

## Efectos de aceites esenciales sobre la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* L. e inhibición de *Alternaria* spp.

### Effects of essential oils on *Solanum lycopersicum* L. seed germination and inhibition of *Alternaria* spp.

Córdoba, Vanesa; Viotti, Gloria; Oliva, María de las Mercedes

 **Vanesa Córdoba** labsanbau@gmail.com  
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina  
**Gloria Viotti**  
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina  
**María de las Mercedes Oliva**  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

**Ab intus FAV-UNRC**  
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina  
ISSN-e: 2618-2734  
Periodicidad: Semestral  
vol. 6, núm. 12, 2023  
abintus@ayv.unrc.edu.ar

Recepción: 06 Septiembre 2023  
Aprobación: 02 Noviembre 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/820/8204548005/>

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10246130>

**Financiamiento**  
Fuente: SeCyT-UNRC (Secretaría de Ciencia y Técnica-Universidad Nacional de Río Cuarto-PPI 2020-2022)  
Fuente: CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Res IF-2021-85081432-APN-DGP#CONICET).

**Resumen:** El Tizón temprano que afecta severamente al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es causado por varias especies de *Alternaria* spp. En este último tiempo se ha impulsado el estudio de alternativas naturales, como los aceites esenciales, para minimizar los efectos negativos de los principios activos de los fungicidas de síntesis. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) sobre la germinación de semillas de tomate y la inhibición en el crecimiento de *Alternaria* spp. para su uso alternativo como control del Tizón temprano. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los aceites esenciales sobre una cepa de *Alternaria* spp. aislada de un fruto de tomate con síntomas y se evaluó el Vigor y Poder Germinativo de esta concentración sobre semillas de tomate, con el fin de determinar fitotoxicidad. Se obtuvieron valores de CIM iguales a 1,2 mg ml<sup>-1</sup> y 0,2820 mg ml<sup>-1</sup> para los aceites esenciales de orégano y tomillo respectivamente. Se observó que las CIM de ambos aceites no produjeron efectos fitotóxicos sobre las semillas, obteniendo valores de Vigor y de Poder Germinativo similares al control. Estos resultados demuestran la falta de toxicidad y la efectividad antifúngica sobre *Alternaria* spp. de los aceites esenciales probados, por lo que ambos constituyen una nueva alternativa natural para la aplicación sobre semillas de tomate para control del Tizón temprano.

**Palabras clave:** Tizón Temprano, *Alternaria* spp., aceites esenciales, Concentración Inhibitoria Mínima, fitotoxicidad.

**Abstract:** Early Blight severely affects tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops and is caused by various species of *Alternaria* spp. In recent times, the study of natural alternatives has been promoted, such as essential oils to minimize the negative effects of the active principles of synthetic fungicides. The objective was to evaluate the effect of essential oils of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) on the germination of tomato seeds and the growth inhibition of *Alternaria* spp. for its alternative use as Early Blight control. It was evaluated the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the essential oils on a strain of *Alternaria* spp. isolated from a tomato fruit with symptoms; and Vigor and Germination Power on tomato seeds in order to determine phytotoxicity. MIC values of 1,2 mg ml<sup>-1</sup>

and 0,2820 mg ml<sup>-1</sup> were obtained for the essential oils of oregano and thyme respectively. The MIC of both oils was observed that did not produce phytotoxic effects on the seeds, and Vigor and Germination Power was similar to the control. These results demonstrate the lack of toxicity and the antifungal effectiveness on *Alternaria* spp. of the essential oils tested, so both constitute a new natural alternative for application on tomato seeds to control Early Blight.

**Keywords:** Early Blight, *Alternaria* spp., essential oils, Minimum Inhibitory Concentration, phytotoxicity.

## INTRODUCCIÓN

Un gran número de enfermedades infecciosas que afectan al cultivo de tomate (*S. lycopersicum* L.), son transmitidas por semillas y disminuyen considerablemente su productividad. Entre las más importantes se encuentra el Tizón temprano, causada por varias especies de *Alternaria* spp., incluida *Alternaria solani* Sorauer (Adhikari *et al.*, 2017; Simmons, 2000). Esta enfermedad es una de las más importantes a nivel mundial (Carreño *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2013) y afecta todos los órganos aéreos de la planta. En ataques severos puede producirse la defoliación total y disminuir el rendimiento entre el 50 y 80 % (Paz *et al.*, 2013). También puede causar el mal del tallo (damping-off o caída de almácigos) y necrosis en frutos que en su mayoría caen prematuramente y aquellos que alcanzan la madurez no son comercializables (Adhikari *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2013).

Para el control de este tipo de enfermedades generalmente se utilizan productos químicos sintéticos, los que presentan una toxicidad residual que causa contaminación (Perelló *et al.*, 2013). La resistencia a estos productos por parte de los microorganismos patógenos es otro factor importante que impulsa la necesidad de reducir la dependencia de estos fungicidas. Sólo en la última década, un gran número de estudios informaron la evolución de la resistencia de diversos hongos patógenos de plantas; en algunos casos, el mismo patógeno fúngico desarrolló resistencia a docenas de productos fungicidas (Miles *et al.*, 2013; Lamichhane *et al.*, 2015). Por estas razones, se reduce la disponibilidad de ingredientes activos con diferente modo de acción disponibles en la lucha contra los hongos fitopatógenos, dificultando el manejo agronómico de las enfermedades (Carmona y Sautua, 2017). Además, las enfermedades transmitidas por semillas pueden causar serios problemas en cultivos orgánicos porque se minimizan las posibilidades de usar productos químicos sintéticos (Dal Bello y Sisterna, 2010; Perelló *et al.*, 2013).

El desarrollo de alternativas efectivas para el manejo de enfermedades es esencial para lograr productividad, rentabilidad y minimizar los efectos negativos de los principios activos de síntesis en la biodiversidad de los agro ecosistemas. De acuerdo con las demandas de consumidores y productores, se están investigando métodos alternativos para el manejo de enfermedades fúngicas. Uno de estos enfoques ecológicamente viables para controlar estas enfermedades en las semillas es el uso de productos naturales, especialmente compuestos de origen vegetal, pues se demostró el efecto inhibitorio que ejercen sobre el desarrollo de hongos

fitopatógenos (Dal Bello y Sisterna, 2010; Duarte *et al.*, 2013; Konstantinović *et al.*, 2022; Raveau *et al.*, 2020).

Estos compuestos, han desempeñado un papel importante en la reducción de la incidencia de patógenos transmitidos por las semillas, en la mejora de la calidad de las mismas y la emergencia de plantas en el campo. Por su fuente rica de bioactivos, las plantas pueden proporcionar alternativas potenciales a los fungicidas sintéticos para el tratamiento de semillas (Dal Bello y Sisterna, 2010; El Rasheed y El Rasheed, 2017).

Además de la capacidad antimicrobiana de estos compuestos se destaca su carácter biodegradable, el bajo impacto en el ambiente debido a que sus residuos son fáciles de degradar y la mínima toxicidad que puede producir en la salud humana (Cuzco Bobadilla y Chico Ruíz, 2015).

Entre estos compuestos, se encuentran los aceites esenciales (AE). Estos se definen como mezclas complejas de fracciones volátiles y sustancias aromáticas líquidas, con más de cien compuestos químicos orgánicos provenientes de la familia de los terpenoides que forman parte del metabolismo secundario de las plantas, y se producen de manera natural para la defensa contra insectos y microorganismos (Costa Becheleni *et al.*, 2020).

Se ha investigado la actividad antifúngica de numerosos AE derivados de plantas, que muestran efecto satisfactorio contra los hongos fitopatógenos, que los hace candidatos para el desarrollo de nuevos agentes fungicidas (Arraiza *et al.*, 2018; Mine y Kose, 2015). Específicamente, se han probado algunos derivados de plantas medicinales contra *A. solani* que resultaron en la inhibición total del crecimiento micelial, la germinación de las esporas (Goussous *et al.*, 2010) y la reducción de los síntomas del Tizón temprano (Abiodun *et al.*, 2017).

Por otra parte, ciertas especies de plantas, como *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., pueden producir efectos alelopáticos, afectando la germinación, el vigor y la emergencia de las plántulas debido a la síntesis de metabolitos secundarios (Thiesen *et al.*, 2019). Por ello, resulta importante evaluar el efecto de los AE, sobre la germinación y el normal desarrollo de plántulas de la especie que se desea proteger.

El presente estudio tiene como propósito estudiar el efecto de AE sobre el crecimiento de *Alternaria* spp. aislada de tomates y de este modo contribuir en la búsqueda de productos naturales que puedan controlar enfermedades en los cultivos de hortalizas. En ese sentido, se tratará de demostrar que los AE de plantas aromáticas de orégano y tomillo pueden inhibir el crecimiento fúngico, sin alterar la germinación de las semillas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### *Materiales vegetales*

*Semillas de tomate.* Los ensayos de germinación, se realizaron a partir de semillas de tomate provistas por “Asociación Cooperadora EEA La Consulta-INTA”, de la localidad de La Consulta, Mendoza. Variedad Uco-19 INTA (Lote: 2021, cosecha: 2021).

*Especies vegetales aromáticas.* Por presentar actividad inhibitoria sobre cepas del género *Alternaria* (Feng y Zheng, 2007; Mine y Kose, 2015), se utilizó. *O.*

*vulgare* y *T. vulgaris*. El material vegetal fue provisto de cultivares ubicados en la localidad de Las Rosas, Córdoba.

#### *Obtención de aceites esenciales*

Los aceites AE se obtuvieron siguiendo el método de hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger y según el procesamiento descrito por, Carezzano *et al.* (2017) y Oliva *et al.* (2015). La identificación y cuantificación de las muestras oleosas fueron realizadas por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-MS). [RB1] [F2]

#### *Aislamiento e identificación de Alternaria spp.*

Se seleccionaron tomates con síntomas necróticos característicos del Tizón temprano. Se tomó una porción del borde de las lesiones y se la colocó en Agar Papa Glucosado (APG). Se incubó durante 7 días a  $24 \pm 2$  °C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se observó el crecimiento fúngico en las placas de Petri, y se llevó a cabo la identificación de conidios mediante microscopía óptica.

Para completar la identificación se tuvieron en cuenta las características macroscópicas y microscópicas de los crecimientos fúngicos como: color, elevación y forma de las colonias, tipo de micelio, y características morfológicas de conidióforos y conidios, propuestas por Barnett y Hunter (1998).

A partir de estos aislamientos, se obtuvieron cultivos puros mediante la transferencia de porciones de APG a nuevas placas, se incubó en las mismas condiciones antes descritas hasta observar abundante crecimiento y esporulación del hongo. De allí se obtuvieron cultivos monospóricos para los ensayos posteriores.

Se conservó los aislamientos en refrigeración a  $4 \pm 2$  °C y se mantuvieron mediante sucesivos repiques en medio APG.

#### *Determinación in vitro de la actividad antifúngica de aceites esenciales sobre Alternaria spp.*

Para conocer la eficacia inhibitoria de los AE sobre el crecimiento micelial de la cepa aislada de *Alternaria* spp., se determinó la CIM, para cada AE. La CIM se define como la mínima concentración de compuesto capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo (D'auria *et al.*, 2005; Djordjevic *et al.*, 2013).

Para esto, se siguió la técnica descrita por Sajid *et al.* (2020). Se preparó medio de cultivo APG y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 1 atm. Una vez templado a 45-50 °C, se agregó al medio diferentes volúmenes de AE puros, para alcanzar las concentraciones en estudio y se colocó de manera aséptica en placas de Petri. Luego, en el centro de la placa se depositó, una porción de 7 mm de diámetro de APG que contenía la cepa de *Alternaria* spp. crecida durante 7 días y como control, se utilizó APG libre de AE en el cual se sembró la cepa de la misma manera. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Se incubaron a  $24 \pm 2$  °C durante 7 días, con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Luego de este período, se midió el diámetro de crecimiento del hongo en los tratamientos.

En las placas en donde no se observó inhibición total del crecimiento, se determinó el Porcentaje de Concentración de Inhibición Mínima (% CIM) utilizando la siguiente fórmula (Achimón *et al.*, 2020; Díaz Dellavalle *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2013):

$$\% \text{ CIM} = (C - TC / C) * 100$$

donde C corresponde a “diámetro de control” y TC a “diámetro de tratamiento”.

Los resultados de % CIM, permitió tomar decisiones acerca de la concentración a emplear en los posteriores ensayos, para llegar a la CIM.

Se consideró que se alcanzó la CIM de los AE, cuando se observó inhibición total del crecimiento fúngico en la placa de Petri, mientras que en el control se desarrolló de manera normal. Como referencia inicial, se tomaron los datos publicados por Santamarina *et al.* (2015), quien describe una CIM de 0,3 mg ml<sup>-1</sup> del AE de *O. compactum* Bentham sobre una cepa de *A. alternata* (Fr.) Keissler y una CIM de 0,0094 mg ml<sup>-1</sup> del AE de *T. vulgaris*, sobre una cepa de *Alternaria spp.*

#### *Efecto de aceites esenciales de O. vulgare y T. vulgaris sobre la germinación de semillas de tomate*

##### *Acondicionamiento de las semillas y tratamientos.*

Para cada uno de los tratamientos, la siembra se realizó en arena como sustrato hidratada con agua destilada, contenida en bandejas plásticas con cierre hermético.

Se diluyó los AE puros en leche descremada al 5% hasta lograr la CIM y luego se aplicó sobre las semillas. Para la siembra de cada tratamiento, se colocaron las semillas en contacto con el AE diluido hasta alcanzar su CIM, se homogeneizó la mezcla e inmediatamente se sembraron.

Como control, se trataron las semillas solo con la leche descremada al 5%.

Se sembraron 4 repeticiones de 100 semillas por cada uno de los tratamientos.

La incubación se llevó a cabo en condiciones de temperatura y luz controladas (25°C y luz constante) en una cámara de germinación. Los días para el primer y segundo conteo se definió según lo establecido por el manual de International Rules for Seed Testing (ISTA) (ISTA, 2017) para la especie *S. lycopersicum*.

##### *Evaluación del Vigor y Poder Germinativo.*

En ambos casos, se determinó el porcentaje de plántulas normales, anormales y no germinadas. La clasificación se llevó a cabo según lo establecido en el ISTA Handbook on Seedling Evaluation (ISTA, 2018).

##### *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados mediante sistema estadístico ANOVA, utilizando el programa InfoStat (InfoStat versión 2018, Di Rienzo *et al.*, 2018). Se determinó un valor de  $p > 0,05$  para mostrar diferencias no significativas entre los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aislamiento e identificación de Alternaria spp.-*

Se aisló una cepa de *Alternaria* spp. a partir de frutos de tomate con síntomas necróticos y abundante crecimiento fúngico, sobre esta cepa nombrada como cepa “E”, se aplicaron las pruebas de eficacia de inhibición de los AE.

### *Determinación in vitro de la actividad antifúngica de aceites esenciales sobre Alternaria spp.*

En las Tablas 1 y 2 se detallan % CIM de los tratamientos, por concentración de AE y halo de crecimiento radial, hasta llegar a la CIM (resaltado).

**Tabla 1**

Diámetro de crecimiento de *Alternaria* spp y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.).

Aceite esencial de orégano (mg ml <sup>-1</sup> )	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
Control sin aceite esencial	7,2	-
0,3	2,8	43,1
0,6	3,6	50,0
0,9	1,3	82,0
1,2	s/c	100,0
1,5	s/c	100,0

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

A partir de la concentración de 1,2 mg ml<sup>-1</sup> de AE de orégano, se obtuvo un efecto de inhibición total del crecimiento de la cepa E de *Alternaria* spp. quedando así definida la CIM para el AE de orégano. Sanit (2016), observó una inhibición total de crecimiento micelial de *Alternaria* spp., en una concentración de 1,0 mg ml<sup>-1</sup> de extracto crudo de orégano, coincidiendo con lo obtenido en este trabajo.

**Tabla 2**

Diámetro de crecimiento y de *Alternaria* spp. y porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.)

Aceite esencial de tomillo (mg ml <sup>-1</sup> )	Diámetro de crecimiento (cm)	% CIM
Control sin aceite esencial	7,2	-
0,0094	6,0	7,7
0,0188	6,0	16,7
0,0282	5,9	18,0
0,0370	5,8	19,4
0,0470	5,7	21,0
0,0940	5,2	34,8
0,1410	4,6	38,6
0,1880	3,8	49,3
0,2350	2,7	64,0
0,2820	s/c	100,0
0,3290	s/c	100,0

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

Ref.: s/c: sin crecimiento. % CIM: Porcentaje de Concentración Inhibitoria Mínima

Se ensayaron varias concentraciones para llegar a la CIM del AE de tomillo definida en 0,2820 mg ml<sup>-1</sup>. Bahraminejad *et al.* (2016), observaron inhibición total del crecimiento micelial de *A. solani* utilizando AE de tomillo, coincidiendo con los datos encontrados en este estudio.

Los investigadores Feng y Zheng (2007), Karpinski (2020), Mine y Kose (2015), Raveau *et al.* (2020), Puskarova *et al.* (2017) han reportado la susceptibilidad de especies del género *Alternaria* spp., a los AE de orégano y tomillo, coincidiendo con los resultados de éste estudio.

Entre las plantas aromáticas con actividad antimicrobiana reportada, los de la familia *Lamiaceae*, orégano y tomillo ocupan un lugar destacado (Pierozan *et al.*, 2009) ya que poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, relacionadas al elevado porcentaje de los compuestos fenólicos carvacrol y timol. Los mismos pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Bagamboula *et al.*, 2004; Borboa Flores *et al.*, 2010; Kotan *et al.*, 2007; Soković *et al.*, 2007).

*Efectos de aceites esenciales de orégano y tomillo sobre el poder germinativo de semillas de tomate*

#### Evaluación del Vigor

Como puede observarse en la Tabla 3, los tratamientos con los AE no afectaron el Vigor de las semillas, ya que el Porcentaje de Plántulas Normales fue semejante al tratamiento control.

**Tabla 3**

Vigor de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Primer conteo de Plántulas Normales (valores en porcentaje).

% Plántulas Normales		
Control	AE orégano	AE tomillo
69,75a	67,50a	74,50a

a Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) Ref.: AE: Aceite esencial

a Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) Ref.: AE: Aceite esencial

Comparadas con el tratamiento control, las plántulas normales de ambos tratamientos con AE, presentaron un desarrollo del sistema radicular más corto, con menor cantidad de raíces secundarias. El desarrollo del hipocótilo también fue menor. Estas diferencias se observaron marcadamente en el tratamiento con el AE de tomillo. El desarrollo de los cotiledones no mostró diferencias significativas entre tratamientos.

#### Evaluación del Poder Germinativo

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con AE aplicados a las semillas y el tratamiento control (Tabla 4).

**Tabla 4**

Poder Germinativo, expresado como porcentaje de Plántulas Normales, de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Tratamiento	% Plántulas anormales	% No germinadas	% Plántulas Normales
Control	5,00b	10,25c	84,75d
AE orégano	3,25b	10,75c	86,25d
AE tomillo	2,25b	11,75c	86,00d

b, c, d, Medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Ref.: AE: Aceite Esencial

b, c, d, Medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Ref.: AE: Aceite Esencial

En general, las anormalidades que se observaron, afectaron en mayor medida al sistema radicular. Ibáñez y Blázquez, (2020) analizando la fitotoxicidad de AE de orégano y tomillo sobre semillas de tomate, encontraron una mayor sensibilidad en el crecimiento de la raíz que en el hipocótilo de las plántulas. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron porcentajes de Vigor y Poder Germinativo agrónomicamente aceptables en semillas tratadas con los AE. Los datos de este trabajo coinciden con los obtenidos por Tomazoni *et al.* (2016) respecto al efecto inhibitorio del AE de *L. alba* sobre *A. solani* y la CIM sobre la germinación de las semillas.

## CONCLUSIONES

Los aceites esenciales probados en este estudio resultaron con buena actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la cepa de *Alternaria* spp. aislada, a bajas concentraciones. De los dos aceites evaluados, el de tomillo resultó más efectivo, ya que se necesitó una menor concentración para inhibir totalmente el crecimiento de la cepa fúngica bajo control. Estos resultados indican que los aceites esenciales de tomillo y orégano podrían ser considerados como una alternativa de control frente a la enfermedad conocida como Tizón temprano causada por el hongo *Alternaria* spp.

Las Concentraciones Inhibitorias Mínimas de ambos aceites no produjeron efectos fitotóxicos sobre las semillas de tomate, demostrando que fueron capaces de inhibir al patógeno sin presentar efectos negativos notables sobre la germinación. Por lo tanto, podrían considerarse como alternativa para controlar el Tizón temprano sin perjudicar el desarrollo de las plántulas.

La metodología y tipo de estudio empleado en este trabajo, puede ser proyectada a otras especies del género del hongo, como de cultivos que se desean proteger.

## Agradecimientos

A la Asociación Cooperadora EEA La Consulta-INTA. Al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). A INNOVA T de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal de la Universidad Nacional de Córdoba, al Departamento de Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, de la UNRC y a Laboratorio SanBau. Diagnóstico Agropecuario.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abiodun, J., Efe-Imafidon, A. E., Benson, O. A. & Ajibola Aluko, P. (2017). Efficacy of selected plant extracts in the management of tomato Early Blight disease caused by *Alternaria solani*. *Asian J. Plant Pathol.*, 11 (1): 48-52. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2017.48.52>.
- Achimón, F., Brito V., Pizzolitto, P. R., Ramirez Sanchez, A., Gómez E., & Zygadlo, J. A. (2020). Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Revista Argentina de Microbiología*: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>.
- Adhikari, P., Oh Y. & Panthee, D. R. (2017). Current status of Early Blight resistance in tomato: an update. *International Journal Molecular Sciences*. 18, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms18102019>.
- Arraiza, M. P., González Coloma, A., Berrocal Lobo, A. M. F., Domínguez Núñez, J. A., Da Costa, A., Navarro Rocha, J., & Calderón Guerrero, C. (2018). Antifungal effect of essential oils. *Potential of Essential Oils*, 145-164. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.78008>.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M. & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards

- Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bahraminejad, S., Seifolahpour, B. & Amiri, R. (2016). Antifungal effects of some medicinal and aromatic plant essential oils against *Alternaria solani*. *J. Crop Prot.*, 5(4), 603-616. <https://doi.org/10.18869/modares.jcp.5.4.603>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Borboa Flores, J., Rueda Puente, O., Acedo F. E., Ponce J., Cruz Villegas, M., García Hernández, J. & Ortega Nieblas, M. (2010). Evaluation of antibacterial activity in vitro of essential oils vs *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 12, 539-547.
- Carezzano, M. E., Sotelo, J. P., Primo, E., Reinoso, E. B., Paletti Rovey, M. F., Demo M. S., Giordano, W. F. & Oliva M. de las M. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*, 19, 599- 607. <https://doi.org/10.1111/plb.12572>
- Carmona, M. & Sautua F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y Ambiente*. Facultad de Agronomía UBA, 37(1), 1-19.
- Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A. J. & Restrepo, S. (2007). Biotic constraints of the *Solanaceae* caused by *Phytophthora*, *Alternaria* . *Ralstonia* in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 320-329.
- Costa Becheleni, F. R., Del Toro Sánchez, C. L., Wong Corral, F. J., Robles Burgueño, M. R., Cárdenas López, J. L. & Borboa Flores, J. (2020). Aceites esenciales para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: *Curculionidae*) y efecto sobre la calidad del grano de maíz *Zea mays* Linnaeus (Poales: *Poaceae*). *Revista Chilena de Entomología*, 46(4), 639-652.
- Cuzco Bobadilla, C. & Chico Ruíz J. (2015). Antifungal effect of *Origanum vulgare* essential oil on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*. *Sagasteguiana*, 3(1), 79-86.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvator, E. G., Battinelli, L. & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43, 391-396.
- Dal Bello, G. & Sisterna, M. (2010). Use of plant extracts as natural fungicides in the management of seedborne diseases. *Management of Fungal Plant Pathogens*, 51-66.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. InfoStat versión (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F. & Dalla Rizza, M. (2011). Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, 71(2), 231-239.
- Djordjevic, M., Djordjevic, O., Djordjevic, R., Mijatovic, M., Kostic, M., Todorovic, M. & Ivanovic, M. (2013). Alternative approach in control of tomato pathogen by using essential oils in vitro. *Pakistan Journal of Botany*, 45(3), 1069-1072.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M. del C. & Martínez, B. (2013). Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Rev. Protección Veg.* 28(1), 54-59.

- EL Rasheed, S. & EL Rasheed, A. S. (2017). Vegetable diseases control by using essential oils to access organic production in Sudan. *Agri Res & Tech: Open Access J.*, 6(4). <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.06.555694>
- Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, 18(9), 1126-1130. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.017>
- Goussous, S. J., Abu el-Samen, F. M. & Tahhan, R. A. (2010). Antifungal activity of several medicinal plants extracts against the early blight pathogen (*Alternaria solani*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(17), 1745-1757. <http://doi.org/10.1080/03235401003633832>
- Ibáñez, M., D., & Blázquez M.A. (2020). Phytotoxic effects of commercial essential oils on selected vegetable crops: cucumber and tomato. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100209>
- ISTA (2017). International Rules for Seed Testing. Edición 2017. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- ISTA (2018). International Rules for Seed Testing. Edición 2018. Handbook of seedling evaluation. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- Karpinski, T. M. (2020). Essential oils of *Lamiaceae* family plants as antifungals. *Biomolecules*, 10, 103. <https://doi.org/10.3390/biom10010103>
- Konstantinović, B., Popov, M., Samardžić, N., Aćimović, M., Elez J., S., Tijana Stojanović, T., Crnković M. & Rajković (2022). The effect of *Thymus vulgaris* L. hydrolate solutions on the seed germination, seedling length, and oxidative stress of some cultivated and weed species. *Plants*, 11, 1782. <https://doi.org/10.3390/plants11131782>.
- Kotan, R., Dadasoglu, F., Kordali, S., Cakr, A., Dikbas, N. & Cakmakc, R. (2007). Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodispv. vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. *Journal of Agricultural Technology*, 3(2), 299-306.
- Lamichhane, J. R., Saaydeh, S. D., Kudsk, P. & Messeén, A. (2015). Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10-24. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE>
- Miles, T. D., Fairchild, K. L., Merlington, A., Kirk, W., Rosenzweig, N. & Warton, P. S. (2013). First report of boscalid and penthiopyrad-resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Michigan. *Plant Dis.*, 97(12), 1655. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0279-PDN>
- Mine, S. E. & Kose, F. (2015). Antifungal activities of essential oils against citrus black rot disease agent *Alternaria alternata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18, 894-903. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0279-PDN> 10.1080/0972060X.2014.895158
- Oliva, M. de las M., Carezzano, M. E., Giuliano, M., Daghero, J., Zygadlo J., Bogino, J., Giordano, W. & Demo, M. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology*, 17, 758-765.
- Paz, R., Sita, N., Polanco Aballe, A. G., Reyes Gómez, S. & Pavel, N. (2013). Comportamiento del tizón temprano del tomate (*Alternaria solani*) en las condiciones del municipio de Holguín, Cuba. *Fitosanidad*, 17(2), 75-81.
- Perelló, A., Gruhlke, M., & Slusarenko, A. (2013). Effect of garlic extract on seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat. *Journal of*

- Plant Protection Research*, 53(4), 319-323. <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0048>
- Pierozan, M., Pauletti, G., Rota, L., Santos, A., Lerin, L., Di Luccio, M., Mossi, A., Atti-Serafini, L., Cansian, R. & Oliveira, J. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 29(4), 764-770.
- Puskarova, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D. & Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7, 8211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>.
- Raveau, R., Fontaine, J. & Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. *Foods*, 9(365). <https://doi.org/10.3390/foods9030365>
- Sajid, A., Irshad, G., Naz, F., Ghuffar, S., Hassan, I., Mahmood, N., Rani, K., Manzoor, M. F., Meesam, A., Hamzah, A. M. & Karamt, M. Z. (2020). In vitro evaluation of plant essential oils against *Alternaria alternata* causing fruit rot of grapes. *Asian J Agric & Biol*. 8(2), 168-173. <https://doi.org/10.35495/ajab.2019.11.532>
- Sanit, S. (2016). Antifungal activity of selected medicinal plants against *Alternaria* species: The pathogen of dirty panicle disease in rice. *J. Med. Plants Res.*, 10(15), 195-201. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5117>
- Santamarina, M.P.; Roselló, J.; Sempere, F.; Giménez, S. & Blázquez, M.A. (2015). Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Nat. Prod. Res.* 29, 2215–2258. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1002406>
- Simmons, E. G. (2000). *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. *Mycotaxon*, 75, 1–115.
- Soković, M., Marin, P., Brkić, D., & Griensven, L. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food Global Science Books* (1)1.
- Thiesen, A. L., Schmid, D., Marques Pinheiro, M. V., Holz, E., Stringari Altissimo, B., & Holz, E. (2019). Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. influences the germination, vigor and emergence of lettuce seeds. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 416-425. <https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i3.8033>
- Tomazoni, E. Z., Pansera, M. R., Pauletti, G. F., Moura, S., Ribeiro, R. & Schwambach, J. (2016). In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 999-1010. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150019>