporioides* con 15 aceites esenciales con dosis de hasta 2,0 mg mL⁻¹. Adicionalmente, el aceite de *Cymbopogon citratus* evidenció resultados positivos en poscosecha sobre la pudrición del maracayá causada por este mismo patógeno (Duarte *et al.*, 2010); inhibición del crecimiento de *P. infestans* con aceite de *O. vulgare* (Olanya y Larkin, 2004); inhibición sobre la producción de aflatoxina por *Aspergillus flavus* en Nuez Pecanera con aceite de *O. vulgare* (García *et al.*, 2006); inhibición completa sobre el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* con aceites de *O. vulgare* y *M. piperita* (Basílico y Basílico, 1999); actividad fungistática sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* con aceite de *T. vulgaris* (Bhaskara *et al.*, 1998); alta eficiencia del aceite de *T. vulgaris* como fungicida de contacto y en fase gaseosa sobre diferentes especies de hongos de importancia económica (Alefyah y Hall, 1997); fuerte efecto antibacteriano de timol y carvacrol, principales compuestos del aceite de *T. vulgaris*, contra *Erwinia amylovora* (Karami *et al.*, 2010).

Entre los objetivos del presente trabajo estaban: determinar la metodología más apropiada para evaluar el efecto de aceites esenciales sobre *P. infestans in vitro*; evaluar el efecto de los aceites esenciales comerciales de las especies *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* y *Pogostemon cablin* sobre *P. infestans*, en condiciones de laboratorio, e identificar los aceites con mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans in vitro*.

Materiales y métodos

Las evaluaciones se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Inóculo

Como inóculo se utilizaron dos aislamientos de la colección de *P. infestans* del Programa de Investigación en Papa de la Universidad Nacional: el A13, colectado en el municipio de La Calera en la variedad Parda Pastusa, y el A15, colectado en el municipio de Villapinzón en la variedad Esmeralda, elegidos por su alta virulencia y sus características de crecimiento. Estos aislamientos son preservados y propagados en medio de cultivo agar-arveja, y periódicamente se hacen réplicas sobre rodajas de tubérculos de la variedad Tuquerreña (*S. tuberosum*) con el objetivo de activar su patogenicidad. Se utilizó una rodaja de 5 mm de diámetro con micelio de un cultivo de *P. infestans* de 15 d de crecimiento.

Aceites esenciales

Se usaron los aceites esenciales comerciales de las especies *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* (Green Andina Ltda., Bogota); *Pogostemon cablin* (Laboratorios All care Ltda., Bogota) y *Salvia officinalis* (Esenciales de Colombia, Bogota). Adicionalmente se realizó la extracción del aceite de la especie *Origanum majorana* en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Colombia por el método de destilación por arrastre con vapor de agua.

La variable evaluada durante todo el ensayo fue el área de crecimiento del patógeno. Para ello se hizo captura de imágenes mediante registro fotográfico y posterior lectura en el *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD), el cual permite obtener este dato en dimensiones de área (cm²). Con el fin de mejorar la predictibilidad del modelo y cumplir los supuestos del modelo lineal mixto utilizado, se realizó una transformación de logaritmo a los datos de área de crecimiento de *P. infestans* (West *et al.*, 2007); con ella se realizó un análisis estadístico de medidas repetidas. La estructura de varianzas y covarianzas que mejor ajustó fue la autorregresiva heterogénea de primer

orden según el criterio Akaike. Los análisis estadísticos se hicieron en el software SAS® V9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Evaluación de la metodología de aplicación de los aceites esenciales

Se evaluaron diferentes metodologías de aplicación del aceite en la unidad experimental (UE), que constó de una caja de petri con medio de cultivo agar-arveja, con el inóculo dispuesto en diferentes ubicaciones y aplicando únicamente aceite (se usó *M. piperita*), con el propósito de establecer cuál metodología permitía una evaluación adecuada del efecto inhibitorio del aceite sobre el crecimiento del patógeno. En la Tab. 1, las metodologías M1, M2 y M3 hacen posible la actividad de contacto, mientras las metodologías M4 y M5 permiten la actividad volátil del aceite; sin embargo se utilizó la misma dosis del aceite indistintamente (4 µL/UE) (Quintanilla *et al.*, 2002), a excepción de M1 con 2 µL/UE. Los tratamientos C1 y C2 corresponden a los controles.

En todos los casos, el inóculo de *P. infestans* se colocó mediante una rodaja de 5 mm de diámetro de micelio en crecimiento sobre el medio de cultivo ubicándolo en el centro de la caja de petri, a excepción de M4, el cual se ubicó en un extremo de la caja sobre el medio de cultivo.

Los tratamientos se evaluaron según un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. Para garantizar el adecuado desarrollo del patógeno, las cajas petri se mantuvieron en cámara de crecimiento a temperatura constante de 18°C sin fotoperiodo. Se realizaron observaciones de evaluación durante los días 5, 8, 12, 15 y 22 después de inoculación (Quintanilla *et al.* 2002).

Evaluación del efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *P. infestans*

La evaluación se desarrolló en condiciones similares a las anteriores, empleando las metodologías que ejercen actividad

TABLA 1. Descripción de las metodologías evaluadas para aplicación del aceite esencial en la unidad experimental (UE).

Metodología	Características	Dosis aceite/UE
M1	Incorporación del aceite al medio de cultivo agar-arveja disuelto en etanol 1:1	2 µL/UE (0,1 µL de mezcla/mL de medio)
M2	Igual a M1 (pero dosis diferente)	4 µL/UE (0,2 µL de mezcla/mL de medio)
M3	Aplicación del aceite puro disperso en la superficie del medio	4 µL/UE
M4	Disco de papel filtro de 5 mm de diámetro localizado en un extremo de la caja de petri sobre el medio de cultivo, en el cual se aplicó el aceite puro (efecto volátil)	4 µL/UE
M5	Disco de papel filtro de 5 mm de diámetro localizado en la tapa de la caja de petri en el cual se aplicó el aceite puro (efecto volátil)	4 µL/UE
C1	Incorporación de etanol agua 1:1 al medio de cultivo (control para M1 y M2)	4 µL/UE (0,2 µL de mezcla/mL de medio)
C2	Aplicación de agua destilada estéril sobre disco de papel en la tapa (control absoluto)	4 µL/UE

volátil (M4 y M5), en dosis de 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$, que permiten mejor visualización del efecto inhibitorio del aceite. Para estas metodologías se aplicaron los aceites puros de cada una de las especies sobre un disco de papel filtro, como lo reporta Quintanilla *et al.* (2002). Se evaluó el efecto inhibitorio de los ocho aceites descritos anteriormente sobre el crecimiento de *P. infestans*, estimando la variable de crecimiento como se indicó anteriormente.

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial ($8 \times 2 \times 2$) en donde el primer factor corresponde a aceites esenciales (8), el segundo a metodología de aplicación del aceite (2) y el tercero a los aislamientos de *P. infestans* (2). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y se ubicaron diez controles para cada metodología con agua destilada estéril, para un total de 180 unidades experimentales. Se hicieron observaciones de evaluación del crecimiento del patógeno a los 3, 6, 9, 12, 15 y 19 d después de la inoculación. La variable evaluada fue el área de crecimiento del patógeno, y tanto su determinación como su análisis fueron similares a los descritos anteriormente.

Resultados y discusión

Metodología de aplicación del aceite

Las metodologías que evaluaron la actividad de contacto del aceite (M1 y M2) no presentaron diferencias significativas en el crecimiento del patógeno en ninguno de los días de evaluación con respecto al control, de tal forma que para

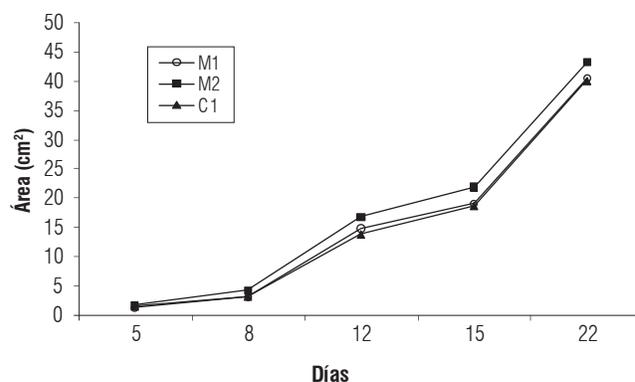


FIGURA 1. Crecimiento *in vitro* de *P. infestans* adicionando aceite de *M. piperita* al medio. M1, 2 $\mu\text{L}/\text{UE}$; M2, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$; C1, testigo.

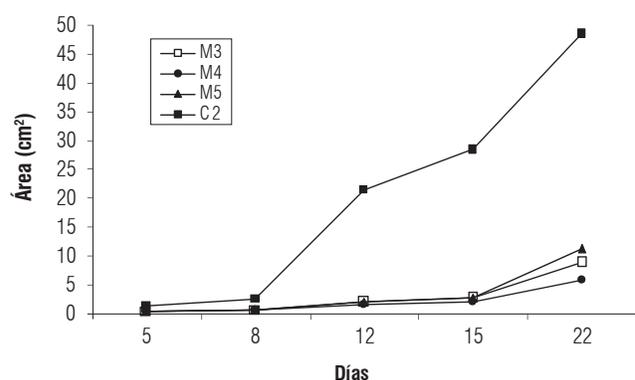


FIGURA 2. Crecimiento *in vitro* de *P. infestans* aplicando de forma volátil aceite de *M. piperita*. M3, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre el medio; M4, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre papel filtro en el medio; M5, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre papel filtro en la tapa de la caja de petri; C2, testigo.

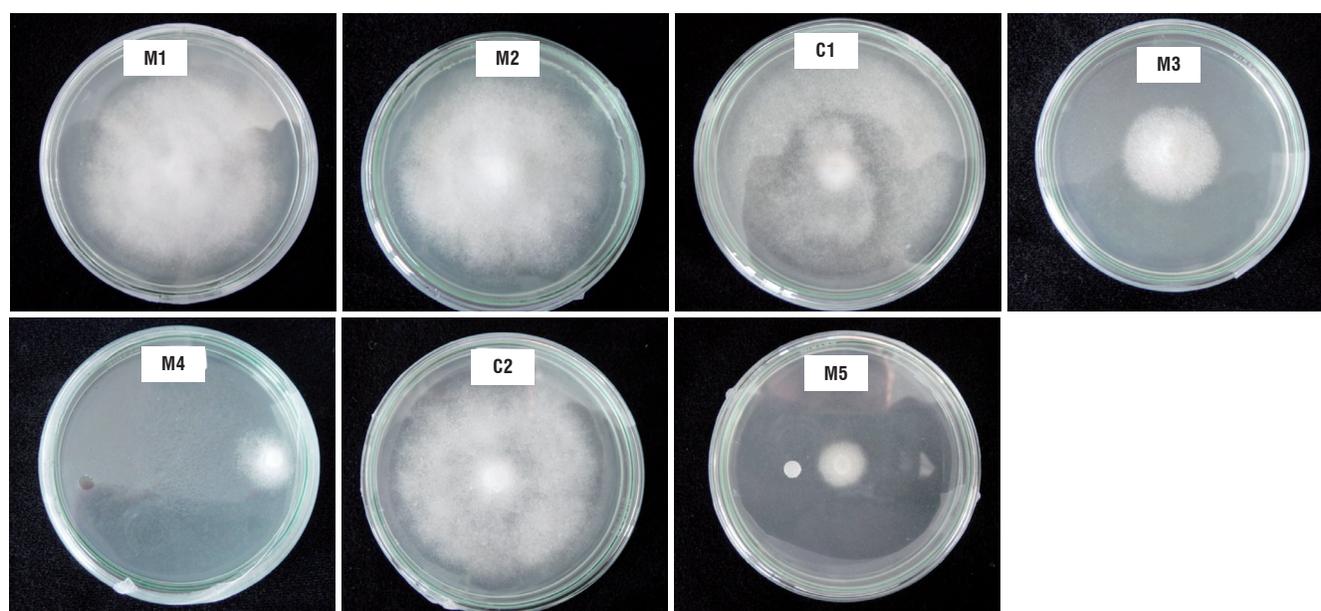


FIGURA 3. Crecimiento *in vitro* de *P. infestans* por diferentes vías de aplicación. M1, 2 $\mu\text{L}/\text{UE}$ al medio; M2, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ al medio; C1, testigo al medio; M3, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre superficie del medio; M4, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre papel filtro en el medio; M5, 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$ sobre papel filtro en la tapa de la caja de petri; C2, testigo de papel filtro.

el último día de evaluación expusieron áreas de 40,3 y 43,1 cm², respectivamente, y ligeramente superiores a su correspondiente control C1 (40,0 cm²) (Figs. 1 y 3). En las metodologías que evaluaron la actividad volátil del aceite, M3, M4 y M5, todos los días de evaluación presentaron menores áreas de crecimiento de *P. infestans* respecto a su tratamiento control C2, pero sólo a partir del día 12 de la evaluación, su efecto sobre el crecimiento fue claro, mostrando diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de estas tres metodologías con el control, lo cual se confirmó el último día de evaluación (22) cuando se observó una diferencia significativa de M3, M4 y M5 (8,8; 5,8 y 11,2 cm², respectivamente) en relación con el control C2 (48,5 cm²) (Figs. 2 y 3).

Las metodologías que evaluaron fase volátil del aceite (M3, M4 y M5) mostraron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans* que las metodologías que evaluaron fase de contacto (M1 y M2), lo que concuerda con lo reportado por Soyly *et al.* (2006), quienes afirman que la fase volátil es consistentemente más efectiva, y sugieren que este es un efecto directo de los vapores del aceite esencial sobre el micelio del patógeno debido a su naturaleza lipofílica, que les permite ser absorbidos por el micelio causando alteraciones morfológicas en las hifas, como marchitamientos, coagulación citoplásmica, vacuolizaciones y fugas del protoplasto.

M4 y M5 (efecto volátil), reportados previamente por Quintanilla *et al.* (2002), fueron las que en este trabajo presentaron mayor reducción en el crecimiento del patógeno, y permitieron observar con mayor claridad el efecto de los aceites sobre el crecimiento de *P. infestans*, además de que fueron más prácticas a la hora de la aplicación; por tal razón, estas fueron las seleccionadas para realizar las evaluaciones posteriores.

Evaluación de los aceites esenciales

Para el primer factor de evaluación (aceites), se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) presentando todos los aceites áreas de crecimiento micelial (promedio de las cinco repeticiones) inferiores al control (Tab. 2). A excepción del aceite de *M. piperita* que ejerce efecto desde los primeros días de evaluación, los restantes aceites esenciales evidencian su efecto sobre el crecimiento de *P. infestans* alrededor del día 9 después de la inoculación.

Hacia el día 19 se observó claramente el efecto de todos los aceites sobre el crecimiento, destacándose los de *M. piperita* y *T. vulgaris* (Tab. 3 y Fig. 4). Este resultado coincide con lo reportado por Duarte *et al.* (2010) donde aceites de *M. piperita* y *T. vulgaris* en dosis de 2,0 mg mL⁻¹ evidenciaron

TABLA 2. Crecimiento *in vitro* de *P. infestans* bajo ocho aceites esenciales.

Aceite esencial	Área (cm ²)
Control	16,63 a
<i>P. cablin</i>	12,69 ab
<i>R. officinalis</i>	13,23 b
<i>S. officinalis</i>	10,59 bc
<i>O. majorana</i>	10,01 bcd
<i>O. vulgare</i>	8,52 cde
<i>O. basilicum</i>	6,83 e
<i>T. vulgaris</i>	4,97 f
<i>M. piperita</i>	2,22 g

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$), error estándar 0,09.

TABLA 3. Crecimiento de *P. infestans* para el último día de evaluación (19), bajo el efecto de aceites esenciales.

Aceite	Área (cm ²)
Control	38,74 a
<i>R. officinalis</i>	32,95 ab
<i>P. cablin</i>	29,17 abc
<i>S. officinalis</i>	26,65 abcd
<i>O. majorana</i>	25,04 abcde
<i>O. vulgare</i>	20,86 bcdef
<i>O. basilicum</i>	17,30 cdef
<i>T. vulgaris</i>	10,68 g
<i>M. piperita</i>	6,67 g

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$), error estándar 0,09.

una fuerte actividad *in vitro* frente a *C. gloeosporioides*, y en el caso de *M. piperita* con Basílico y Basílico (1999), quienes reportaron que en concentración de 1,0 mg mL⁻¹, mostró su efecto inhibitorio sobre *Aspergillus ochraceus* desde el inicio del ensayo. Al analizar los resultados en el último día de evaluación (día 19, en el cual el control alcanzó el área total de la unidad experimental), se observó que los aceites de *T. vulgaris* y *M. piperita*, que fueron iguales entre sí, presentaron un área de crecimiento significativamente inferior con respecto a los demás aceites evaluados y al control, con una reducción entre 89 y 92% del crecimiento del control; coincide con el reporte de Alefyah y Hall (1997) y Bhaskara *et al.* (1998), quienes encontraron que el aceite de *T. vulgaris* tiene actividad fungistática sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en fase de contacto y gaseosa, y se confirma

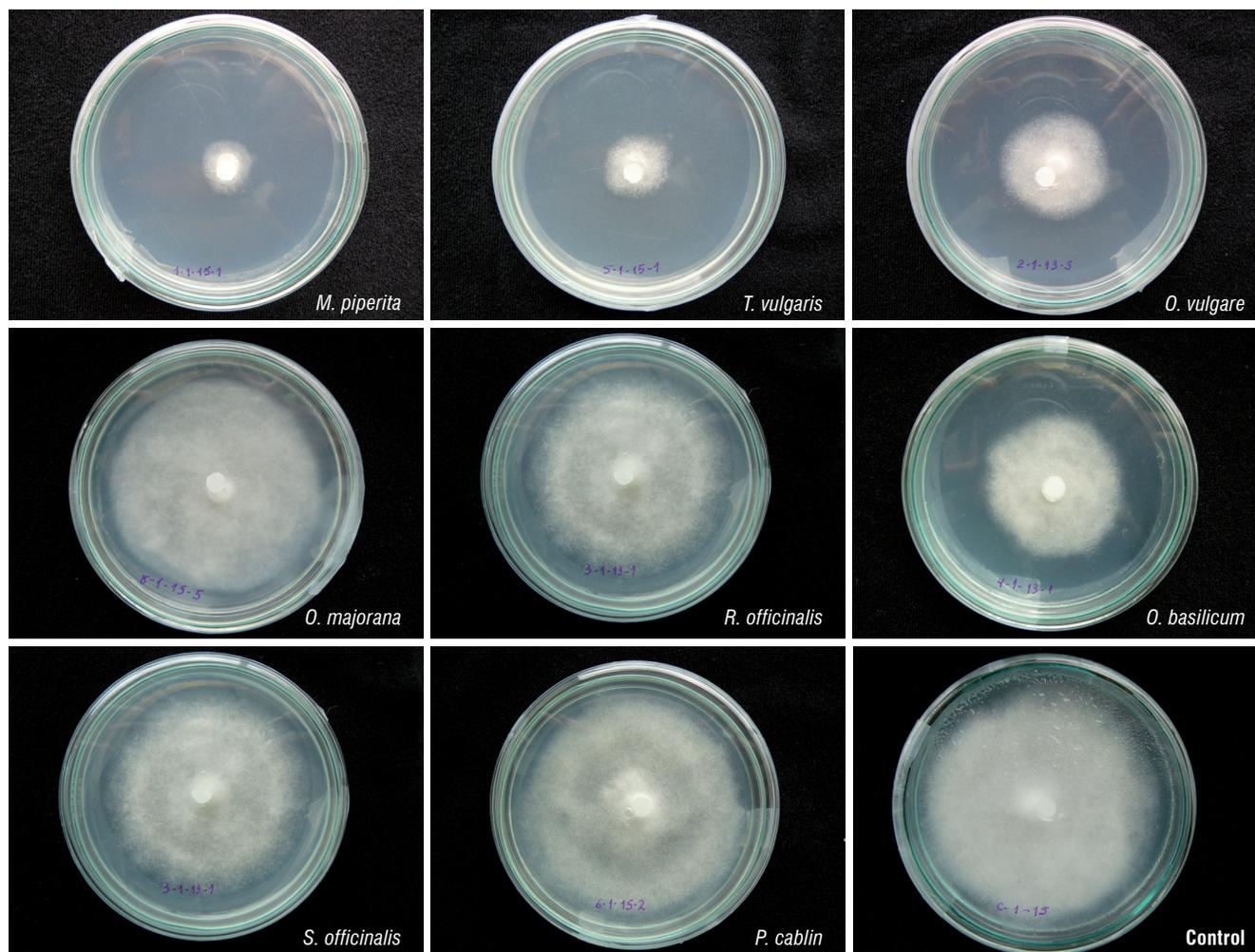


FIGURA 4. Crecimiento de *P. infestans* para el último día de evaluación (19), bajo el efecto de aceites esenciales.

lo reportado por Quintanilla *et al.* (2002), quienes hallaron que los aceites de *T. vulgaris* y *M. piperita* en evaluación *in vitro*, en fase gaseosa inhibieron significativamente el crecimiento de *P. infestans* entre 63 y 89%. Otros autores (Alefyah y Hall, 1997; Bhaskara *et al.* 1998) determinaron que el aceite de *T. vulgaris* en concentraciones de 20 a 50 mg kg⁻¹ tiene actividad fungistática sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en fase de contacto y gaseosa.

Los aceites de *O. basilicum* y *O. vulgare*, aunque en menor medida, presentan también un efecto inhibitorio importante, lo que concuerda con el reporte de inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. infestans* con aceite de *O. vulgare* (Olanya y Larkin 2004), pero difiere de lo reportado por Soyly *et al.* (2006), quienes encontraron inhibición completa del crecimiento de *P. infestans* con aceite de *O. vulgare*. Los aceites de *P. cablin*, *S. officinalis* y *O. majorana*, aunque manifiestan reducción del crecimiento, no son estadísticamente significativos como inhibidores de

P. infestans, contrastante con lo reportado por Gamboa *et al.* (2002), quienes afirman que el extracto de *O. majorana* en dosis desde 8,0 mg mL⁻¹ presenta efecto fungicida sobre *P. infestans*.

Teniendo en cuenta el segundo factor de evaluación (localización del aceite), según el análisis estadístico se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre las dos metodologías empleadas, mostrando mayor efecto en la reducción del crecimiento micelial la metodología M5 (papel en tapa) con 9,47 cm², mientras M4 (papel en medio) presentó 9,56 cm² durante el periodo completo de evaluación. Aunque las dos metodologías generan efecto volátil, la respuesta encontrada se podría explicar por la distancia que hubo entre la fuente del aceite esencial y el inóculo del patógeno dentro de la unidad experimental, ya que mientras en M4 la distancia entre los dos es de aproximadamente 5 cm, en M5 la distancia entre estos es de aproximadamente 0,5 cm; por tanto, los vapores del aceite pueden ejercer un efecto

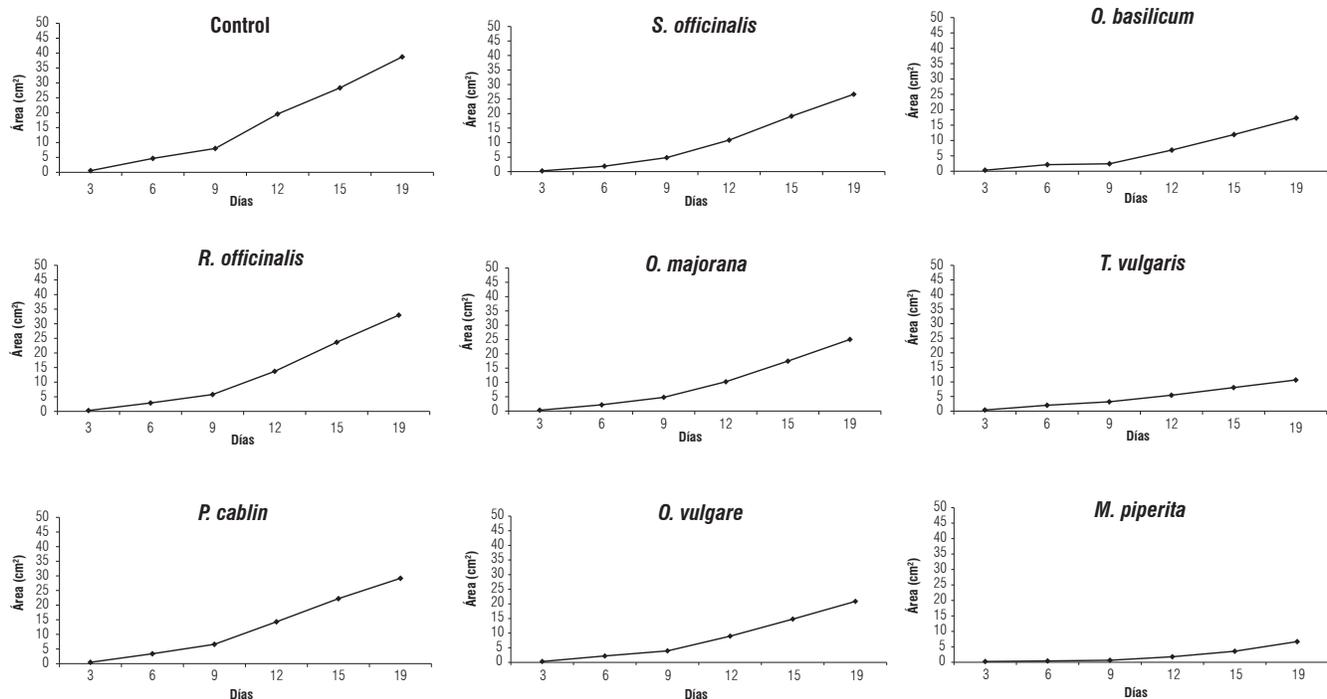


FIGURA 5. Crecimiento *in vitro* de *P. infestans* bajo ocho aceites esenciales.

más directo sobre el inóculo, especialmente en la fase inicial de crecimiento.

Para el tercer factor de evaluación (aislamiento) se halló diferencia significativa entre ellos, mostrando mayor área de crecimiento el aislamiento A15 sobre el aislamiento A13, debido posiblemente a la diferencia de origen, lo cual repercute en su comportamiento. Este resultado demuestra la importancia que tiene el aislamiento sobre los resultados de evaluación en este tipo de investigaciones.

A pesar del efecto de los aceites esenciales, se encontró que el crecimiento fue constante a lo largo del periodo de evaluación ($P \leq 0,05$). De los resultados obtenidos en los diferentes días de evaluación (Fig. 5), se observó que con dos o tres evaluaciones en el tiempo es suficiente para analizar las diferencias en el crecimiento: la primera hacia el día 5, cuando generalmente no se observan diferencias para identificar un punto de inicio; la segunda hacia el día 12, momento en el cual se pueden empezar a observar las diferencias en el crecimiento, y la tercera hacia el día 19, cuando el patógeno en condiciones normales (control) ha alcanzado el área total de la UE y se pueden observar con claridad las diferencias expresadas.

En adición a las respuestas significativas de los factores evaluados, se observaron interacciones significativas para: aceite*localización, aceite*días, localización*días,

aislamiento*días, aceite*localización*días, aceite*aislamiento*días, localización*aislamiento*días, las cuales se explican por lo analizado en el caso de los factores individuales. Estas interacciones demuestran que las respuestas de crecimiento de *P. infestans* dependieron del aceite, de la localización del mismo y del día de evaluación.

Las observaciones realizadas revelan que los aceites esenciales evaluados muestran un efecto sobre el crecimiento de *P. infestans*, tanto a nivel de área como de volumen (datos no presentados) (Fig. 6). El carvacrol y el timol son compuestos de unidades terpénicas presentes en los aceites esenciales de algunas especies de la familia Lamiaceae como el *O. vulgare*, el *T. vulgaris* y la *M. piperita*, de los cuales se ha encontrado que actúan causando alteraciones en la morfología y agregados hifales, lo que hace que se reduzca el crecimiento y se produzca lisis entre la pared y la membrana celular del agente patógeno (Kordal *et al.*, 2008), congruente con lo reportado por Vaillant *et al.* (2009), quienes encontraron que timol, mentol y citronelal (monoterpenos presentes comúnmente en aceites esenciales) inhibieron en un 100% el desarrollo de *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro*. Para futuras investigaciones se recomienda evaluar estas variables, así como la esporulación en cada uno de los tratamientos para establecer las causas del menor desarrollo del patógeno.

Los resultados permiten recomendar la evaluación de los aceites esenciales de *M. piperita* y *T. vulgaris* en condiciones

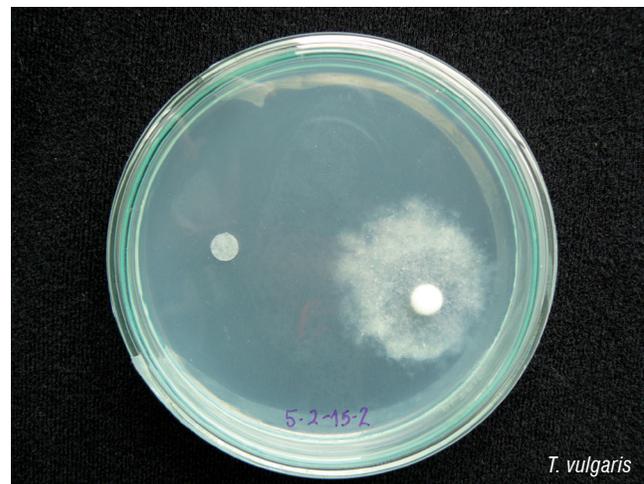


FIGURA 6. Crecimiento de *P. infestans* bajo efecto de aceite esencial de *T. vulgaris*.

controladas *in vivo*, con el fin de profundizar en su estudio y determinar la aplicabilidad, seguridad y posible fitotoxicidad que puedan presentar sobre plantas vivas.

Conclusiones

La metodología más adecuada para evaluación del efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre el crecimiento de *P. infestans* fue la que ejerció efecto volátil sobre el patógeno (aceite puro sobre papel filtro en la tapa de caja de petri) en dosis de 4 $\mu\text{L}/\text{UE}$; adicionalmente esta metodología facilita el montaje de experimentos de este tipo.

Los aceites esenciales de las especies *M. piperita* y *T. vulgaris* mostraron poseer un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans* en condiciones *in vitro*.

La respuesta de *P. infestans* a los ocho aceites esenciales presentó diferencias en los dos aislamientos utilizados debido a que su comportamiento puede variar dependiendo del origen de cada uno de estos; por tanto se resalta la necesidad de evaluar varios de ellos, en investigaciones de este tipo.

Para analizar el efecto de aceites esenciales sobre el crecimiento de *P. infestans* es suficiente realizar dos o tres evaluaciones en el tiempo: la primera hacia el día 5 luego de inoculación, la segunda hacia el día 12 luego de inoculación, y la tercera hacia el día 19 luego de inoculación, cuando el patógeno en general alcanza el área total de la unidad experimental.

Recomendaciones

Se resalta la importancia de la evaluación de los aceites de *M. piperita* y *T. vulgaris* en condiciones controladas *in vivo*

para contrastar su eficacia como estrategia alternativa en el manejo integrado de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural a través del proyecto "Identificación del potencial de aceites esenciales de especies aromáticas de las familias Verbenaceae y Labiatae en el manejo integrado de *P. infestans* y *Tecia solanivora*, en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L)". Contrato MADR 2007V7163-59-597/2007.

Literatura citada

- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, London.
- Alefyah, A. y A. Hall. 1997. The fungicidal properties of plant extracts and essential oils (en línea). En: Abstract, Plant Pathology - Global. Perspectives of an applied science. The British Society for Plant Pathology (BSPP), <http://www.bspp.org.uk/archives/bspp1997/bspp97session9.php>; consulta: agosto de 2010.
- Basilico, M. y J. Basilico. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. Lett. Appl. Microbiol. 29(4), 238-241.
- Bhaskara, M., P. Angers, A. Gosselin y J. Arul. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochem. 47(8), 1515-1520.
- Cevipapa. 2004. El cultivo de la papa en Colombia. En: www.cevipapa.org.co/cultivo/colombia.php; consulta: agosto de 2010.
- Duarte, A.N., F.L. Schmidt, M.C. Teixeira D., G.M. Figueira, C. Delarmelina, E.A. Benato y A. Sartoratto. 2010. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citrates* essential oil. Braz. J. Microbiol. 41, 66-73.

- Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Fundación Promoción e Investigación de los Productos Andinos (Proinpa); Centro Internacional de la Papa (CIP); Centro de Información para el Desarrollo (CID), La Paz.
- Faostat. 2008. Estadísticas de producción de cultivos. En: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, <http://faostat.fao.org>; consulta: agosto de 2010.
- Fedepapa, Federación Nacional de Productores de Papa. 2004. Guía ambiental para el cultivo de la papa. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá.
- Gamboa, R., F.D. Hernández, D.E. Guerrero, A. Sánchez y R.H. Lira. 2002. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana*) y Trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. Rev. Mex. Fitopatol. 21(1), 13-18.
- García, E., Y. Quezada, J. Moreno, G. Sánchez, E. Moreno y C. Pérez. 2006. Antifungal activity of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) and oregano (*Origanum vulgare* L.), and their effects on aflatoxin concentration in pecan nut [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]. Rev. Mex. Fitopatol. 24(1), 8-12.
- García, H., M. Marín, S. Jaramillo y M. Cotes. 2008. Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas sistémicos. Agron. Colomb. 27(1) 47-57.
- Granada, N. 2002. Efecto de once extractos vegetales sobre el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en papa (*Solanum phureja* Juz et. Buk). Rev. Agron. 10(1-2), 21-30.
- Hooker, W. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de Papa (CIP), Lima.
- Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Monografía. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Jaramillo, S., L. Patiño, B. Buritica, M. Márquez, L. Zapata y J. Morales. 1997. Historia y origen del patosistema *Phytophthora infestans* / *Solanum*, una revisión. pp. 1-19. Memorias IV Foro de Sanidad Vegetal y I Seminario Nacional de Gota de la Papa. Grupo de Sanidad Vegetal; Grupo de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Karami, R., M. Khodaverdi y F. Ali. 2010. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. J. Agr. Sci. Tech. 12, 35-45.
- Kordal, S., A. Cakir, H. Ozer, R. Cakmakci, M. Kesdek y E. Mete. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. Bioresour. Technol. 99(18), 87-95.
- Ñústez L., C.E. 1999. The current status of late blight in America Latina. Late Blight: a threat to global food security. pp. 29-33. En: Proceedings of the Global Initiative on Late Blight Conference. Vol. 1. CIP, Quito.
- Ñústez, C.E. 2010. Catálogo de variedades colombianas de papa. En: Grupo de Investigación en Papa, <http://www.papaunc.com/catalogo.shtml>; consulta: agosto de 2010.
- Olanya, O.M. y R.P. Larkin. 2004. Suppression of *Phytophthora infestans* by essential oils and natural products in lab assays and growth chamber studies. p. 29. En: Abstract, Northeast Potato Technology Forum. Charlottetown, Canadá.
- Quintanilla, P., J. Rohloff y T. Iversen. 2002. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. Potato Res. 45(2-4), 225-235.
- Soylu, E.M., S. Soylu y S. Kurt. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathol. 161(2), 119-128.
- Vaillant, D., C. Romeu, E. Ramos, M. González, R. Ramírez y J. González. 2009. Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad 13(3), 197-201.
- Villarreal, H., P. Porras, A. Santa, J. Lagoeyte y D. Muñoz. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. En: Fedepapa, <http://www.fedepapa.org.co/files/estadistica/estudio.pdf>; consulta: agosto de 2010.
- West, B.T., K.B. Welsh y A.T. Galecky. 2007. Linear mixed models. A practical guide using statistical software. Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Zapata, R., M.E. Sanabria y D. Rodríguez. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaría (*Cereus deficiens* Otto & Diert). INCI 28(5), 302-307.

