



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de aceites esenciales para el control biológico de

Fusarium oxysporum f.sp. *phaseoli*

Alumno/a: Beatriz de la Fuente Arroyo

Tutor/a: Fernando Manuel Alves Santos

Junio 2025

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1. Cultivo de la judía común: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | 3 |
| 2.2. La judía en España | 4 |
| 2.2.1. Superficie y producción en España | 4 |
| 2.2.2. Análisis económico | 6 |
| 2.2.3. Marcas de calidad | 7 |
| 2.3. Enfermedades y plagas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | 8 |
| 2.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> | 9 |
| 2.4. Control biológico | 10 |
| 2.4.1. Aceites esenciales | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 14 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 16 |
| 4.1. Material patogénico | 15 |
| 4.2. Aceites esenciales | 15 |
| 4.3. Análisis del crecimiento de los hongos <i>in vitro</i> | 16 |
| 4.4. Análisis del crecimiento de los hongos <i>in vivo</i> | 18 |
| 4.5. Análisis estadístico | 20 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| 5.1. Análisis del crecimiento de los hongos <i>in vitro</i> | 22 |
| 5.1.1. FOP-SP1 | 24 |
| 5.1.2. FOP-SP2 | 31 |
| 5.1.3. FOP-SP4 | 38 |
| 5.1.4. FOP-SP5 | 45 |

| | |
|---|----|
| 5.2. Análisis de inhibición de crecimiento de los hongos <i>in vivo</i> | 52 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 57 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 59 |

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Resumen: La judía común enfrenta serias amenazas por enfermedades fúngicas, especialmente la fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum*, que provoca marchitez vascular y reduce significativamente los rendimientos agrícolas. Esta situación demanda alternativas sostenibles al control químico tradicional. Los aceites esenciales de especies forestales (abeto, cedro, pino) y aromáticas (canela) emergen como una prometedora alternativa de biocontrol debido a sus propiedades antifúngicas naturales. Debido a la falta de estudios sobre la aplicación de estas sustancias para controlar la marchitez de la judía por *Fusarium oxysporum*, este trabajo tiene como objetivo evaluar el uso de aceites esenciales de abeto, cedro, pino y canela como agentes biocidas contra diferentes cepas de dicho hongo patógeno. Se realizaron dos tipos de ensayo: un ensayo *in vitro* con aceites esenciales de abeto, cedro y pino diluidos a diferentes concentraciones de 30, 300 y 3000 partes por millón (ppm) respectivamente; y un ensayo *in vivo* con los aceites esenciales mencionados anteriormente y con aceite esencial de canela de manera adicional, aplicados mediante riego en una concentración de 300 ppm. Los resultados obtenidos muestran un efecto fungicida temporal de los aceites en el ensayo *in vitro*, mientras que se observa un efecto fitotóxico del aceite en el ensayo *in vivo*.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* spp., control biológico, aceite esencial, abeto, cedro, pino, canela.

ABSTRACT

Abstract: Common bean faces serious threats from fungal diseases, particularly fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum*, which induces vascular wilting and significantly reduces agricultural yields. This situation demands sustainable alternatives to traditional chemical control. Essential oils from forest species (fir, cedar, pine) and aromatic species (cinnamon) emerge as a promising biocontrol alternative due to their natural antifungal properties. Due to the lack of studies on the application of these substances to control bean wilt caused by *Fusarium oxysporum*, this work aims to evaluate the use of essential oils from fir, cedar, pine, and cinnamon as biocidal agents against different strains of this pathogenic fungus. Two types of assays were conducted: an *in vitro* assay with essential oils from fir, cedar, and pine diluted at different concentrations of 30, 300, and 3000 parts per million (ppm) respectively; and an *in vivo* assay with the aforementioned essential oils and cinnamon essential oil additionally, applied through irrigation at a concentration of 300 ppm. The obtained results show a temporary fungicidal effect of the oils in the *in vitro* assay, while a phytotoxic effect of the oil is observed in the *in vivo* assay.

Key words: *Fusarium oxysporum* spp., biological control, essential oil, fir, cedar, pine, cinnamon.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cultivo de la judía común: *Phaseolus vulgaris* L.

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa anual diploide ($2n = 22$) de autogamia predominante, ampliamente reconocida por su alto valor nutricional y su relevancia en la alimentación humana (Tomlekova et al., 2023). Este cultivo destaca por su aporte significativo de proteínas, así como por su contenido en vitaminas (como la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina), minerales esenciales (hierro, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio) y fibra alimentaria, además de ser una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente linoleico y alfa-linolénico, que contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares y otros beneficios para la salud (Feedtables.com, s.f.; Trombino et al., 2022).

Desde el punto de vista evolutivo y de domesticación, la evidencia genética indica que *Phaseolus vulgaris* tiene su origen en Mesoamérica, particularmente en México, desde donde se dispersó hacia Sudamérica, dando lugar a los principales grupos genéticos andino y mesoamericano (Bitocchi et al., 2012). Su llegada a Europa, y específicamente a la Península Ibérica, se produjo tras el contacto con América en el siglo XVI, lo que permitió su posterior difusión y adaptación a diversos ambientes (Paredes et al., 2009; Singh, 2013).

La judía común prospera principalmente en regiones de clima templado o subtropical, si bien en zonas tropicales su cultivo es posible durante los períodos fríos y secos. Las condiciones de humedad excesiva combinadas con temperaturas elevadas resultan perjudiciales, pues propician el desarrollo de enfermedades y provocan la caída prematura de las flores.

El desarrollo óptimo de la planta se produce en un rango térmico de 15 a 21°C, aunque estos valores pueden variar según la variedad y la etapa de crecimiento específica (ya sea germinación, floración u otras fases). Cuando la temperatura del suelo desciende por debajo de 15°C, la germinación se ve comprometida, mientras que temperaturas superiores a 20°C ralentizan el crecimiento. La planta muestra particular vulnerabilidad ante las heladas, y su respuesta al fotoperiodo varía según la variedad cultivada.

En cuanto al terreno, las judías se adaptan favorablemente a suelos que presentan buen drenaje y riqueza en materia orgánica, siendo el pH óptimo para su cultivo el comprendido entre 5,2 y 6,8 (Alves-Santos, 1999).

2.2. La judía en España

2.2.1. Superficie y producción en España

La superficie total dedicada al cultivo de leguminosas grano en España asciende a aproximadamente 360.000 hectáreas según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, anuario estadística 2023). Esta superficie se distribuye entre diferentes tipos de legumbres secas, de las cuales la judía representa solo un 2% de la superficie total, equivalente a unas 8.000 ha y donde destacan los cultivos para el consumo animal (guisante seco 122.000 ha, veza 77.000 ha, yeros 48.000 ha y haba seca 17.000) y de garbanzo y lenteja para consumo humano (36.000 ha y 40.000 ha, respectivamente).

La producción de judía grano en España ha decaído con la superficie cultivada (Figura 2.1) y se sitúa en aproximadamente 14000 toneladas (Figura 2.2). Sin embargo, esta cifra presenta ciertas fluctuaciones debido a la plantación del cultivo en tierras de secano. De esta manera las condiciones climatológicas afectan al rendimiento productivo en cada comunidad que oscila entre valores en secano como 655 kg/ha en Castilla y León y 2200 kg/ha en Galicia, mientras que en regadío los valores son más parecidos (1923 kg/ha en Castilla y León y unos 2100 kg/ha en Galicia).

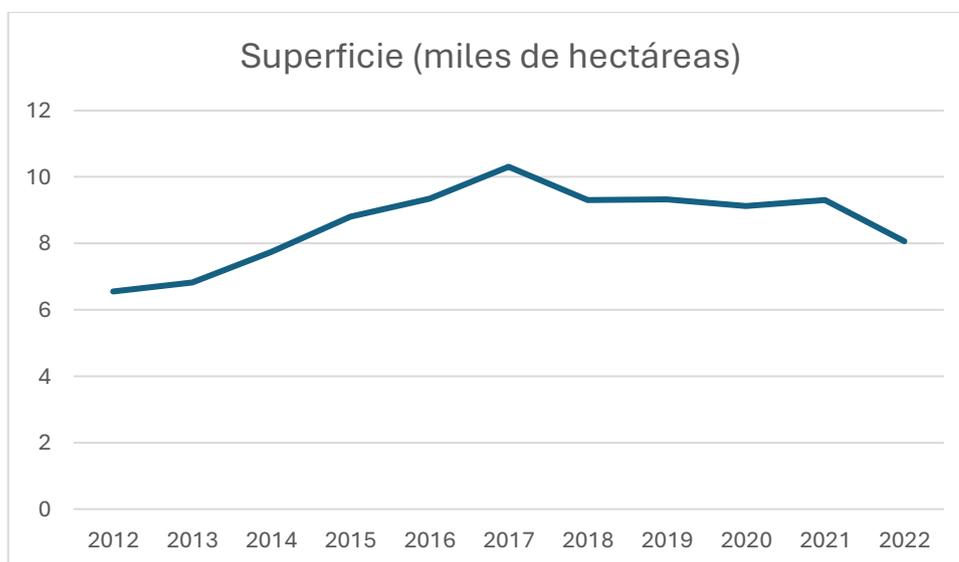


FIGURA 2.1. Superficie cultivada de judía grano en España en el período 2012-2022 (en miles de ha). Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

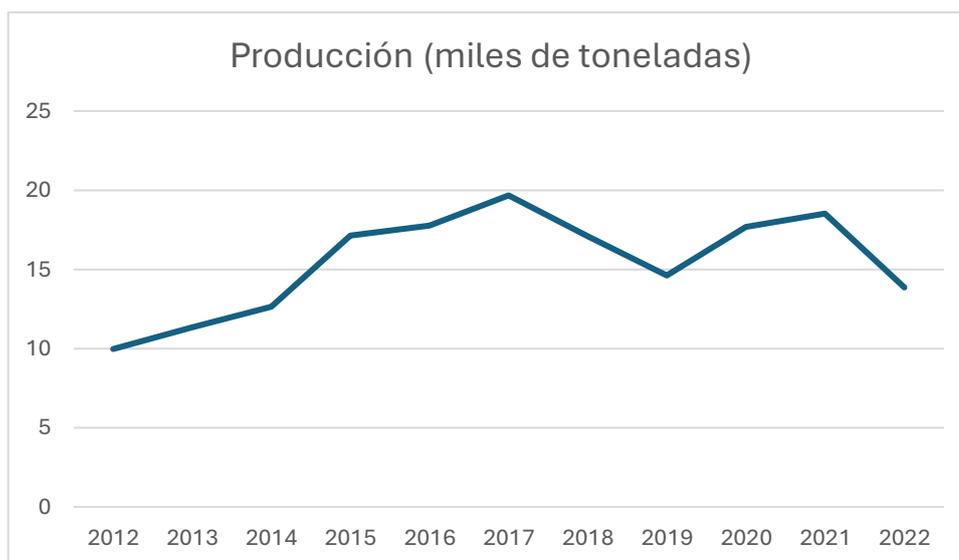


FIGURA 2.2. Producción judía grano en España en el período 2012-2022 (en miles de toneladas). Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

La principal región productora de leguminosas grano es Castilla La Mancha (120.000 ha) seguida de Castilla y León (109.000 ha) pero específicamente para la judía grano las principales son Castilla y León con 3604 ha (3186 ha en León), seguida de Galicia con 1856 ha (Figura 2.3).

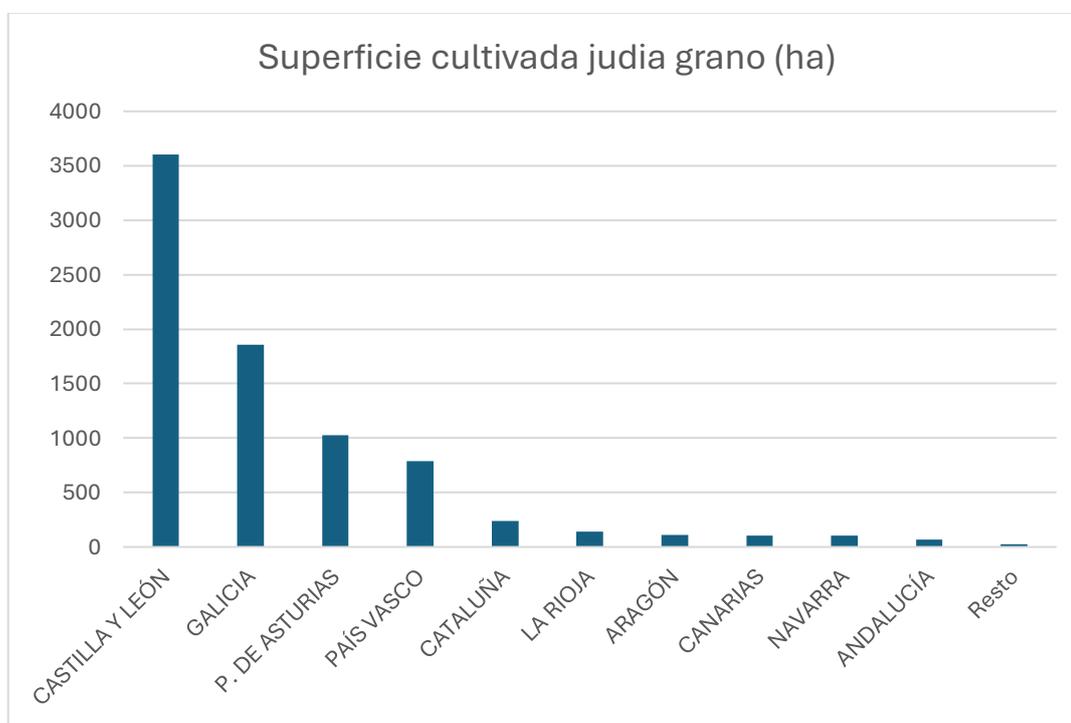


FIGURA 2.3. Superficie cultivada de judía de grano en España por comunidades (en ha). En Resto se incluyen comunidades con menos de 10 ha cultivadas. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

2.2.2. Análisis económico

Según el Informe del Consumo Alimentario en España del año 2023, el consumo de legumbres en los hogares españoles ha caído un 1,2 % en volumen respecto al año anterior. La cantidad promedio de legumbres ingeridas por residente también cae, en este caso, un 2,3 % respecto al año anterior (Tabla 2.1).

Las legumbres representan un 0,41% del presupuesto de las familias a la hora de invertir dinero en compras de alimentación.

TABLA 2.1. Valores numéricos del consumo doméstico de legumbres en España (2023) respecto a volumen, valor, consumo per cápita, gasto por cápita y precio medio. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

| | Consumo doméstico de LEGUMBRES | % Variación 2023 vs. 2022 | % Variación 2023 vs. 2019 |
|------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Volumen (miles kg) | 152.501,09 | -1,2 % | -1,0 % |
| Valor (miles €) | 332.098,88 | 6,0 % | 12,1 % |
| Consumo x cápita (kg) | 3,26 | -2,3 % | -2,4 % |
| Gasto x cápita (€) | 7,10 | 4,8 % | 10,5 % |
| Precio medio (€/kg) | 2,18 | 7,3 % | 13,2 % |

En cuanto a la categoría de legumbres, dividida en legumbre seca y cocida, se observa un mayor consumo de esta última (56,8%) respecto a la seca (43,2%). En cuanto a valor de mercado, la legumbre seca se posiciona por delante de la cocida (53,4 % frente a 46,6 %).

2.2.3. Marcas de calidad

En España, varias marcas de calidad reconocidas destacan en la producción de judía común, especialmente a través de Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) y Denominaciones de Origen Protegidas (DOP). A continuación, se presentan algunas de las más significativas (Tabla 2.2).

TABLA 2.2. Marcas de calidad reconocidas de judía común en España. Fuente: elaboración propia, 2024.

| IGP | DOP |
|----------------------------|-----------------------|
| Judía de El Barco de Ávila | Judía del Ganxet |
| Alubia de La Bañeza-León | Faba Granja Asturiana |

En la región correspondiente con la IGP de El Barco de Ávila destaca la plantación de las siguientes variedades (Ares, D. A., 2014):

- Blanca Arrocina,
- Blanca Redonda,
- Blanca Riñón,
- Morada Larga.

2.3. Enfermedades y plagas de *Phaseolus vulgaris* L.

Destacan tres tipos de enfermedades: víricas o virales, fúngicas y bacterianas (Tabla 2.3).

Las enfermedades virales en plantas son infecciones causadas por virus que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Después de los hongos, los virus son los causantes de las mayores pérdidas en cultivos agrícolas (Ares, D. A., 2014). Los síntomas comunes de una infección viral en plantas incluyen enanismo, alternancia del color natural de la planta con manchas cloróticas, manchas anilladas, malformaciones en hojas y necrosis entre otros. (Sepúlveda, G. (n/d)).

Entre las enfermedades fúngicas que afectan a la judía común se encuentran aquellas provocadas por hongos del suelo. La planta presenta síntomas de necrosis en las raíces y cuello, envejecimiento de hojas cercanas al suelo, pérdida de vigorosidad de la planta y reducción del rendimiento de esta. Por otro lado, los hongos aéreos provocan diferente sintomatología en la planta y la presencia de unos u otros dependerá del tipo de clima, estado fenológico de la planta, método de propagación, etc (Barbeito, M. P., 2009).

Finalmente, en cuanto a enfermedades bacterianas destacan la bacteriosis común y de halo, provocadas por diferentes bacterias (*Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*, respectivamente). Estas en ocasiones aparecen simultáneamente y se han observado en zonas productoras como La Bañeza (León) y ocasionalmente en El Barco de Ávila (Alves-Santos, comunicación personal) donde reciben el nombre común de “grasa de la judía” por las lesiones traslúcidas y brillantes que se asemejan a manchas de grasa en un papel.

La judía común se ve afectada por diferentes tipologías de enfermedades:

TABLA 2.3. Clasificación de enfermedades de *Phaseolus vulgaris* L. Fuente: modificado de Barbeito (2009).

| Enfermedad | Tipología | Patógeno |
|----------------------------------|------------|---|
| Bean Common Mosaic Virus (BCMNV) | Vírica | Potyvirus |
| Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) | | Potyvirus |
| Cucumber Mosaic Virus (CMV) | | Cucumovirus |
| Tomato Spotted Wilt Virus | | Tospovirus |
| Roya | Fúngica | <i>Uromyces appendiculatus</i> |
| Podredumbre gris | | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Podredumbre blanca | | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> |
| Antracnosis | | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> |
| Fusariosis vascular | | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> |
| Bacteriosis de halo | Bacteriana | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> |
| Bacteriosis común | | <i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> |

2.3.1. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es un complejo de especies anamórficas presenta una considerable variación morfológica y fisiológica. Se trata de un microorganismo que puede encontrarse en los suelos, donde sobrevive de manera saprófita o estableciéndose dentro de tejidos vegetales. Sus variantes patogénicas tienen la capacidad de atacar y enfermar a más de un centenar de especies de plantas diferentes (Niño-Sánchez et al., 2015).

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr. f.sp. *phaseoli* J.B. Kendrick & W.C. Snyder es un patógeno que se identificó primeramente en los Estados Unidos en el 1929 (Maina et al.,

2017). En 1926 en la zona del Barco de Ávila ya se identificaron síntomas de marchitez y amarilleamiento de las judías (Alves-Santos et al., 1999) que se confirmaron décadas más tarde cumpliendo los postulados de Koch (Díaz-Mínguez et al. 1996).

Es en esta región donde se manifiesta con gran virulencia ocasionando importantes pérdidas no tanto por el volumen de producción de la zona, sino por la calidad de la judía (Alves-Santos, 1999). Algunas de las cepas patogénicas españolas que se detectan en la zona (FOP-SP, FOP: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, SP: Spain) pertenecen a la raza 6 de este patógeno y se caracterizan por su capacidad de afectar a todas las variedades de judía ensayadas, incluyendo a variedades que se habían descrito como resistentes (Alves-Santos et al., 2002). En este trabajo hemos empleado las siguientes:

- Cepa FOP-SP1: proveniente de La Carrera (España). Muy virulenta.
- Cepa FOP-SP2: proveniente de El Barco de Ávila (España). Muy virulenta.
- Cepa FOP-SP4: proveniente de La Carrera (España). Poco virulenta.
- Cepa FOP-SP5: proveniente de La Carrera (España). Poco virulenta.

El sistema de colonización de *F. oxysporum* consiste en introducirse por las heridas o uniones entre raíces laterales y principal. Las heridas en la raíz se ven favorecidas por condiciones de alta humedad y en algunas ocasiones, la presencia de nematodos y otros organismos que se alimentan de las plantas puede ayudar a la entrada del patógeno. Tras penetrar el tejido cortical, avanza hacia el cilindro central y se propaga por los vasos conductores. Al colonizar el xilema, obstruye el transporte de agua y nutrientes hacia la parte aérea de la planta, provocando marchitez y frecuentemente la muerte del huésped (Argotti, 2016).

2.4. Control biológico

El control biológico según la definición de Baker y Cook (1974) es “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”.

Existen otras definiciones de control biológico o biocontrol. Dentro de ellas están las que se refieren al uso de organismos vivos para el efecto de control (agentes de control biológico, BCA de sus siglas en inglés) y algunas más amplias como la de Agrios (Agrios, 1991) donde incluye también los cultivares resistentes o las actuales que incluyen los productos de

origen natural. En el caso de *Fusarium* lo más extendido y que se encuentra como formulados comerciales es el uso de BCAs, sobre todo hongos (del género *Trichoderma*) y bacterias (Alves-Santos y Diez, 2011).

El Real Decreto 1311/2012, por el que se establece el uso sostenible de los productos fitosanitarios, indica “Los métodos sostenibles biológicos, físicos y otros no químicos deberán preferirse a los métodos químicos, siempre que permitan un control satisfactorio de las plagas”. Por ello, trabajamos en esta línea de investigación como una aproximación al desarrollo de productos potencialmente aplicables en control biológico.

El control biológico con sustancias naturales se refiere al uso de compuestos de origen biológico o natural para el manejo y control de plagas, patógenos y malezas en sistemas agrícolas y forestales. Esta estrategia incluye el empleo de metabolitos secundarios de plantas, microorganismos entomopatógenos, extractos vegetales, aceites esenciales, feromonas, y otros compuestos bioactivos que actúan como biopesticidas, biofungicidas o bioinsecticidas (Isman, 2020; Pavela & Benelli, 2016). A diferencia del control químico sintético, estas sustancias presentan mayor selectividad, menor persistencia ambiental, reducida toxicidad para organismos no objetivo y menor riesgo de desarrollo de resistencia (Regnault-Roger et al., 2012).

Los aceites esenciales representan una de las categorías más estudiadas debido a su amplio espectro de actividad y su potencial como alternativa ecológica a los pesticidas sintéticos (Pavela & Benelli, 2016; Lengai et al., 2020). De hecho, en estudios como el de Mirasierra Velardo, R. (2021) se emplean aceites esenciales de citronela, abeto, pino, cedro, canela y clavo para el control de hongos patógenos *in vitro*.

2.4.1. Aceites esenciales

Según la norma ISO 9235:2013 (2013), se define un aceite esencial como un producto obtenido mediante destilación con agua o vapor, procesamiento mecánico o destilación seca de materiales naturales. Pueden aparecer como compuestos líquidos volátiles, transparentes o coloreados resultante de una mezcla de compuestos aromáticos, de ahí su importancia en la industria de la cosmética y perfumería.

Los aceites esenciales se obtienen de diferentes órganos de la planta: flores, madera, raíces, semillas, frutos, rizomas, etc. Cada aceite esencial se caracteriza por la presencia de un grupo químico constituyente, por ejemplo, el timol se caracteriza por el grupo fenol; el cedreno

por el grupo terpeno; el ácido mirístico como su propio nombre indica contiene un grupo ácido; el mentol se caracteriza por su grupo alcohol, etc (Kumar et al., 2019).

Estos compuestos tienen diversas funciones en las plantas. En algunos casos su función es atrayente de organismos beneficiosos como son los polinizadores y en otros casos son repelentes de organismos nocivos o fitófagos e incluyendo propiedades de carácter antibacteriano y antifúngico, de ahí su interés fitopatológico.

2.4.1.1. Aceite esencial de abeto

Abies sibirica L. (abeto siberiano) es una conífera perenne de gran tamaño con una abundante copa verde, y es una de las especies dominantes en la taiga de Rusia europea, así como en la taiga occidental y oriental de Siberia (Shakhmatov et al., 2015).

En los aceites esenciales preparados a partir de agujas o ramitas y ramas, el limoneno, β -pineno, α -pineno, canfeno, β -felandreno y acetato de bornilo son los compuestos principales (Ancuceanu et al., 2023).

Algunos estudios previos demuestran la actividad antifúngica del acetato de bornilo, inhibiendo el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* (Zhang et al., 2022). Además, aceites esenciales como el obtenido a partir de *Laurelia sempervirens* (laurel chileno), que contiene β -pineno y α -pineno entre otros compuestos, muestra también actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (Avello et al., 2012).

Finalmente, el limoneno, aunque a altas concentraciones en comparación con otros compuestos bioactivos, también ofrece actividad inhibitoria contra *Fusarium* (Cerna-Chávez et al., 2019).

2.4.1.2. Aceite esencial de cedro

Cedrus deodara (D. Don) G. Don, comúnmente conocido como cedro del Himalaya, es una especie de cedro nativa de los Himalayas occidentales, que se encuentra en el este de Afganistán, el norte de Pakistán, el norte-centro de India, el suroeste del Tíbet y el oeste de Nepal (Chaudhary et al., 2011).

El aceite esencial obtenido de las hojas del cedro presenta una clara actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, siendo el mentol y etanol los extractos solventes orgánicos causantes de esta inhibición (Joshi et al., 2018).

2.4.1.3. Aceite esencial de pino

El pino silvestre, *Pinus sylvestris*, pertenece a la familia Pinaceae. Es una especie de hoja perenne, distribuida por Europa, Asia, América y África del norte. Esta especie es la única del género nativa de Gran Bretaña (Carlisle & Brown, 1968).

Los aceites esenciales obtenidos de esta especie se caracterizan por la presencia de α -pineno, δ -3-careno, acetato de bornilo, β -cariofileno, δ -cadineno, β -cariofileno, δ -cadineno y diterpenoides (Judzentiene & Kupcinskiene, 2008).

Alguno de estos compuestos se ha mencionado anteriormente destacando su actividad antifúngica. De la misma manera, aceites esenciales como el obtenido a partir de *Amomum rubidum*, muestran actividad antimicrobiana contra *Fusarium* spp., que se relaciona con algunos de sus principales componentes, como es el caso de δ -3-careno (Huong et al., 2021).

2.4.1.4. Aceite esencial de canela

Dentro de la familia de las *Lauraceae* se encuentra el canelo, *Cinnamomum aromaticum*. Esta especie es indígena de Sri Lanka y de la zona sur de la India (Thakur et al., 2021).

Los aceites esenciales de esta especie se caracterizan por la presencia de varios grupos químicos, entre los que destacan el cinamaldehído, eugenol, o-metoxicinamaldehído, linalool, α -pineno, β -cimeno, α -felandreno, benzílico, cumínico, nonílico, furfural (Narváez, 2006).

Algunos compuestos como el cinamaldehído, eugenol y o-metoxicinamaldehído han demostrado en diversos estudios propiedades antifúngicas (Narváez, 2006; García-Camarillo et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Este estudio tiene como motivación principal investigar el potencial de diversas sustancias naturales como agentes de control biológico contra hongos patógenos.

Los resultados que se obtengan buscan respaldar el control biológico en la protección de cultivos y contribuir al desarrollo de productos basados en estas sustancias como alternativas eficaces y sostenibles para el manejo integrado de enfermedades en sistemas agrícolas.

Por ello, se concluye que el objetivo principal es:

- Evaluar la capacidad de diferentes aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* en el cultivo de judía común.

Se pretende alcanzar ese objetivo general a través de los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar in vitro la capacidad de los aceites esenciales (abeto, cedro y pino) para la inhibición de la germinación de cuatro cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP-SP1, FOP-SP2, FOP-SP4 y FOP-SP5) mediante su aplicación por pipeteado en placas de Petri.
- Evaluar in vivo la capacidad de aceites esenciales (abeto, cedro, pino y canela) para la inhibición de la germinación de dos cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP-SP1 y FOP-SP5) mediante la aplicación por riego en macetas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se han llevado a cabo diversos experimentos para evaluar el potencial de los aceites esenciales extraídos de abeto, cedro y pino como agentes de control biológico contra diferentes cepas de *Fusarium oxysporum*. Se realizarán dos ensayos: ensayo *in vitro* y ensayo de inóculo en planta.

La metodología experimental para el ensayo *in vitro* incluyó un diseño robusto con tres réplicas por tratamiento, además de un grupo control por cepa, para garantizar la validez estadística de los resultados.

4.1. Material patogénico

Para este estudio se ha seleccionado *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, agente patógeno responsable de causar la fusariosis vascular. Se han seleccionado cuatro cepas pertenecientes a la raza 6 (Alves-Santos et al., 2002) que fueron aisladas de cultivos de judía de la comarca de El Barco de Ávila entre los años 1993-1996 (Alves-Santos, 1999):

- FOP-SP1 (1993, cepa virulenta)
- FOP-SP2 (1996, cepa virulenta)
- FOP-SP4 (1994, cepa poco virulenta)
- FOP-SP5 (1994, cepa poco virulenta)

Para el ensayo *in vivo* se emplearán las cepas FOP-SP1 y FOP-SP5, de manera que se prueba en cepas virulentas y poco agresivas respectivamente (Alves-Santos et al., 2002).

4.2. Aceites esenciales

Para llevar a cabo este ensayo de control biológico *in vitro*, se han utilizado productos comerciales provenientes de herbolario, específicamente los siguientes aceites esenciales:

- Aceite esencial de madera de cedro del Himalaya, obtenido de *Cedrus deodara* (D. Don) G. Don.
- Aceite esencial de aguja de abeto siberiano, derivado de *Abies sibirica* Ledeb.
- Aceite esencial de aguja de pino escocés, extraído de *Pinus sylvestris* L.

Para el ensayo *in vivo*, adicionalmente se empleará:

- Aceite de canela de corteza extraído de *Cinnamomum zeylanicum*. La incorporación de este aceite se fundamentó en los resultados prometedores obtenidos en ensayos paralelos in vitro que evaluaron las propiedades antifúngicas de aceites esenciales, lo que motivó la evaluación de su eficacia in vivo.

Estos aceites esenciales han sido seleccionados por sus propiedades bioactivas, que los convierten en agentes potenciales para el control biológico en diferentes contextos.

4.3. Análisis del crecimiento de los hongos *in vitro*

La evaluación del control biológico se realizó mediante el análisis del desarrollo micelial de los hongos, cultivados in vitro en medio PDA (Potato Dextrose Agar) sobre placas de Petri. Para la preparación del medio de cultivo, se añadieron 39 gramos de PDA en un litro de agua destilada y se agitó hasta su completa disolución. Posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Se incorpora la dilución correspondiente de aceite esencial cuando el medio alcanza aproximadamente 50 °C, justo antes de su solidificación. Posteriormente, se procede a distribuir alícuotas de unos 25 mL del medio en placas de Petri con un diámetro interior de 85 mm (90 mm de diámetro comercial).

Se prepararon las diluciones de los aceites esenciales considerando su naturaleza hidrofóbica, utilizando etanol absoluto como solvente. El proceso de dilución seriada se realizó de la siguiente manera:

1. Para T3000

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

- C1: 10% = 0,1 = 100.000 ppm
- V1 = 9 mL aceite esencial
- V2 = 300 mL PDA

Cálculo de la concentración final:

$$C_2 = \frac{100.000 \times 9}{300} = 3.000 \text{ ppm} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

2. T300: 9 mL al 1%/300 mL = 9mL a 10000 ppm/300 mL = 300 ppm

- C1: 1% = 0,01= 10.000 ppm
- V1 = 9 mL
- V2 = 300 mL

$$C_2 = \frac{10.000 \times 9}{300} = 300 \text{ ppm} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

3. T30: 9 mL al 0,1%/300 mL = 9mL a 1000 ppm/300 mL = 30 ppm

- C1: 0,1% = 0,001= 1000 ppm
- V1 = 9 mL
- V2 = 300 mL

$$C_2 = \frac{1000 \times 9}{300} = 30 \text{ ppm} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

4. Control PDA: 9 mL de alcohol en 300 mL de disolución.

El diseño experimental comprende un total de 144 placas de Petri, que resultan de la combinación factorial de tres aceites esenciales (abeto, cedro y pino), cuatro concentraciones de tratamiento (T0, T30, T300 y T3000), cuatro cepas patógenas distintas, y tres réplicas por cada condición experimental.

En condiciones asépticas dentro de una cabina de flujo laminar, se procedió a la obtención de inóculos fúngicos a partir de las placas replicadas del cultivo original. Utilizando un bisturí previamente estéril, gracias a la aplicación previa de etanol y su exposición a la llama de un mechero Bunsen; se extrajo una porción cúbica de aproximadamente 5x5x5 mm de agar que contenía micelio activo de cada hongo en estudio. Estos inóculos fueron transferidos individualmente al centro de cada una de las nuevas placas de cultivo preparadas y, finalmente se colocaron en la incubadora a unos 21°C, donde se mantuvieron una semana hasta la primera medición. Para facilitar el seguimiento del crecimiento radial, se marcó el punto central de inoculación en la parte exterior de cada placa con un rotulador permanente.

Para realizar las mediciones del crecimiento micelial, se trazaron dos ejes perpendiculares que cruzan por dicho punto central de inoculación, utilizando una regla para garantizar precisión. Durante las cuatro semanas siguientes, una vez a la semana se mide el

crecimiento del micelio en mm a lo largo del eje vertical y horizontal respectivamente (diámetro: D), para poder calcular el área colonizada según la fórmula 4.5. El micelio puede alcanzar un área máxima de colonización de 5674,18 mm².

$$\text{Superficie} = \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times \pi \quad (\text{Ec. 4.5})$$

4.4. Análisis del crecimiento de los hongos *in vivo*

Primeramente, se rellenan 30 maceteros con sustrato vermiculita 100 % (Tabla 4.1) hasta la mitad de su capacidad. Seguidamente se prepara la semilla de judía en un vaso de precipitados y se lava con hipoclorito de sodio cinco minutos. A continuación, se enjuaga con agua del grifo. Una vez realizada esta limpieza, se distribuyen diez semillas por maceta y se riega con ayuda de un matraz aforado con capacidad de 2 L, de esta manera la semilla obtiene la humedad necesaria para germinar.

TABLA 4.1. Propiedades del sustrato 100% vermiculita.

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| pH | 7 |
| Densidad | 80-120 kg/m ³ |
| Conductividad eléctrica | 10 mS/m |
| Granulometría | 1-3 mm |

Se preparan 12 placas Petri en total: 6 placas correspondientes a la muestra FOP-SP1 y 6 placas de la muestra FOP-SP5, donde previamente se ha replicado el patógeno.

Se dispone de un mechero Bunsen, alcohol para desinfección, un asa de siembra (extendedor) y tubos Falcon de 50 ml en los que se deposita la extracción.

Se recogen con agua las esporas de placas PDA de una semana y se cuentan en cámara Thoma. Después se ajusta la concentración a 10⁶ esporas/ml para el ensayo estándar CIAT (Pastor Corrales & Abawi, 1987).

Para el conteo de esporas la cámara Thoma dispone de un área de cuadrado de 0,0025 m² y una altura de muestra de 0,1 mm. Colocamos un cubreobjetos sobre la cámara y con ayuda de una micropipeta se deposita una muestra de la suspensión en el extremo centro superior de la cámara. Finalmente, se observa la muestra en el microscopio y se procede al conteo. Como guía la cámara contiene unos cuadrados divididos en 16 subcuadrados donde se cuenta el n° de esporas contenido en cada área y se pueden calcular las soluciones de inóculo (Ec. 4.6).

$$\frac{n^{\circ} \text{ esporas}}{16 \times 0,1 \text{ mm} \times 0,0025 \text{ mm}^2} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Tras conseguir las soluciones de inóculo, se extraen las plantas de judía con dos semanas de desarrollo, separándolas en bandejas distintas según el aceite esencial con el que fueron regadas durante la semana previa. Se procede a limpiar minuciosamente las raíces de cualquier residuo de sustrato mediante un lavado con agua corriente.

El ensayo incluye 10 plantas por cada cepa patogénica y control, que se evaluará con los aceites propuestos (abeto, canela, cedro y pino). Paralelamente, se llevará a cabo un ensayo de control que comprenderá 10 plantas por cepa patogénica y 10 plantas sin aceite ni patógeno.

Las plantas más saludables son seleccionadas para la inoculación, que se distribuyen con una densidad de 5 plantas/tiesto, realizándoles cortes en las raíces que funcionarán como vías de entrada para el patógeno. Posteriormente, estas raíces se sumergen durante 5 minutos en las soluciones de inóculo correspondientes, se escurren para eliminar el exceso de líquido y finalmente se trasplantan a las macetas (Figura 4.1).

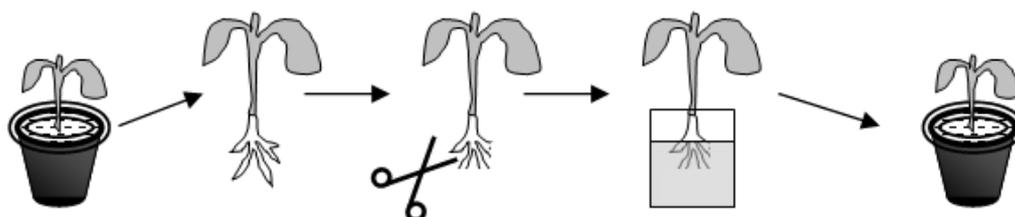


FIGURA 4.1. Esquema del procedimiento a seguir para inocular el patógeno en planta. Fuente: Dibujo elaborado por Fernando Alves, F.M. (Alves-Santos, 1999).

La valoración de la enfermedad se realizará según la escala de CIAT (Pastor Corrales & Abawi, 1987): consiste en contar las hojas afectadas que presentan clorosis, necrosis y/o caída prematura. Se clasificará según la siguiente escala en función del criterio mencionado anteriormente:

| | | |
|----------------|--------|-------------------------|
| 1: planta sana | 2: 5% | 3: 10% |
| 4: 15-20% | 5: 25% | 6: 35-40% |
| 7: 50% | 8: 75% | 9: 100% o planta muerta |

Según estos valores se considera planta resistente cuando el índice de enfermedad se encuentra entre 1 y 3 y planta susceptible cuando este índice es superior a 3 (Salgado & Schwartz, 1993). Si sabemos que es una variedad susceptible se denominará aislado no patogénico o patogénico, respectivamente.

En la semana 3 se comienza a aplicar tratamiento mediante el riego: 100 ml por tiesto a 300 ppm de aceite esencial de canela. Además, en la tercera semana del ensayo se procede a inocular el patógeno. Previamente a la inoculación se había realizado un riego con 3000 ppm de tratamiento para el acondicionamiento de la planta. En vista del posible efecto fitotóxico de esta dosis se ajustó la dosis a un valor menor.

4.5. Análisis estadístico

Para hacer una evaluación correcta de los datos primero se evalúa la homocedasticidad (también conocida como homogeneidad de varianzas) de los datos obtenidos. Esto implica que la variabilidad de los datos es aproximadamente constante en todos los niveles de la variable predictora (Labra & Torrecillas, 2014). Para analizar este parámetro la prueba de Levene es particularmente adecuada, ya que en los estudios microbiológicos la normalidad perfecta es poco común y esta prueba se adapta bien a este comportamiento (Odoi et al., 2019). Con este método se pretende no cometer errores de tipo I, que se corresponde con un "falso positivo", es decir, rechazar la hipótesis nula (H_0) cuando en realidad es verdadera.

Para la prueba de Levene específicamente:

- La hipótesis nula (H_0) es que las varianzas de los grupos que se están comparando son iguales (homogeneidad de varianzas).

- La hipótesis alternativa (H_1) es que al menos una de las varianzas es diferente de las demás (heterogeneidad de varianzas).

Si el valor p resultante de la prueba de Levene es menor que 0,05, rechazamos la hipótesis nula y concluimos que las varianzas son significativamente diferentes (Gómez et al., 2013). Esto significa que la probabilidad máxima que estamos dispuestos a aceptar de cometer un error tipo I es del 5%.

En el caso de que se demuestre heterocedasticidad significativa en los datos, se rechaza la hipótesis nula y por ello los análisis estadísticos se realizan con test no paramétricos: para la evaluación de las variables se realizará el test de Kruskal-Wallis. En los casos donde este test indicó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se procederá a realizar comparaciones por pares mediante el test U de Mann-Whitney.

El análisis estadístico se realizó mediante el software STATISTICA v.8 (StatSoft, Inc., 2007), mientras que la estadística descriptiva y la elaboración de gráficas se llevaron a cabo utilizando el paquete de Microsoft Office.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis del crecimiento de los hongos *in vitro*

Los datos de crecimiento superficial del micelio se analizaron para verificar el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad mediante el test de Levene, evaluando si las varianzas entre grupos son homogéneas y se satisfacen los criterios para la aplicación de análisis paramétricos (Tabla 5.1).

TABLA 5.1. Resultados test de Levene filtrado por cepa patogénica (FOP-SP1, FOP-SP2, FOP-SP4, FOP-SP5), aceite y semana. NaN= Not a number.

| FOP-SP1 | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|
| | SEMANA 1 | SEMANA 2 | SEMANA 3 | SEMANA 4 |
| Abeto | 0,011 | 0,052 | 0,03 | NaN |
| Cedro | 0,011 | 0,006 | 0,011 | 0,01 |
| Pino | 0,014 | 0,019 | 0,013 | 0,01 |
| FOP-SP2 | | | | |
| | SEMANA 1 | SEMANA 2 | SEMANA 3 | SEMANA 4 |
| Abeto | 0,049 | 0,009 | 0,001 | NaN |
| Cedro | 0,03 | 0,02 | 0,004 | 0,021 |
| Pino | 0,07 | 0,017 | 0,001 | 0,001 |
| FOP-SP4 | | | | |
| | SEMANA 1 | SEMANA 2 | SEMANA 3 | SEMANA 4 |
| Abeto | 0,029 | 0,008 | 0,003 | 0,001 |
| Cedro | 0,012 | 0,006 | 0,029 | 0,001 |
| Pino | 0,325 | 0,012 | 0,01 | NaN |
| FOP-SP5 | | | | |
| | SEMANA 1 | SEMANA 2 | SEMANA 3 | SEMANA 4 |
| Abeto | 0,325 | 0,014 | 0,023 | 0,002 |
| Cedro | 0,006 | 0,043 | 0,013 | 0,009 |
| Pino | 0,052 | 0,02 | 0,001 | NaN |

- FOP-SP1: Todos los valores son $< 0,05$, indicando heterocedasticidad en todas las semanas.
- FOP-SP2: Todos los valores son $< 0,05$, indicando heterocedasticidad.
- FOP-SP4: Valores $< 0,05$, excepto en Pino semana 1 ($0,325 > 0,05$).
- FOP-SP5: Mayoría de valores $< 0,05$, excepto Abeto semana 1 ($0,325 > 0,05$).

Dado que la gran mayoría de los datos no cumplen con el supuesto de homocedasticidad, que es un requisito para pruebas paramétricas, se realizaron las pruebas no paramétricas de

Kruskal Wallis y U Mann-Whitney para comprobar diferencias significativas entre dosis de aceite para cada tratamiento.

En todas las cepas analizadas, los aceites esenciales de abeto, cedro y pino mostraron un patrón similar de inhibición del crecimiento fúngico. Las concentraciones de 300 ppm y 3000 ppm produjeron una reducción significativa del crecimiento micelial durante las dos primeras semanas del experimento, como se observa en las gráficas de evolución de crecimiento (Figuras 5.1, 5.3, 5.5, 5.7, 5.9, 5.11, 5.13, 5.15, 5.17, 5.19, 5.21, y 5.23). Esto se confirma en la comparación por pares con los análisis estadísticos de U-Mann Whitney (Figuras 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 5.10, 5.12, 5.14, 5.16, 5.18, 5.20, 5.22, y 5.24).

La alta eficacia de los aceites esenciales en las primeras semanas se ve respaldada por otras investigaciones, como es el caso de Ben-Jabeur et al. (2015), donde la reducción de la severidad de fusariosis vascular fue especialmente notable a los 7 días postratamiento con aceite esencial de tomillo, con un descenso hasta el 30,76% respecto al control. Sin embargo, este efecto antifúngico puede disminuir progresivamente para aceites como los de abeto, cedro y pino, donde el caso de estudio de Mirasierra Velardo (2021), se evidencia una pérdida de efectividad partir de la tercera semana, perdiéndose por completo en la cuarta semana, apoyando lo ocurrido en el presente estudio.

Estudios como el de Barrera Necha y García Barrera (2008) respaldan el uso de concentraciones mayores de aceites esenciales en tratamientos antifúngicos para lograr mayor efectividad, donde las concentraciones de 300 µg/ml muestran efecto inhibitorio total de *Fusarium* sp. al emplear *Thymus vulgaris* e inducen efecto dosis dependiente sobre el crecimiento micelial al emplear *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Teloxys ambrosioides*.

Esta transitoriedad del efecto antifúngico de los aceites esenciales puede deberse a la volatilidad y degradación de sus compuestos activos. Para prolongar el efecto antifúngico de los aceites se pueden emplear sustancias encapsulantes como polímeros biodegradables (Nazzaro, F., 2017) y combinaciones con otras sustancias orgánicas (Ngoya, Z. J., 2024).

Los tratamientos a baja concentración (30 ppm) y los controles no mostraron diferencias relevantes en ninguna de las cepas.

Estos resultados sugieren que el efecto antifúngico de los aceites esenciales es dosis-dependiente y transitorio, probablemente debido a la degradación de los compuestos activos o a la adaptación del hongo, en línea con lo reportado en la literatura. Las gráficas y tablas incluidas ilustran estos patrones de manera detallada para cada combinación de cepa y tratamiento.

5.1.1. FOP-SP1

Para FOP-SP1 se muestran diferencias significativas para todos los tratamientos durante las tres primeras semanas (Tabla 5.2).

TABLA 5.2. Resultados de los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis) de los tratamientos aplicados (aceites esenciales de abeto, cedro y pino en dosis de 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y control) en cepa FOP-SP1 (H = estadístico de prueba, N = tamaño muestral, $p < 0,05$ = diferencias significativas).

| SEMANA 1 | |
|-----------------|---|
| FOP-SP1 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =27,68799 p =0,0011 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,20234 p =0,0169 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,494737 p =0,0234 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =8,625148 p =0,0347 |
| SEMANA 2 | |
| FOP-SP1 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =27,37084 p =0,0012 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,18194 p =0,0171 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,64940 p =0,0138 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,838671 p =0,0200 |
| SEMANA 3 | |
| FOP-SP1 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =20,34525 p =0,0159 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =2,212121 p =0,5296 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,469565 p =0,0237 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =8,194203 p =0,0422 |
| SEMANA 4 | |
| FOP-SP1 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =7,523810 p =0,5828 |

5.1.1.1. FOP-SP1 vs. abeto

La evolución del crecimiento del micelio en la placa se ve retrasado las dos primeras semanas principalmente para los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm al compararse con los tratamientos control y el de 30 ppm.(Figura 5.1).

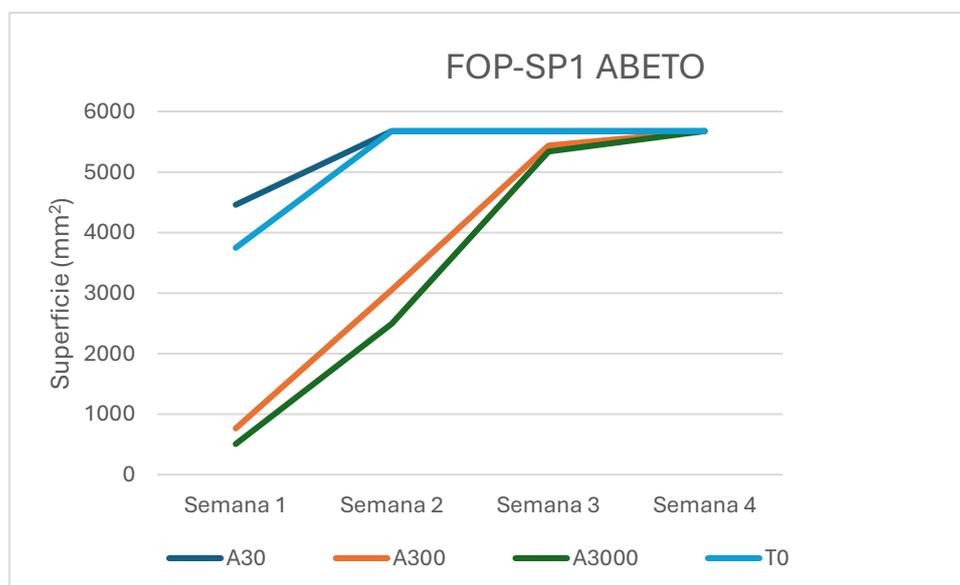


FIGURA 5.1. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP1 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (A30= 30 ppm, A300=300 ppm, A3000=3000ppm y T0=0ppm, tratamiento control) con aceite esencial de abeto.

En la Figura 5.2 se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos A300 y A3000 durante la primera semana del experimento, mientras que en la segunda semana ambos tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al grupo control y demás tratamientos evaluados. A partir de la tercera semana, ningún tratamiento se diferenció entre sí. No se observan diferencias notables entre A300 y A3000 mantenidas en el tiempo como se muestra en los resultados obtenidos en otros estudios contra patógenos de la madera de vid, donde dosis de 30 ppm tiene efecto en *Phaemoniella* a los 30 días aunque para *Neofusicoccum* requiere dosis de 3000 ppm para verse inhibición a los 30 y 60 días (Mirasierra Velardo, 2021),

Se aprecia la diferenciación de tratamientos durante la primera semana, donde se espera que ataquen más agresivamente al hongo (Ben-Jabeur, 2015) y como cabe de esperar por lo expuesto en trabajos anteriores, la dosis de aplicación induce una respuesta proporcional en el crecimiento del hongo (Barrera Necha & García Barrera, 2008).

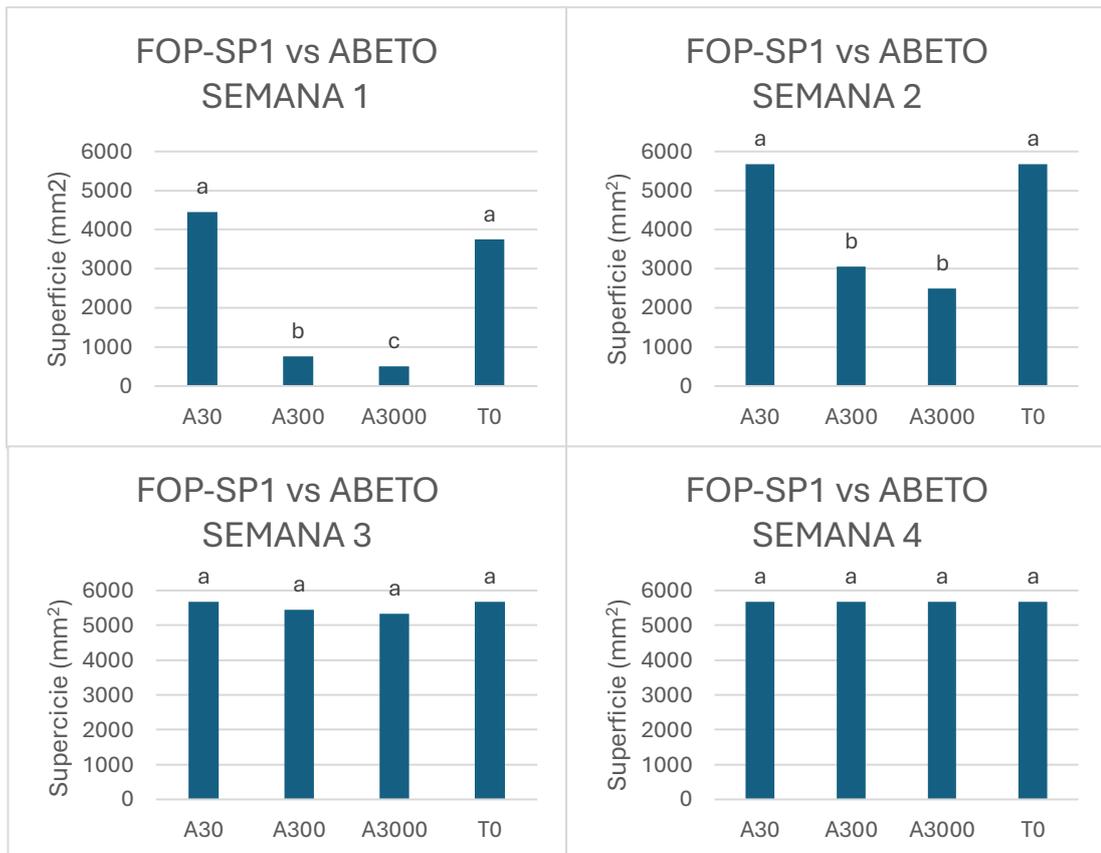


FIGURA 5.2. Crecimiento de FOP-SP1 con abeto (A) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (A30=30ppm, A300=300ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p>0,05$)

5.1.1.2. FOP-SP1 vs. cedro

Durante las dos primeras semanas se observa un retraso en el desarrollo del micelio al comparar los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm respecto al control y de 30 ppm (Figura 5.3).

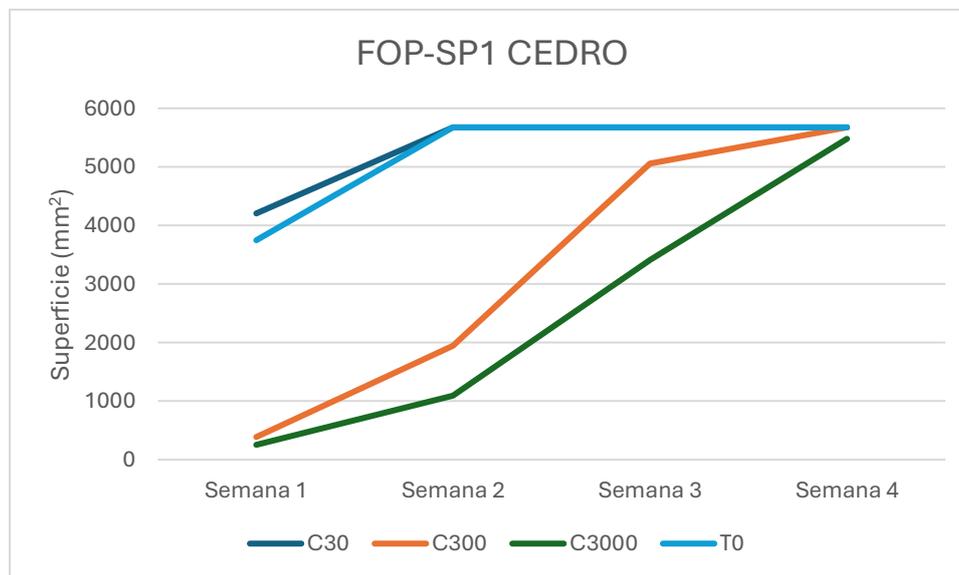


FIGURA 5.3. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP1 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (C30= 30 ppm, C300=300 ppm, C3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de cedro.

Respaldao lo dicho anteriormente, en los análisis detallados se muestran diferencias significativas entre los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm entre sí y con el resto durante las dos primeras semanas. Además, durante la semana 3, solo el tratamiento C3000 mantiene diferencias significativas con el resto (Figura 5.4), lo que respalda el efecto antifúngico del aceite en base a una dosis dependiente del mismo (Barrera Necha & García Barrera, 2008). Además, estudios como el de Mirasierra Velardo (2021), que emplea estos mismos aceites, muestra similitudes entre los tratamientos de cedro a 300 ppm y 3000 ppm a los 30 días de tratamiento y a los 60 días, el tratamiento de 3000 ppm se diferencia del resto, incluido el de 300 ppm.

En otros casos se observa una mayor efectividad de los tratamientos durante la primera semana (Ben-Jabeur, 2015) aunque en este ensayo se mantiene hasta la segunda semana.

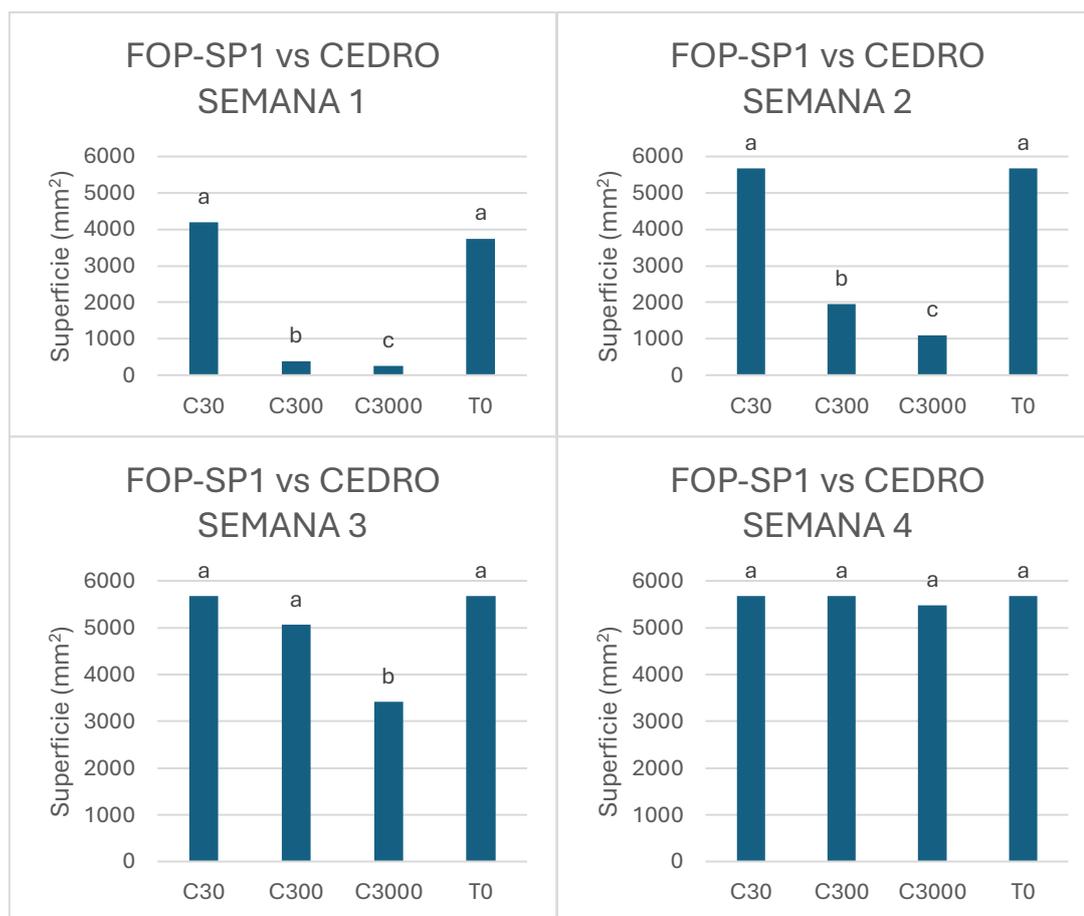


FIGURA 5.4. Crecimiento de FOP-SP1 con cedro (C) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (C30=30ppm, C300=300ppm, C3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p>0,05$).

5.1.1.3. FOP-SP1 vs. pino

Igual que en el resto de los tratamientos con aceites esenciales para FOP-FP1, el micelio muestra dificultad para crecer durante las dos primeras semanas (Figura 5.5).

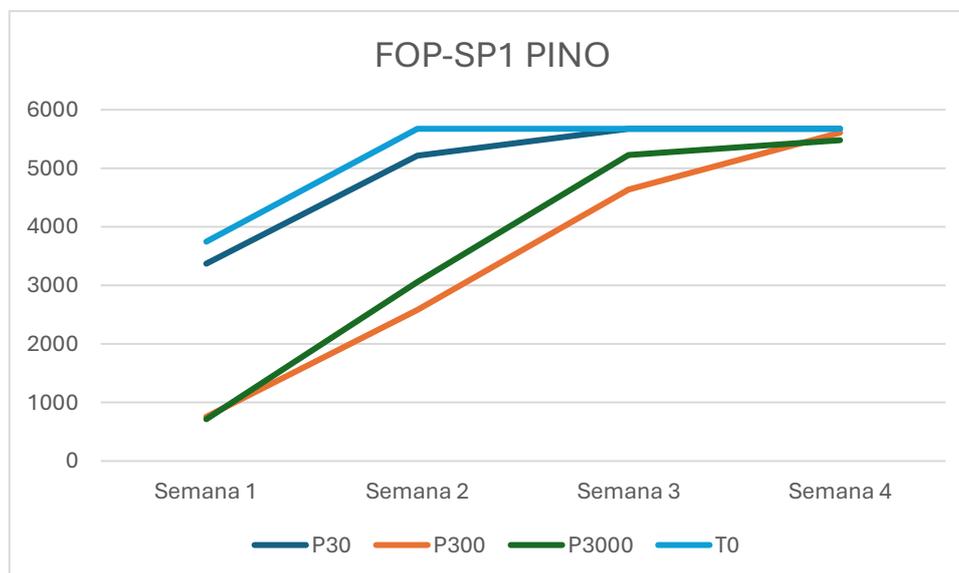


FIGURA 5.5. . Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP1 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (P30= 30 ppm, P300=300 ppm, P3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de pino.

De hecho, en la Figura 5.6 se observan diferencias significativas al aplicar los tratamientos P300 y P3000 frente al resto de tratamientos durante las dos primeras semanas. No obstante, en la semana 3, el tratamiento P300 se diferencia del resto y el P3000 pierde efectividad, pero no completamente, aunque en la última semana se pierde por completo el efecto de todos los tratamientos.

Estudios como el previamente mencionado de Mirasierra Velardo (2021) muestran resultados con ciertas semejanzas donde las dosis de aceite esencial de pino a 300 ppm y 3000 ppm sobre *Neofusicoccum parvum* BV-56 no muestran diferencias significativas entre sí al ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento del micelio.

Las dosis de aplicación inducen respuestas diferentes sobre el crecimiento del micelio (Barrera Necha & García Barrera, 2008), sobre todo durante la primera semana (Ben-Jabeur, 2015).

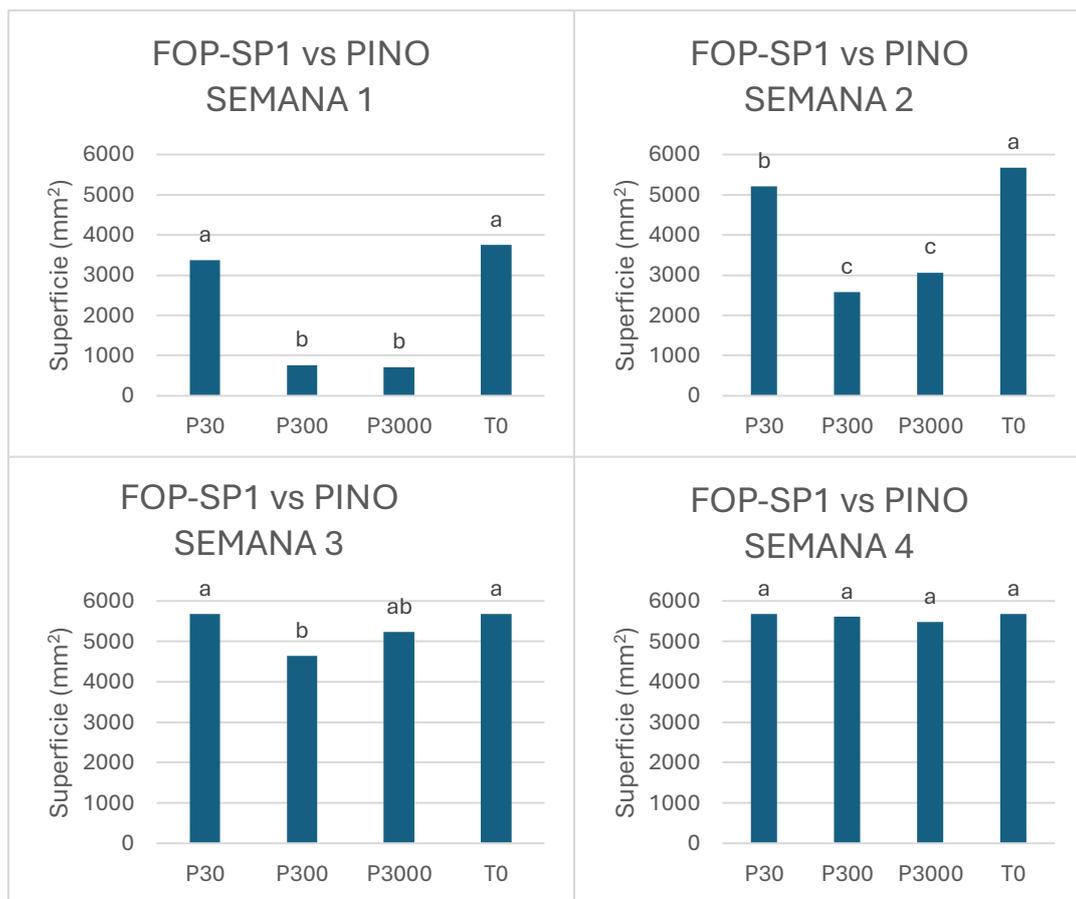


FIGURA 5.6. Crecimiento de FOP-SP1 con pino (P) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (P30=30ppm, P300=300ppm, P3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.2. FOP-SP2

Para FOP-SP2 se muestran diferencias significativas entre todos los tratamientos durante las tres primeras semanas (Tabla 5.3).

TABLA 5.3. Resultados de los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis) de los tratamientos aplicados (aceites esenciales de abeto, cedro y pino en dosis de 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y control) en cepa FOP-SP2 (H = estadístico de prueba, N = tamaño muestral, $p < 0,05$ = diferencias significativas).

| SEMANA 1 | |
|-----------------|---|
| FOP-SP2 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =26,60487 p =0,0016 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,666667 p =0,0216 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =0,0156 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,666667 p =0,0216 |
| SEMANA 2 | |
| FOP-SP2 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =26,43111 p =0,0017 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,18194 p =0,0171 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,03200 p =0,0183 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,64940 p =0,0138 |
| SEMANA 3 | |
| FOP-SP2 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =18,33397 p =0,0315 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =6,545455 p =0,0879 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =5,545605 p =0,1359 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,311881 p =0,0254 |
| SEMANA 4 | |
| FOP-SP2 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =11,86476 p =0,2210 |

5.1.2.1. FOP-SP2 vs abeto

Durante las dos primeras semanas de tratamiento se observa un cambio en el crecimiento del micelio al emplear los tratamientos de 300 ppm y 3000 ppm. Por otro lado, los tratamientos control y de 30 ppm parecen actuar de la misma manera (Figura 5.7).

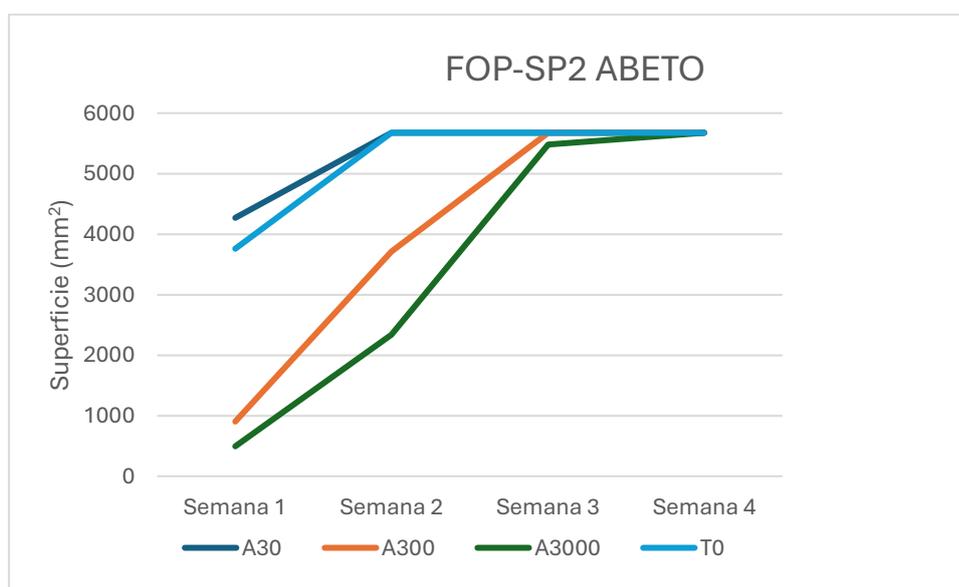


FIGURA 5.7. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP2 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (A30=30 ppm, A300=300 ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm) con aceite esencial de abeto.

En el análisis de comparación por pares se observaron diferencias significativas durante la primera semana entre los tratamientos A300 y A3000, tanto cuando se compararon entre ellos como frente al resto de aceites evaluados. Durante la segunda semana, ambos tratamientos mantuvieron diferencias significativas únicamente respecto a los demás aceites, mostrando comportamientos estadísticamente similares entre sí. A partir de la semana 3 no se diferencia ningún tratamiento, ya que se pierde el efecto antifúngico del mismo (Mirasierra Velardo, 2021) (Figura 5.8).

Estos resultados apoyan la suposición del efecto antifúngico ligado a la dosis de aceite proporcionado (Barrera Necha & García Barrera, 2008). De hecho, al tratar *Neofusicoccum parvum* (BV-56) *in vitro* con abeto en otros estudios (Mirasierra Velardo, 2021), durante la primera semana se observan diferencias entre concentraciones del aceite a dosis de 300 ppm y 3000 ppm respectivamente. En este caso se observa claramente que durante los primeros 7 días es donde más diferenciación de tratamientos tenemos en función de la dosis de aceite esencial aplicado (Ben-Jabeur, 2015).

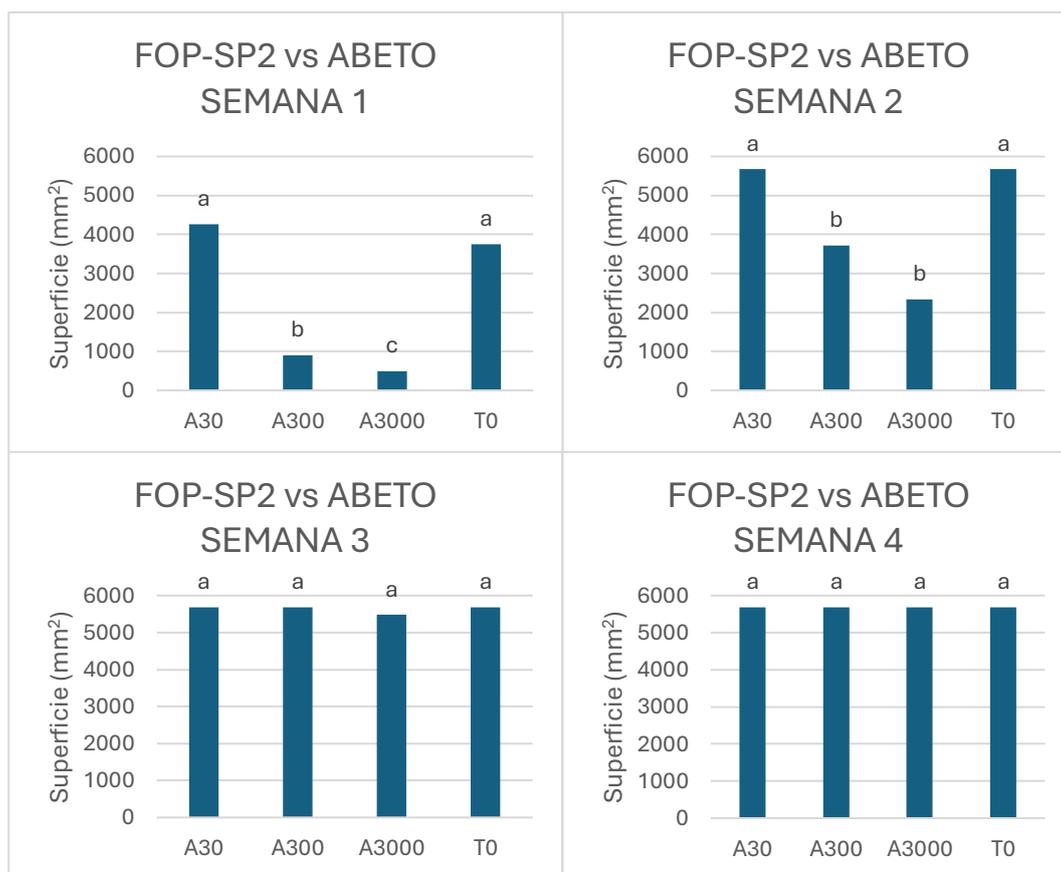


FIGURA 5.8. Crecimiento de FOP-SP2 con abeto (A) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (A30=30ppm, A300=300ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.2.2. FOP-SP2 vs cedro

Durante las dos primeras semanas de tratamiento, las dosis de aceite de 300 ppm y 3000 ppm son las que muestran mayores efectos sobre el crecimiento del micelio (Figura 5.9).

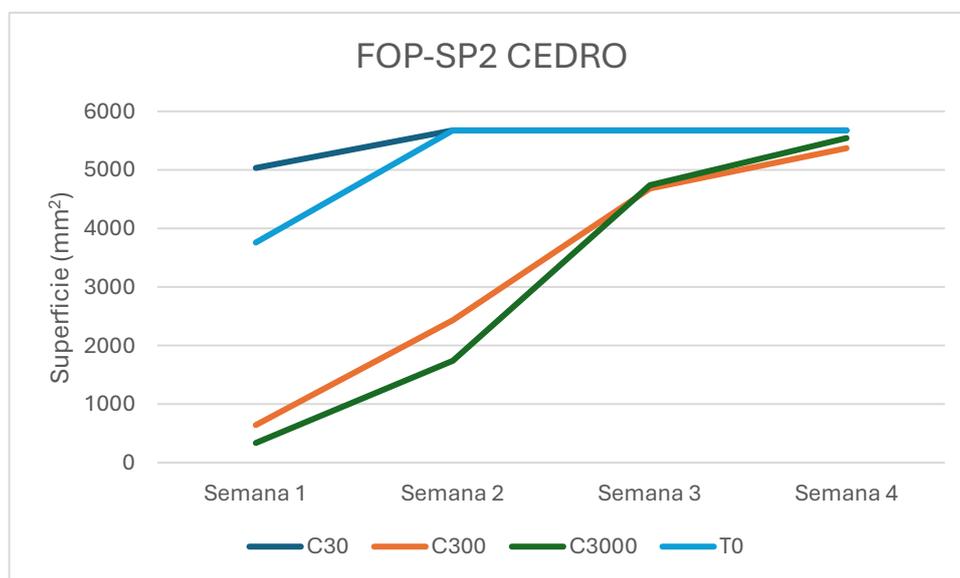


FIGURA 5.9. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP2 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (C30= 30 ppm, C300=300 ppm, C3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de abeto

En la comparación por pares se observan diferencias significativas entre sí y con el resto de las concentraciones al emplear C300 y C3000. Durante la semana 2, estos tratamientos son similares entre sí y diferentes al resto. A partir de la semana 3 no se observa ninguna diferenciación significativa entre tratamientos (Figura 5.10).

A diferencia del FOP-SP1 vs cedro, no se observa una diferenciación del C3000 en la semana 3, pero se observa la diferencia significativa de efectividad de los tratamientos en función de la dosis aplicada en los primeros 7 días (Ben-Jabeur, 2015), y además la mayor inhibición del crecimiento del hongo durante este período se da con las dosis más altas (Barrera Necha & García Barrera, 2008).

En otros estudios el tratamiento equivalente a C30 se diferencia del resto de tratamientos durante más de 30 días, a diferencia del nuestro, donde se pierde efectividad antes de la semana 4 (Mirasierra Velardo, 2021). A pesar de ser una cepa virulenta (Alves-Santos, 2002), muestra sensibilidad a tratamientos con dosis más bajas que FOP-SP1.

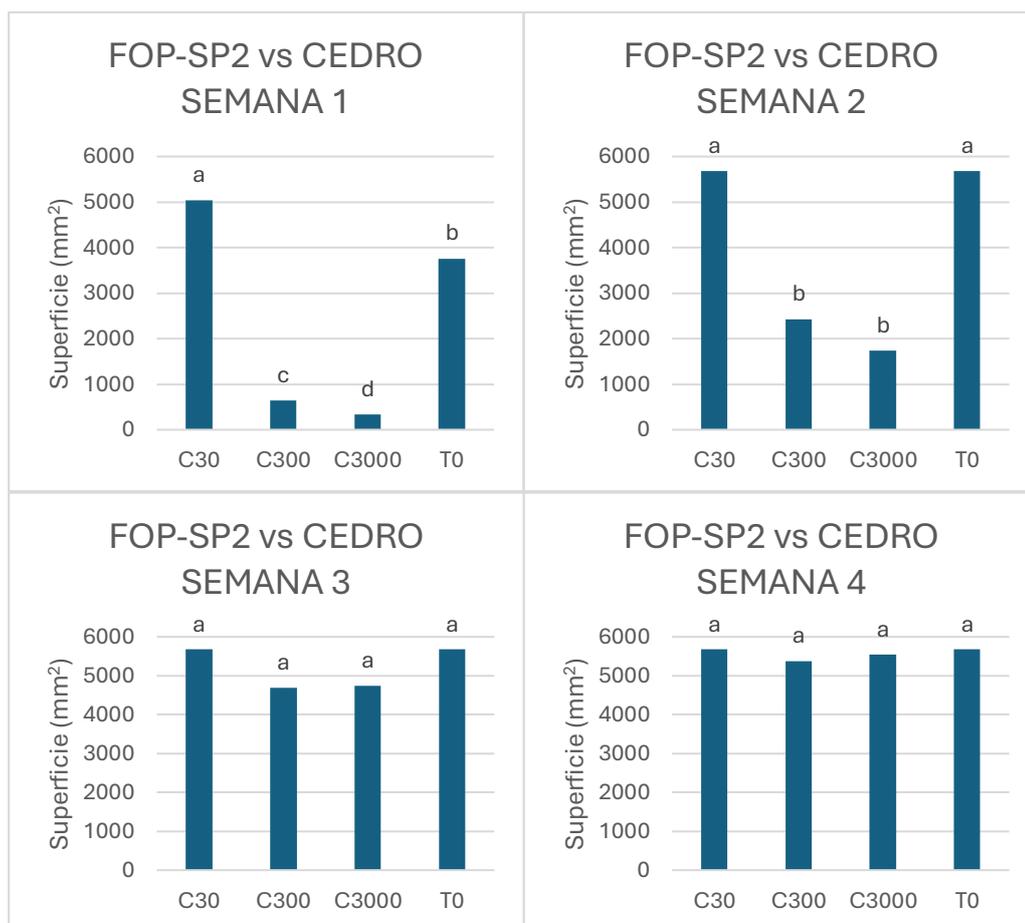


FIGURA 5.10. Crecimiento de FOP-SP2 con cedro (C) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (C30=30ppm, C300=300ppm, C3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.2.3. FOP-SP2 vs pino

Las dos primeras semanas el micelio se ve afectado en su desarrollo por los tratamientos de dosis 300 ppm y 3000 ppm, mientras que el control y el de dosis 30 ppm no muestran diferencias entre sí (Figura 5.11).

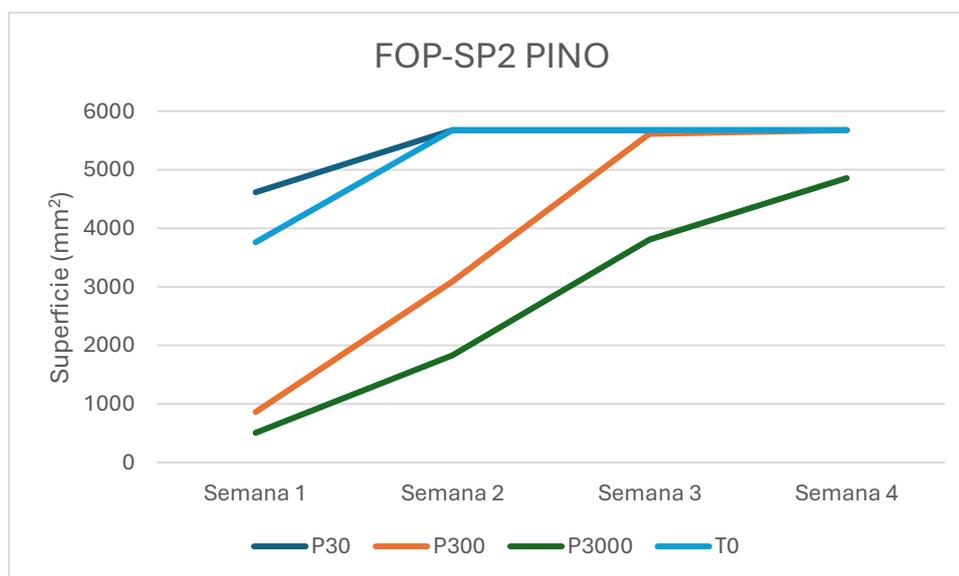


FIGURA 5.11. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP2 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (P30= 30 ppm, P300=300 ppm, P3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de abeto.

Durante las primeras dos semanas de tratamiento se registraron diferencias significativas entre los tratamientos P300 y P3000 (Figura 5.12), mientras que en la tercera semana únicamente el tratamiento P3000 mostró diferenciación respecto a los demás, perdiéndose por completo el efecto antifúngico en la semana 4, aunque esto no sucede en el trabajo de Mirasierra Velardo (2021) donde la dosis de 300 ppm es efectiva dos meses después de la siembra de las placas. En otros trabajos, sin embargo, se demuestra un efecto variable de la actividad antifúngica en función de la dosis aplicada (Barrera Necha & García Barrera. 2008), y sobre todo durante la primera semana de tratamiento (Ben- Jabeur, 2015).

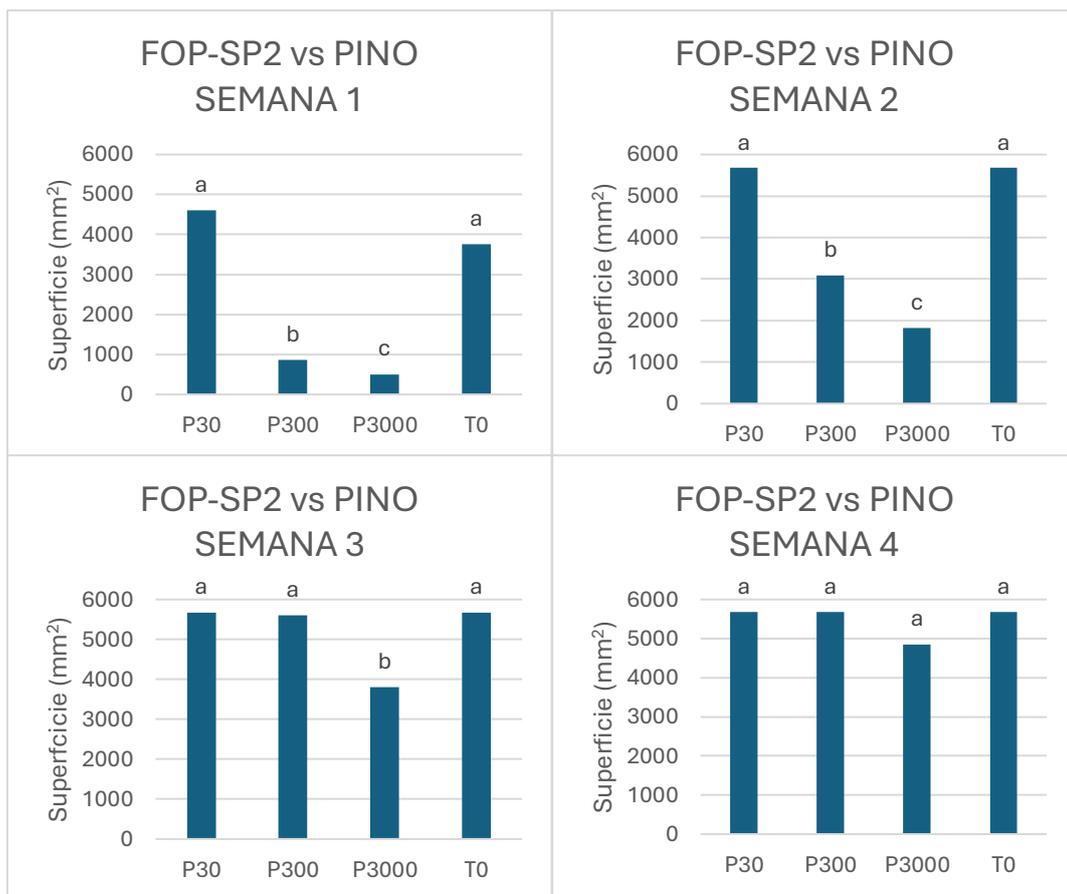


FIGURA 5.12. Crecimiento de FOP-SP2 con pino (P) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (P30=30ppm, P300=300ppm, P3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.3. FOP-SP4

En la siguiente tabla (Tabla 5.4) se muestran diferencias significativas entre tratamientos durante las dos primeras semanas para el primero de los patógenos poco virulentos.

TABLA 5.4. Resultados de los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis) de los tratamientos aplicados (aceites esenciales de abeto, cedro y pino en dosis de 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y control) en cepa FOP-SP4 (H = estadístico de prueba, N = tamaño muestral, $p < 0,05$ = diferencias significativas).

| SEMANA 1 | |
|-----------------|---|
| FOP SP4 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =26,86502 p =0,0015 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,461538 p =0,0237 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =8,512367 p =0,0365 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,20234 p =0,0169 |
| SEMANA 2 | |
| FOP SP4 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =25,94285 p =0,0021 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,17293 p =0,0172 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,597610 p =0,0223 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,597610 p =0,0223 |
| SEMANA 3 | |
| FOP SP4 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =12,21235 p =0,2016 |
| SEMANA 4 | |
| FOP SP4 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =8,287356 p =0,5055 |

5.1.3.1. FOP-SP4 vs abeto

Los tratamientos con aceite esencial de abeto contra FOP-SP4 presentan resultados favorables para los tratamientos con dosis 300 ppm y 3000 ppm durante las dos primeras semanas, aunque su eficacia disminuye posteriormente (Figura 5.13).

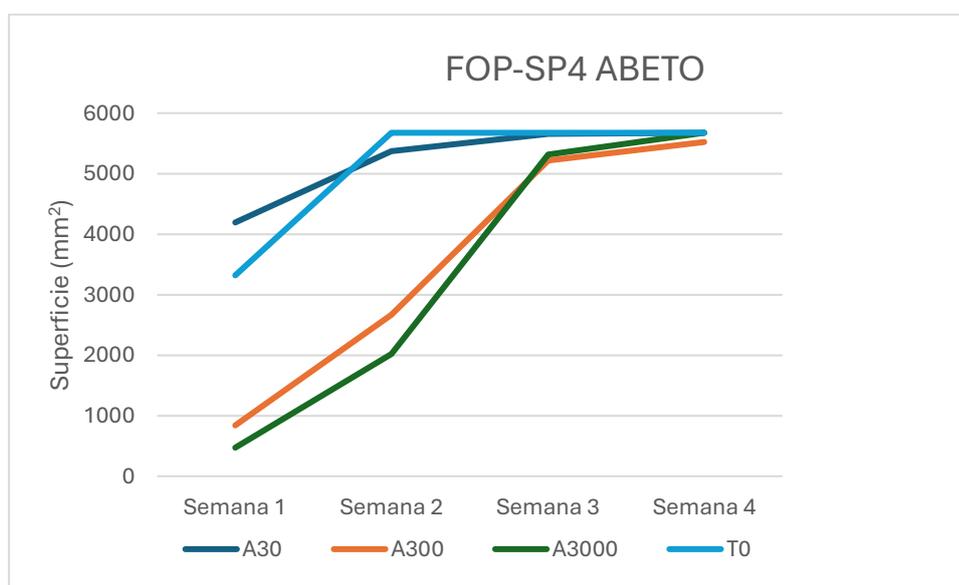


FIGURA 5.13. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP4 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (A30=30 ppm, A300=300 ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm) con aceite esencial de abeto.

Los tratamientos A300 y A3000 muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí y con el resto durante las dos primeras semanas, siendo el A3000 el que inhibe en mayor proporción el crecimiento del hongo patógeno, lo que respalda la idea de que la efectividad va ligada a la dosis de aceite esencial aplicado (Barrera Necha & García Barrera, 2008). A partir de la semana 3 se pierde efectividad en todos los tratamientos (Figura 5.14).

Los primeros 7 días se muestra mayor inhibición del crecimiento del micelio según lo expuesto en otras investigaciones (Ben-Jabeur). De hecho, estudios como el de Mirasierra Velardo (2021), muestran un comportamiento similar del aceite a dosis de 300 ppm y 3000 ppm frente a *Neofusicoccum parvum* BV-56 aunque el efecto es más duradero que en este caso de ensayo.

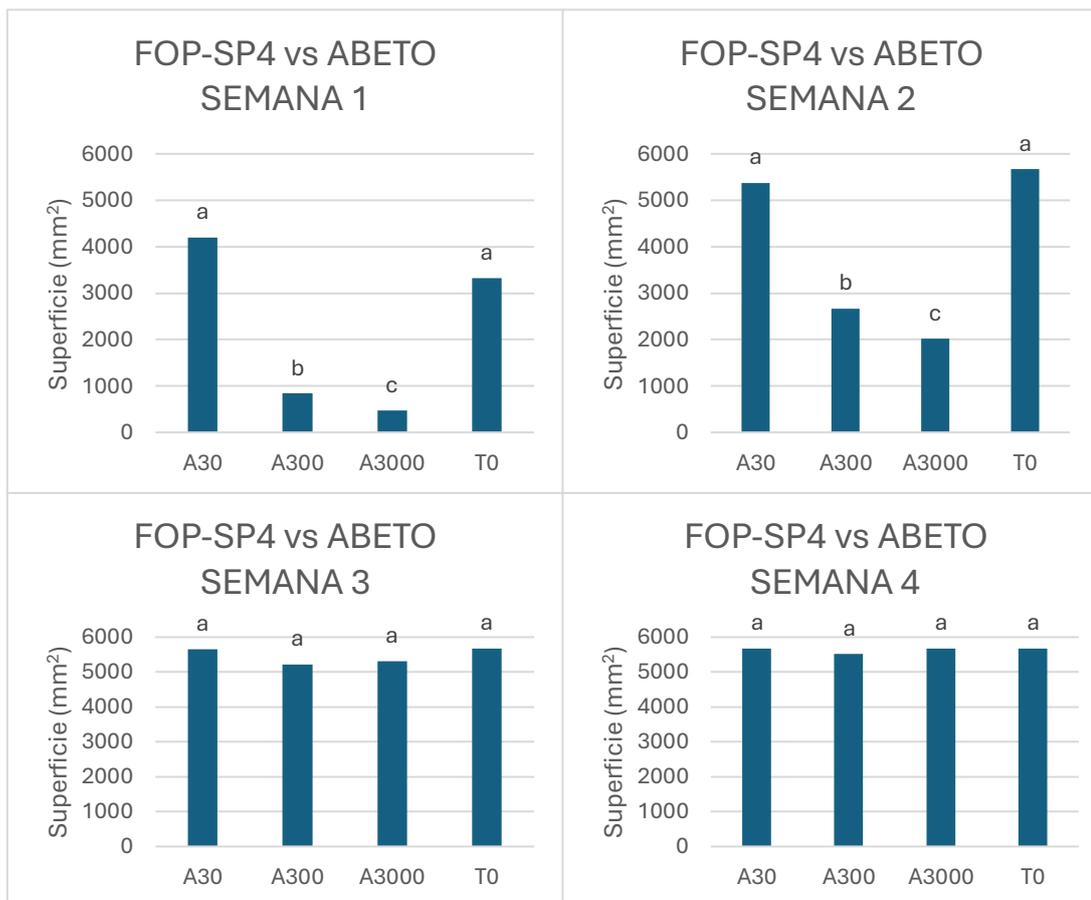


FIGURA 5.14. Crecimiento de FOP-SP4 con abeto (A) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (A30=30ppm, A300=300ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.3.2. FOP-SP4 vs cedro

Durante las dos primeras semanas de tratamiento las dosis de 300 ppm y 3000 ppm parecen tener mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo (Figura 5.15) que aparentemente disminuye en la tercera y casi desaparece en la cuarta.

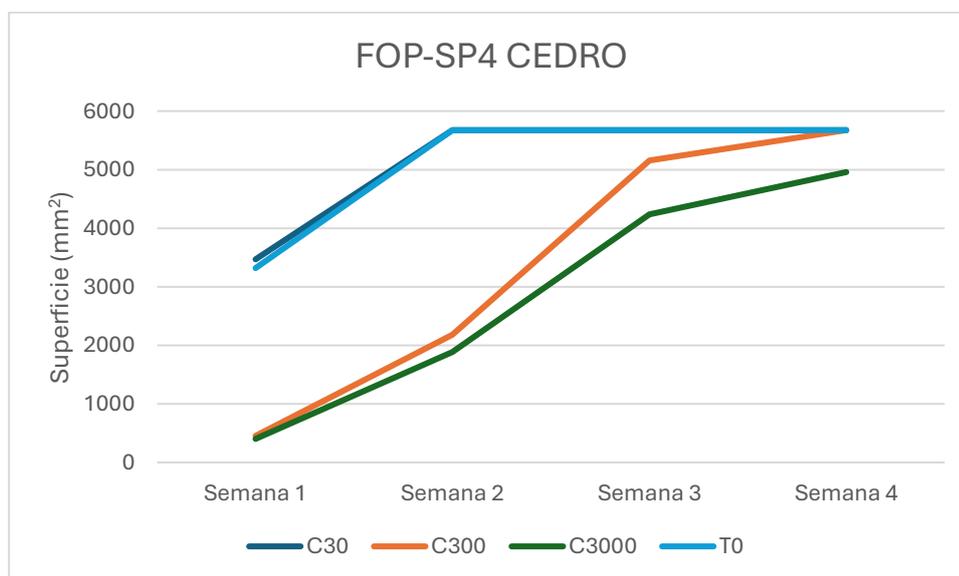


FIGURA 5.15. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP4 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (C30= 30 ppm, C300=300 ppm, C3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de cedro.

En la comparación por pares con el test U de Mann Whitney (Figura 5.16), los tratamientos efectivos en la inhibición del crecimiento del hongo son C300 y C3000 y se comportan por igual durante las dos primeras semanas. No hay diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con el control y la dosis más baja durante las dos primeras semanas y después desaparece. El tratamiento control y C30 no muestran diferencias entre sí.

Estudios como el de Mirasierra Velardo (2021), tampoco muestran diferencias significativas entre dichos tratamientos con aceite esencial de cedro al exponerlos frente a *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 y *Neofusicoccum parvum* BV-56 respectivamente. A partir de entonces se reduce el efecto antifúngico del aceite como ocurre en investigaciones previas (Mirasierra Velardo, 2021) aunque hay que señalar que *Phaemoniella* presenta un crecimiento más lento que *Fusarium*.

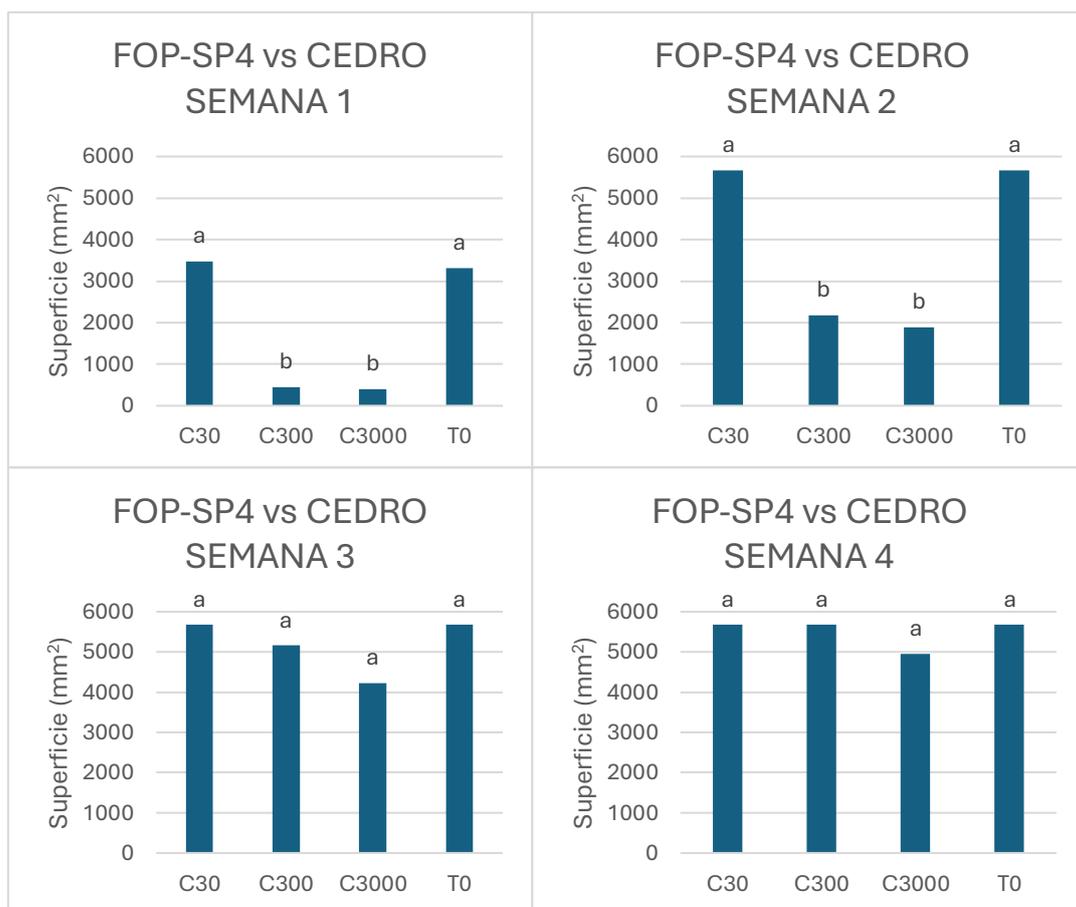


FIGURA 5.16. Crecimiento de FOP-SP4 con cedro (C) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (C30=30ppm, C300=300ppm, C3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.3.3. FOP-SP4 vs. pino

Durante las dos primeras semanas se aprecia un cambio significativo en el crecimiento del hongo al realizar los tratamientos con dosis 300 ppm y 3000 ppm. No se observan diferencias grandes entre el tratamiento control y el de dosis 30 ppm (Figura 5.17). A partir de la tercera semana todos los tratamientos discurren con valores casi idénticos.

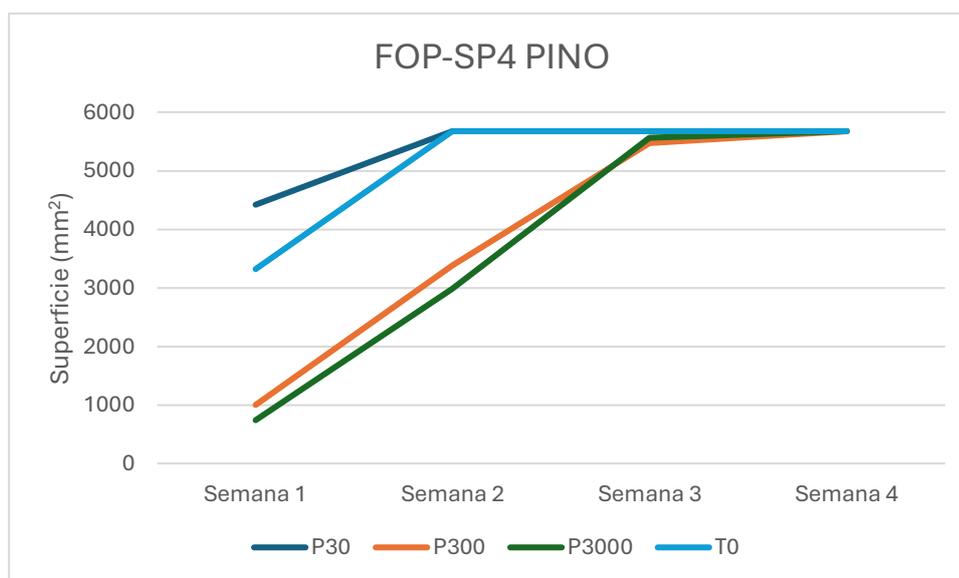


FIGURA 5.17. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP4 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (P30= 30 ppm, P300=300 ppm, P3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de pino.

Un aspecto a destacar de este tratamiento fue que, durante la primera semana, el tratamiento P30 sí mostró diferencias significativas respecto al control. Como en casos anteriores, los tratamientos P300 y P3000 son estadísticamente similares entre sí y muestran diferencias significativas con el resto hasta la semana 3, y a partir de entonces, pierden efecto antifúngico (Figura 5.18).

En trabajos como el de Mirasierra Velardo (2021) tampoco se observan diferencias significativas entre los tratamientos con aceite esencial de pino de 300 ppm y 3000 ppm respectivamente al aplicarlos frente a *Neofusicoccum parvum* BV-56 y *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 aunque sí tienen efecto antifúngico *in vitro*. El patógeno usado FOP-SP4 se trata de una cepa menos agresiva que FOP-SP1 y FOP-SP2 (Alves-Santos et al., 2002), por lo que quizá este sea el motivo por el que el aceite de pino a dosis bajas le haga efecto.

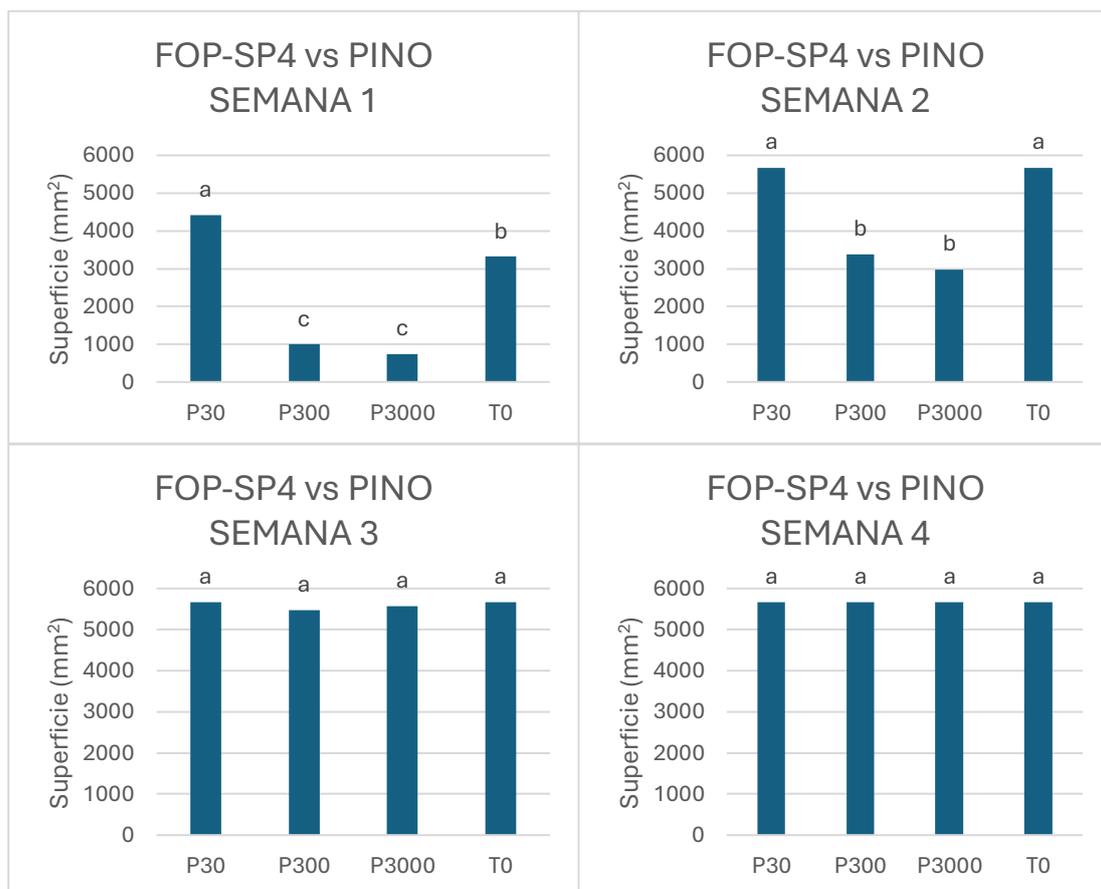


FIGURA 5.18. Crecimiento de FOP-SP4 con pino (P) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (P30=30ppm, P300=300ppm, P3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.4. FOP-SP5

Los resultados revelan fluctuaciones significativas en la eficacia de los tratamientos durante el transcurso del estudio. El aceite esencial mostró su máximo potencial inhibitorio durante las etapas iniciales del ensayo, sin embargo, hacia el final del período experimental se observó una ausencia total de propiedades antifúngicas (Tabla 5.5).

TABLA 5.5. . Resultados de los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis) de los tratamientos aplicados (aceites esenciales de abeto, cedro y pino en dosis de 30 ppm, 300 ppm, 3000 ppm y control) en cepa FOP-SP5 (H = estadístico de prueba, N = tamaño muestral, $p < 0,05$ = diferencias significativas).

| SEMANA 1 | |
|-----------------|---|
| FOP-SP5 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =27,60705 p =0,0011 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =0,0156 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =0,0156 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,842105 p =0,0200 |
| SEMANA 2 | |
| FOP-SP5 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =27,75061 p =0,0011 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,597610 p =0,0223 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,64940 p =0,0138 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =9,831341 p =0,0201 |
| SEMANA 3 | |
| FOP-SP5 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =19,96855 p =0,0181 |
| Abeto | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =5,300330 p =0,1511 |
| Cedro | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,73494 p =0,0132 |
| Pino | Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =3,000000 p =0,3916 |
| SEMANA 4 | |
| FOP-SP5 | Kruskal-Wallis test: H (9, N= 30) =12,60361 p =0,1814 |

5.1.4.1. FOP-SP5 vs. abeto

Durante las dos primeras semanas de tratamiento se diferencian del resto aquellos con dosis de 300 ppm y 3000 ppm que discurren prácticamente en paralelo (Figura 5.19).

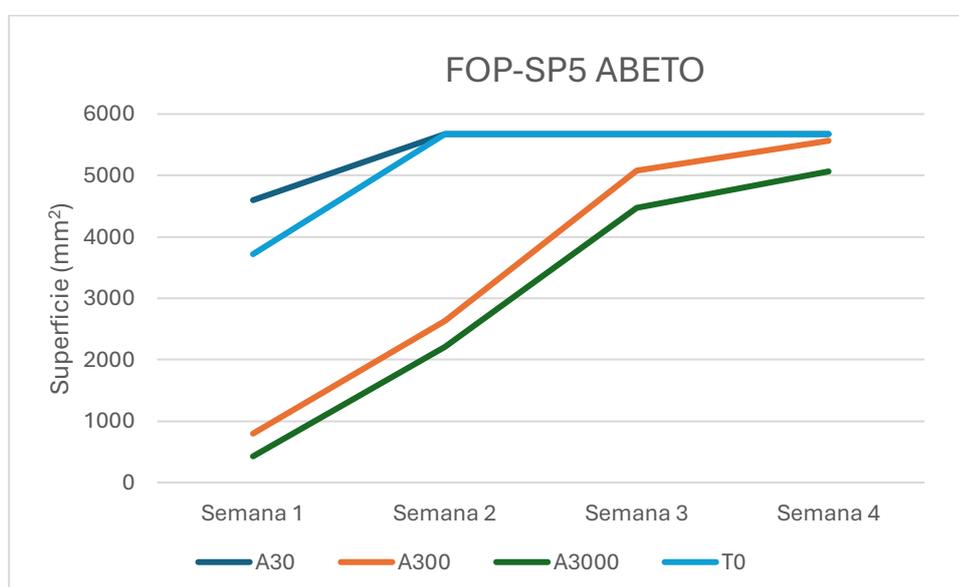


FIGURA 5.19. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP5 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (A30= 30 ppm, A300=300 ppm, A3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de abeto.

Durante la primera semana los tratamientos que muestran resultados favorables son A30, A300 y A3000, observándose diferencias significativas entre sí. En la semana 2 los tratamientos A300 y A3000 tienen el mismo efecto y se diferencian del resto. Finalmente, todos los tratamientos pierden su efecto inhibitorio de crecimiento del hongo a partir de la semana 3 (Figura 5.20).

Como en los casos previos y comparando con otros trabajos, se observa claramente lo expuesto por Ben-Jabeur, (2015) al tener diferenciación de tratamientos más marcada durante los siete primeros días. Se observa, además el efecto transitorio del aceite (Mirasierra Velardo, 2021) a medida que pasa el tiempo y el efecto dosis dependiente del mismo sobre el crecimiento del micelio (Barrena Necha & García Barrera, 2008).

Como se menciona anteriormente para FOP-SP4, al tratarse de una cepa de *Fusarium* f.sp. *oxysporum* poco virulenta, tratamientos de bajas dosis (A30) podrían tener efecto inhibitorio de crecimiento sobre el micelio, efecto no observado en otras cepas contempladas en el presente estudio (Alves-Santos, 2002). La diferenciación de esta dosis de aceite esencial

de abeto con los otros tratamientos se observa también frente a *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 (Mirasierra Velardo, 2021) donde se necesitan dosis más altas que con los otros aceites para alcanzar el efecto inhibitorio.

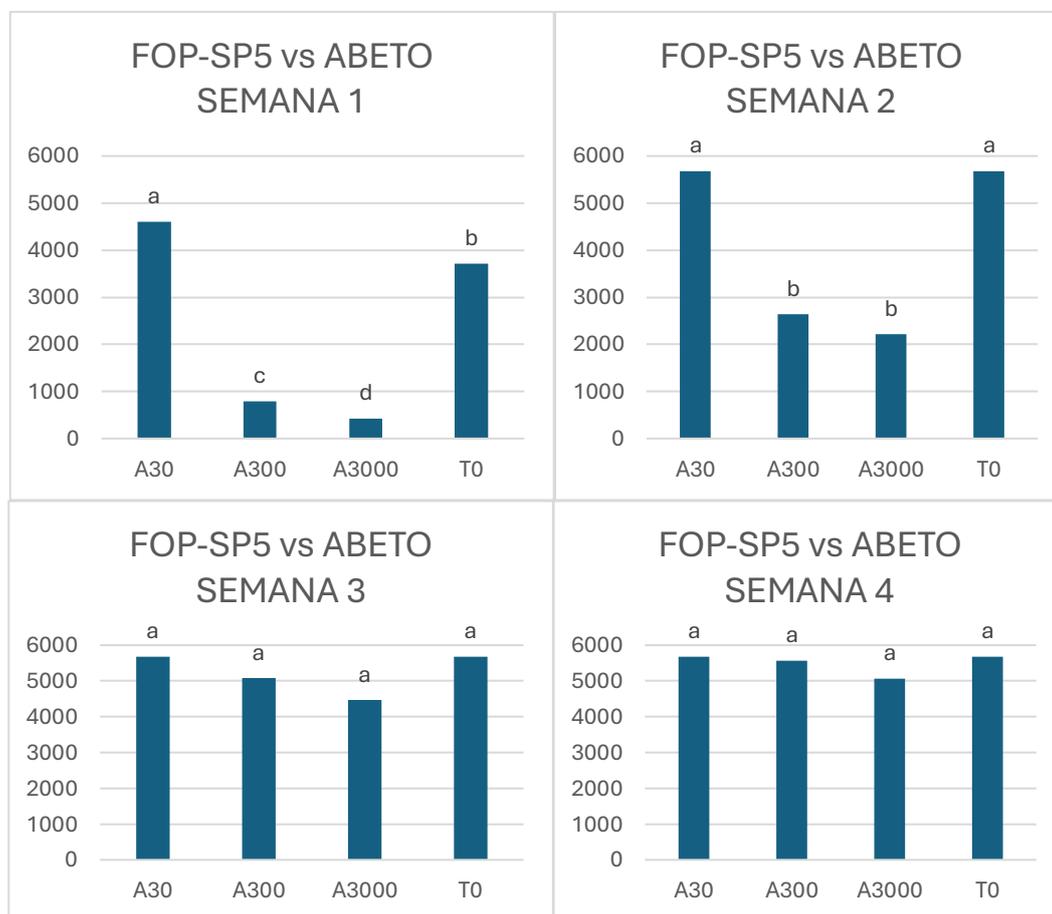


FIGURA 5.20. Crecimiento de FOP-SP5 con abeto (A) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (A30=30ppm, A300=300ppm, A3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

5.1.4.2. FOP-SP5 vs. cedro

Durante las primeras semanas se observa una diferencia entre los tratamientos aplicados a dosis de 300 ppm y 3000 ppm respecto al resto (Figura 5.21). No parece haber diferencias significativas entre el tratamiento control y el de dosis 30 ppm .

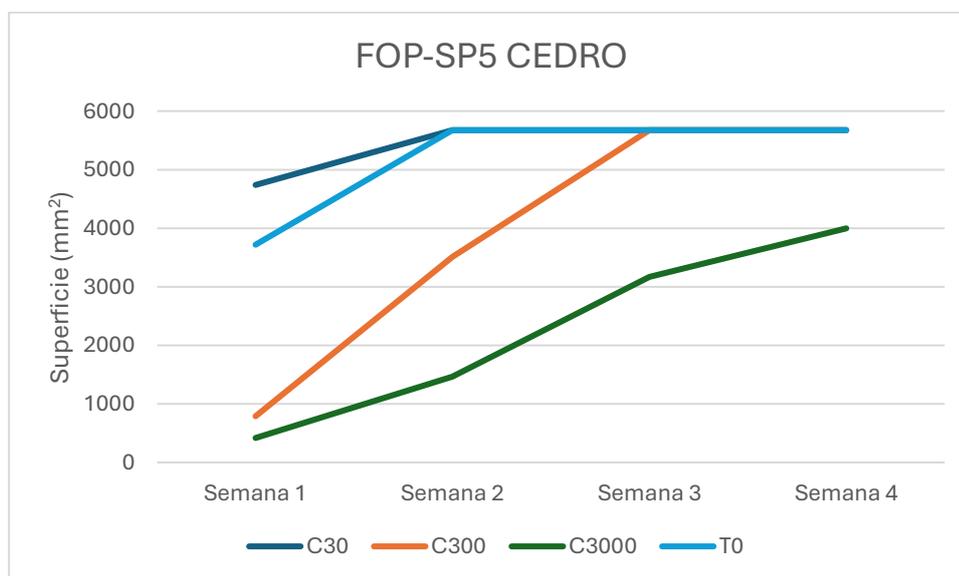


FIGURA 5.21. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP5 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (C30= 30 ppm, C300=300 ppm, C3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de cedro.

Aunque en la evolución semanal (Figura 5.21) aparentemente la dosis de 3000 mantiene crecimiento menor hasta el final no hay diferencia estadísticas que lo respalden (Figura 5.22). Durante la primera semana de tratamiento se observan diferencias significativas entre los tres tratamientos con aceite, siendo en orden descendente de efectividad el C3000, C300 y C30 respectivamente. En la semana 2, solo tienen un efecto sobre el crecimiento del hongo el C300 y C3000, observando diferencias entre sí y siendo más efectivo el C3000, para finalmente perder toda la actividad antifúngica en las siguientes semanas (Figura 5.22).

Se obtienen resultados similares a otros estudios en los que la efectividad de los aceites los primeros días es muy marcada (Ben-Jabeur, 2015) y dependiente de la dosis aplicada (Barrera Necha & García Barrera, 2008), aunque el efecto sobre patógenos de la madera es eficiente a 300 ppm (Mirasierra Velardo, 2021).

Como en el caso anterior, tratamientos de bajas dosis (C30) tienen efecto inhibitorio de crecimiento sobre el micelio que no hemos observado en cepas virulentas . *Phaemoniella*

chlamydospora PCH-33 frente a cedro muestra comportamiento similar con 30 ppm a los 30 días frente al control, pero es necesaria la dosis de 300 ppm a los 60 días para mantener el efecto (Mirasierra Velardo, 2021).

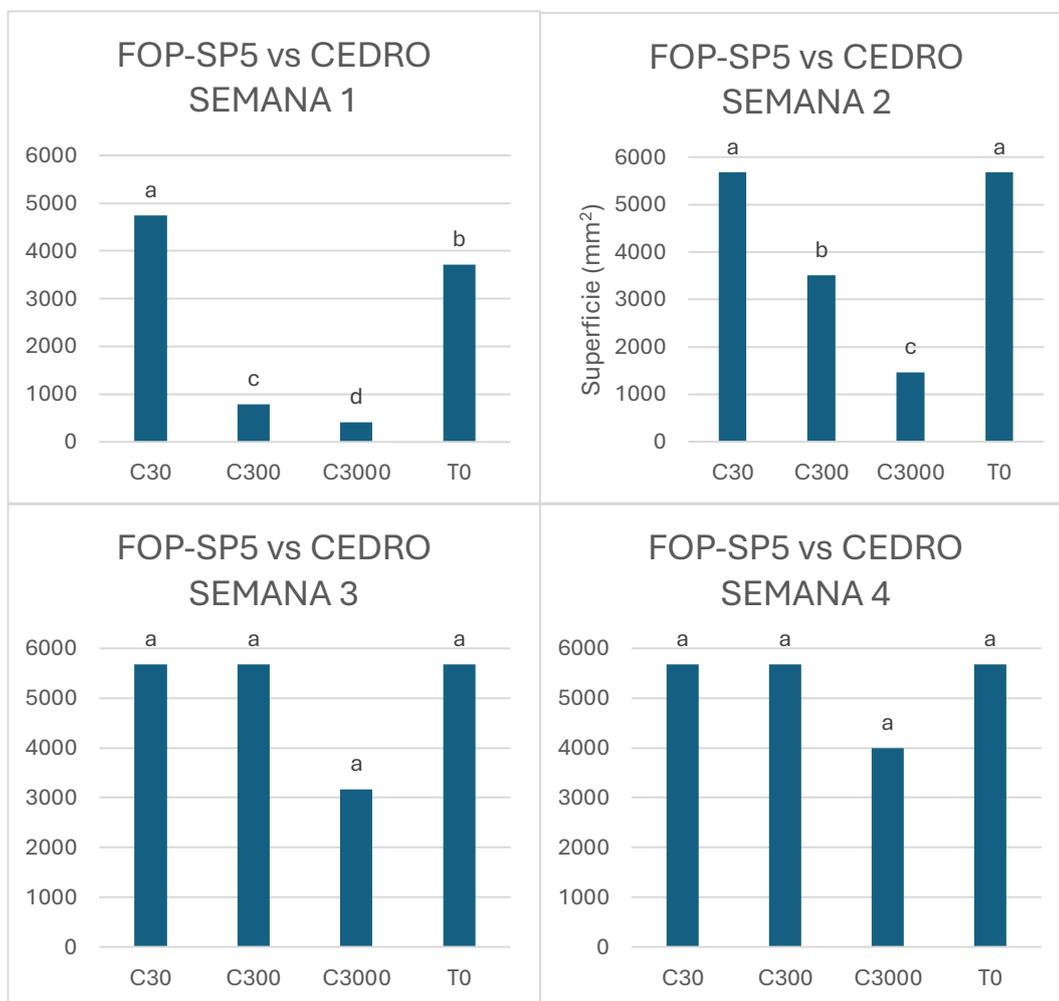


FIGURA 5.22. Crecimiento de FOP-SP5 con cedro (C) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (C30=30ppm, C300=300ppm, C3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p>0,05$).

5.1.4.3. FOP-SP5 vs. pino

Durante las primeras semanas de tratamiento se observa una diferencia significativa entre los tratamientos con dosis de 300 ppm y 3000 ppm frente al resto. Por otro lado, no se observan cambios significativos entre el tratamiento control y el de dosis 20 ppm (Figura 5.23).

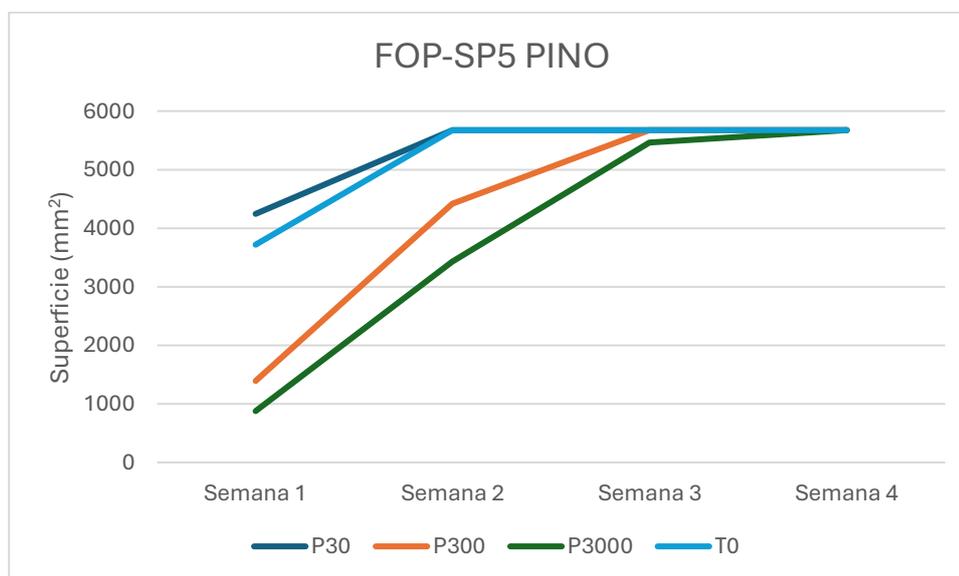


FIGURA 5.23. Evolución semanal de la proliferación de la cepa FOP-SP5 de *Fusarium oxysporum* frente a diferentes dosis de tratamiento (P30= 30 ppm, P300=300 ppm, P3000=3000ppm y T0=0ppm) con aceite esencial de pino.

Durante la primera semana se observan diferencias significativas entre P30, P300 y P3000, siendo más efectivo el P3000. Durante la segunda semana estos tratamientos son efectivos contra el crecimiento del hongo, pero no se observan diferencias entre sí. Finalmente pierden el efecto antifúngico a lo largo del tiempo (Figura 5.24).

Los resultados obtenidos muestran que la efectividad de los aceites esenciales es especialmente alta durante los primeros días de aplicación (Ben-Jabeur, 2015) y depende de la dosis utilizada (Barrera Necha & García Barrera, 2008), coincidiendo con estudios previos.

Además, el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo es transitorio y más evidente en cepas poco virulentas de *Fusarium oxysporum* como FOP-SP5 (Alves-Santos et al., 2002), donde incluso dosis bajas (P30) logran frenar el desarrollo micelial, algo que no suele observarse en cepas más agresivas. En trabajos como el de Mirasierra Velardo (2021) *Phaemoniella chlamydospora* PCH-33 muestra un comportamiento similar a los 60 días, diferenciándose el tratamiento C30 del control.

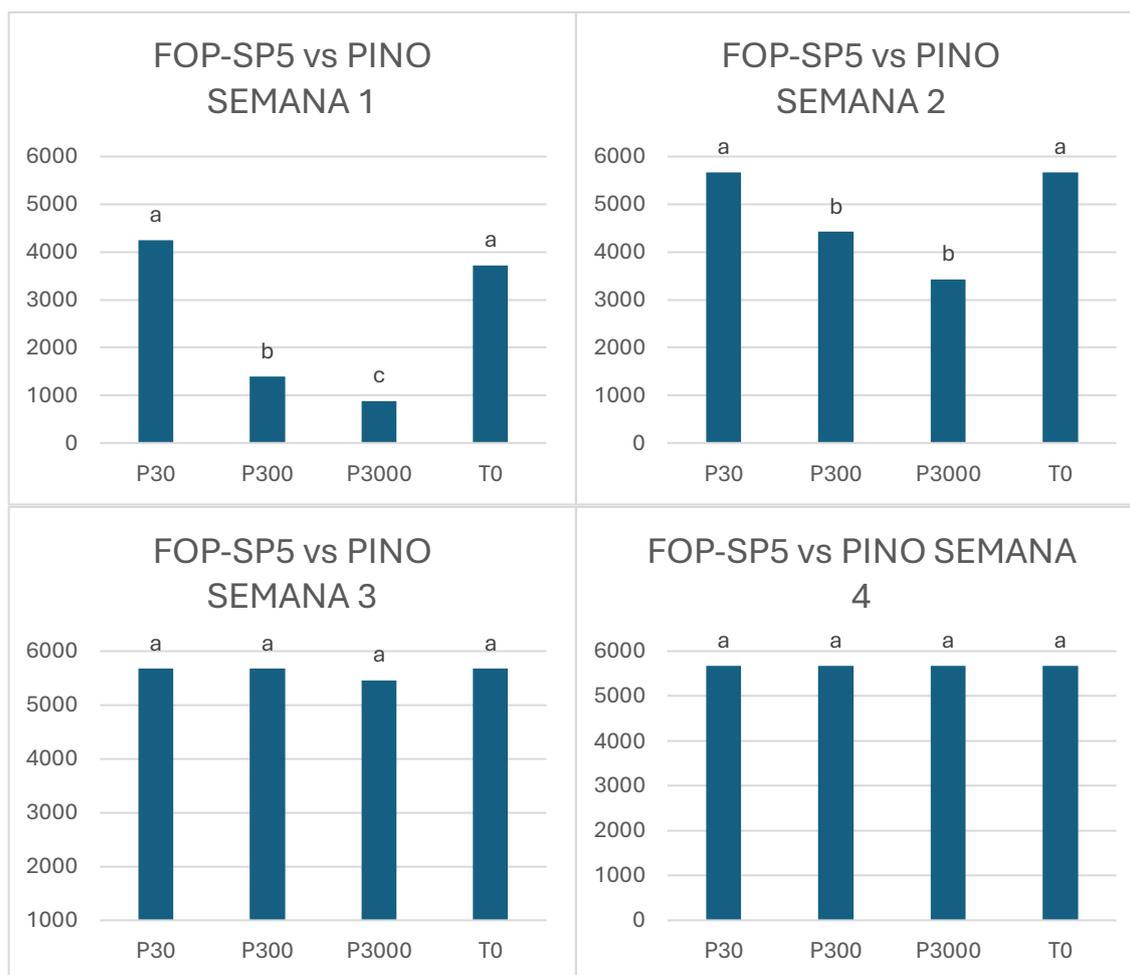


FIGURA 5.24. Crecimiento de FOP-SP5 con pino (P) a lo largo de cuatro semanas siendo tratado con diferentes dosis de aceites esenciales (P30=30ppm, P300=300ppm, P3000=3000 ppm y T0=0 ppm). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

Los resultados obtenidos con todos los patógenos FOP probados frente a estos tres aceites esenciales (abeto, cedro y pino) han sido muy diferentes a lo esperado ya que no tenían efecto a las cuatro semanas de crecimiento en medio artificial.

En otros trabajos como el que hemos mencionado varias veces de Mirasierra Velardo (2021) estos mismos aceites tuvieron un efecto duradero (hasta 60 días) frente a los patógenos de madera de la vid incluso en dosis bajas. El trabajo simultáneo que se ha realizado con canela y con uno de estos patógenos (FOP-SP1) también mostraba efectos inhibitorios a la cuarta semana de crecimiento en placa (Alves Santos, comunicación personal).

En el laboratorio se han realizado diferentes trabajos previos *in vitro* donde casi siempre se había encontrado un efecto inhibitorio estadísticamente significativo a las cuatro semanas.

En los trabajos donde se han incluido otras cepas no patogénicas de *Fusarium oxyporum* que se han aislado de los mismos cultivos que los patógenos (Alves-Santos, 1999), se han visto efectos inhibitorios de aceite esencial de canela a 30 ppm y 300 ppm (Sánchez et al., 2016), de clavo a 30 ppm (Villaolmillos et al., 2018), de citronela y sándalo a 1500 ppm (Arribas, 2018) y de los mismos a 600 ppm y 1200 ppm respectivamente (Novoa et al., 2018) y solamente falló en el efecto inhibitorio (en dosis de 3000 ppm) el aceite esencial de melisa (Arribas, 2018).

El efecto sobre los patógenos ensayados ha sido temporal, desapareciendo incluso en la tercera semana, por ello, los ensayos *in vivo* se han realizado añadiendo semanalmente el aceite esencial en vista del efecto poco perdurable e incluyendo el aceite esencial de canela que si había funcionado bien.

5.2. Análisis de inhibición de crecimiento de los hongos *in vivo*

Por lo general las dosis mayores (300 ppm y 3000 ppm) en el ensayo *in vitro* muestran una mayor inhibición del crecimiento y persistencia de la efectividad, evidenciando una relación dosis-respuesta donde concentraciones más altas prolongan el efecto inhibitorio. Esto sugiere la necesidad de replicación periódica mantener la actividad antifúngica. Es por ello que se aplican riegos semanales con el tratamiento antifúngico durante el ensayo *in vivo*.

El aceite esencial de canela muestra resultados prometedores en un ensayo paralelo (Alves Santos, comunicación personal), por lo que se decide incluirlo en este ensayo *in vivo*. Además, en estudios previos como el de Mirasierra Velardo (2021) muestra efecto inhibitorio

de crecimiento de hongos patógenos de la vid a dosis de 3000 ppm, lo que ofrece unas expectativas prometedoras al emplear este aceite esencial contra *Fusarium* f.sp. *oxysporum*.

En el análisis estadístico para valorar el efecto de los aceites contra el patógeno se observan diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5.6).

TABLA 5.6. Resultados de los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis) de los tratamientos aplicados (aceites esenciales de abeto, cedro, pino y canela en dosis de 3000-300 ppm y control) en cada cepa FOP-SP1 y FOP-SP5 respectivamente y ensayo sin patógeno (vacío) a los 30 días (H = estadístico de prueba, N = tamaño muestral, $p < 0,05$ = diferencias significativas).

| SEMANA 4 | |
|----------------------|---|
| VACÍO (sin patógeno) | Kruskal-Wallis test: H (4, N= 50) =21,40812 p =0,0003 |
| FOP-SP1 | Kruskal-Wallis test: H (4, N= 50) =12,46094 p =0,0142 |
| FOP-SP5 | Kruskal-Wallis test: H (4, N= 50) =15,87800 p =0,0032 |

Debido a los resultados obtenidos con Kruskal-Wallis (Tabla 5.6), para valorar individualmente los efectos de cada aceite se realiza el análisis de U-Mann Whitney (Figura 5.25) donde, según los resultados obtenidos, se deduce un efecto fitotóxico del aceite esencial.

Las plantas tratadas con aceite esencial e inoculadas con *Fusarium oxysporum* presentan valores de daños similares o superiores al control (FOP-SP5 y FOP-SP1, respectivamente), lo que respalda esta suposición. Esto se ve confirmado cuando realizamos un experimento control (sin patógeno) donde todas las plantas con aceite esencial presentan daños significativamente superiores al control (sin aceite y sin patógeno).

Según se observa en la Figura 5.25 los aceites de abeto, canela y pino parecen resultar menos dañinos para la planta que el de cedro, observándose diferencias significativas en la valoración de los daños en la planta. Los aceites esenciales de abeto, cedro, pino y canela contienen compuestos naturales con reconocida actividad fitotóxica y, de hecho, el aceite esencial de cedro puede suprimir la germinación y el desarrollo de diversas especies, incluidos cultivos como *Nicotiana tabacum* (planta de tabaco), especialmente cuando se aplica por riego o pulverización a determinadas dosis (Cuadrado San Miguel, S., 2022).

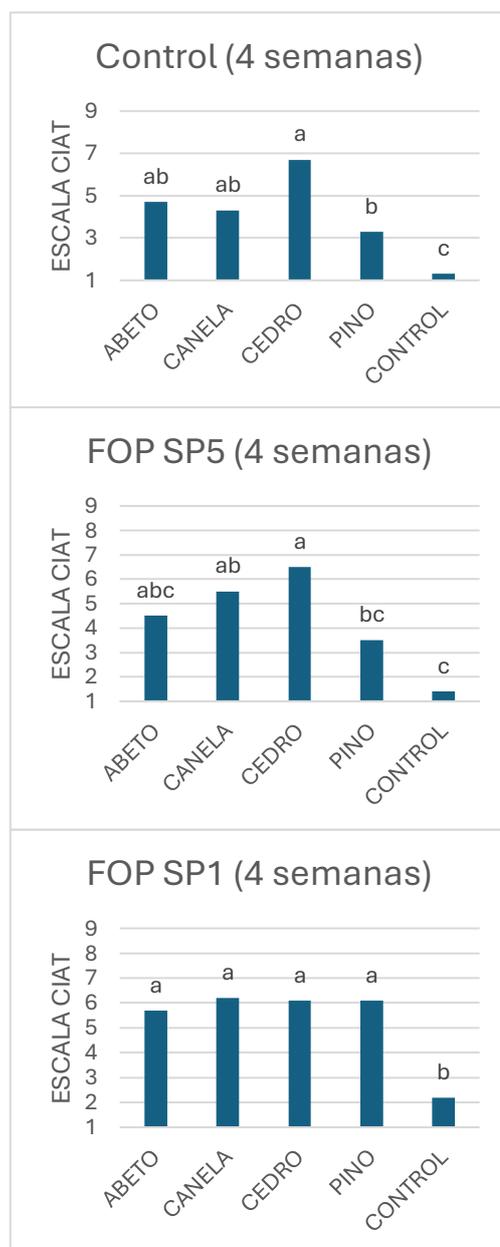


FIGURA 5.25. Crecimiento de FOP-SP5 y FOP-SP1 con diferentes aceites esenciales (abeto, canela, cedro y pino) mediante riego a una dosis de 300 ppm y con una muestra control. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney $p > 0,05$).

Una posible explicación para la fitotoxicidad observada con los aceites esenciales podría estar relacionada con el método de aplicación empleado y con las dosis usadas. Por ejemplo, investigaciones previas como la de Ben-Jabeur et al. (2015) demostraron eficacia en el control de fusariosis vascular del tomate cuando se aplica el aceite esencial de tomillo directamente en la raíz en cultivo hidropónico. En este caso, la dosis usada *in vivo* es la décima parte (1470 ppm) de la que determinaron eficiente *in vitro* (14.700 ppm) ya que esta concentración mostró efecto

fitotóxico. En otros trabajos, se han observado que el tratamiento de semillas de espinaca no se veía afectado con concentraciones de 3300 ppm de aceite esencial de tomillo y de 6600 ppm de aceite esencial de orégano que son las dosis que se aplicaron en semillas o en suelo y que se mostraron más o menos eficientes en la reducción de daños de algunas especies de *Fusarium* (Mirmajlessi et al., 2024).

Por otro lado, aplicaciones tipo “cubierta” sobre la semilla han mostrado que es posible mantener la germinación y, al mismo tiempo, inhibir la actividad fúngica, como lo reporta Ngoya et al. (2024) en un trabajo de fusariosis de judía. Para ello, usan una pasta de extractos de diversas plantas locales para recubrir las semillas (50% de extracto de planta seca) o aplicar foliarmente (10%) frente a una cepa de *Fusarium oxysporum* aislada de planta de judía, si bien esta no está claramente identificada como la forma especial *phaseoli*. En este caso, hay que decir que el preparado a partir de plantas es, evidentemente, menos tóxico que los aceites esenciales en los que los compuestos activos están muy concentrados. La comparación con los resultados obtenidos en este trabajo es difícil ya que el producto es diferente, el método de aplicación también, el patógeno no es claramente FOP (en su identificación molecular coincide con una cepa obtenida de tabaco) y el protocolo y escala usados no son los estándares para la fusariosis vascular de la judía (Pastor-Corrales y Abawi, 1987). A pesar de ello, podría ser interesante la idea de usar extractos vegetales en vez de aceites esenciales por su obtención más fácil y económica.

Los mismos patógenos FOP-SP1 y FOP-SP5, replicados de las mismas placas originales que el presente ensayo, fueron utilizados en las prácticas de la asignatura de Fitopatología varias semanas después con resultados algo más altos: $6,8 \pm 1,1$ para FOP-SP1 y $5,5 \pm 2,2$ para FOP-SP5 (Alves-Santos, F.M. comunicación personal). Estos datos han de tomarse con mucha cautela ya que los ensayos y las mediciones son realizadas por varias decenas de personas, lo que implica gran variabilidad. Hay que señalar que tampoco alcanzan los valores de los ensayos que se realizaron años atrás (Alves-Santos et al., 2002) y que resultaron entre 8,4 y 8,8 para FOP-SP1 y entre 5,6 y 7,3 para FOP-SP1 con distintas variedades de judía común. Puede que el largo período de conservación (más de 30 años guardados en glicerol al 25% a -80°C) haya mermado ciertas capacidades patogénicas.

A pesar de los reducidos daños, a partir de las plantas que fueron más afectadas por los patógenos se pudieron aislar los mismos, cumpliendo con los postulados de Koch.

El análisis correcto es el realizado de forma sincrónica donde todas las plantas y patógenos tienen las mismas condiciones y donde se manifiesta claramente un efecto fitotóxico de los aceites en relación con el control sin patógeno. Por otro lado, si comparamos en los ensayos con patógeno, con los datos recopilados en este trabajo se observa también un daño incrementado por los aceites y, aunque se usasen los otros datos de este año no se apreciaría efecto beneficioso en el control del hongo.

Finalmente, a la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, sería conveniente, una vez obtenidos los datos *in vitro*, evaluar dosis más reducidas que no den efectos fitotóxicos, aunque también habría que confirmar la viabilidad de los patógenos que en nuestros ensayos de patogenicidad tuvieron un comportamiento muy poco agresivo. Por otro lado, viendo el efecto fitotóxico puede ser interesante continuar en la línea de su uso como herbicidas (Cuadrado San Miguel, S. ,2022, Poveda et al.,2025).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los aceites esenciales de abeto, cedro y pino demostraron una capacidad antifúngica significativa frente a *Fusarium oxysporum* en ensayos *in vitro*, especialmente a concentraciones de 300 ppm y 3000 ppm para todas las cepas, con un efecto inhibitor más marcado durante las dos primeras semanas. Por otro lado, para cepas poco virulentas como FOP-SP5, dosis más bajas (30 ppm) tienen también efecto inhibitorio del crecimiento del hongo durante la primera semana. Todo esto lleva a la conclusión de que el efecto inhibitorio del aceite esencial sobre el crecimiento del hongo patógeno depende de la dosis aplicada y de la virulencia del mismo. Sin embargo, esta eficacia fue transitoria y desapareció hacia la cuarta semana, lo que sugiere que su acción es limitada en el tiempo, posiblemente por degradación de los compuestos activos o adaptación del hongo.

2. En los ensayos *in vivo*, la aplicación de estos aceites mediante riego no logró controlar eficazmente el patógeno y, además, provocó efectos fitotóxicos en las plantas de judía, especialmente con el aceite de cedro. Esto limita su uso directo en campo, por lo que se concluye que, aunque los aceites esenciales presentan potencial como agentes antifúngicos naturales, su aplicación práctica requiere optimización de dosis, formulaciones y métodos de aplicación para minimizar la fitotoxicidad y prolongar su efecto.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1991, Fitopatología, Edit. Limusa, Mexico
- Alves-Santos F.M. 1999. La Fusariosis de la Judía en Castilla y León: Caracterización Molecular y Diagnóstico de los Patógenos. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., & Díaz-Mínguez, J. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3335-3340.
- Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., Díaz-Mínguez, J. M., & Eslava, A. P. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology*, 51(2), 174-186.
- Alves-Santos, F.M. & Diez, J.J. Eds (2011). Control of Fusarium diseases. Kerala (India). Research Signpost. 254 pp
- Ancuceanu, R., Hovaneț, M. V., Miron, A., Anghel, A. I., & Dinu, M. (2023). Phytochemistry, biological, and pharmacological properties of *Abies alba* Mill. *Plants*, 12(15), 2860.
- Ares, D. A. (2014). *Detección de enfermedades virales en la judía (Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus coccineus L.) de El Barco de Ávila (IGP), mediante técnicas inmunoenzimáticas* [Trabajo de fin de grado]. Universidad de Salamanca. Repositorio Documental Gredos. <https://gredos.usal.es>
- Argotti Valencia, E. E. (2016). *Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico en Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli: El papel de las flavohemoglobinas* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. Repositorio Documental Gredos. <https://gredos.usal.es>
- Arribas, A. (2018). *Evaluación de aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrotrofos in vitro e in vivo*. UVaDoc: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/35324>

Avello Lorca, M., López Canales, C., Gatica Valenzuela, C., Bustos Concha, E., Brieva Chait, A., Pastene Navarrete, E., & Bittner Berner, M. (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 73-83.

Baker KF, Cook RJ (1974) *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. 432 pp.

Barbeito, M. P. (2009). *Mejora genética de poblaciones de judía verde (Phaseolus vulgaris L.) y su resistencia a las principales enfermedades* [Tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela. Repositorio institucional USC. <https://minerva.usc.es/>

Barrera Necha, L. L., & García Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica UDO Agrícola*, (1).

Ben-Jabeur, M., Ghabri, E., Myriam, M., & Hamada, W. (2015). Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.006>

Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., ... & Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), E788–E796. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1108973109>

Carlisle, A., & Brown, A. H. F. (1968). *Pinus sylvestris* L. *Journal of Ecology*, 56(1), 269-307.

Cerna-Chávez, E., Alejandro-Rojas, G., Ochoa-Fuentes, Y. M., Aguirre-Uribe, L., Landeros-Flores, J., & Hernández-Bautista, O. (2019). In vitro evaluation of active ingredients of botanical origin for the control of phytopathogenic fungi. *Scientia Fungorum*, 49, e1198.

Chaudhary, A. K., Ahmad, S., & Mazumder, A. (2011). Cedrus deodara (Roxb.) Loud.: a review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Pharmacognosy Journal*, 3(23), 12-17.

Cuadrado San Miguel, S. (2022). *Evaluación de aceites esenciales de cedro, abeto y pino como agentes de control biológico de malas hierbas* [Trabajo de fin de máster, Universidad de Valladolid]. UVaDOC. <https://uvadoc.uva.es>

Escudero Colomar, L. A. (2016). Métodos de control para *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae); una nueva plaga de frutales que se está extendiendo mundialmente. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 36(1), 19-31.

Feedtables.com. (s.f.). *Common bean | Tables of composition and nutritional values of feed materials*. <https://www.feedtables.com/content/common-bean>

García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., & Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 8-12

Gómez-Gómez, M., Danglot-Banck, C., & Vega-Franco, L. (2013). Cómo seleccionar una prueba estadística. *Revista Mexicana de Pediatría*, 80(1), 30-34.

Huong, L. T., Viet, N. T., Sam, L. N., Giang, C. N., Hung, N. H., Dai, D. N., & Ogunwande, I. A. (2021). Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas y tallos de *Amomum rubidum* Lamxay & NS Lý. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 20(1), 81-89.

Isman, M. B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19(2), 235-241.

Joshi, S., Parikshit, K., Prabha, P., & Sati, S. C. (2018). A comparative evaluation of Kumaun Himalayan gymnosperms for their antifungal potential against plant pathogenic fungi. *The Journal of Phytopharmacology*, 7(3), 230-241.

Judzentiene, A., & Kupcinskiene, E. (2008). Chemical composition of essential oils from needles of *Pinus sylvestris* L. grown in northern Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 26-29.

Kumar, S., Kumari, R., & Mishra, S. (2019). Pharmacological properties and their medicinal uses of Cinnamomum: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(12), 1735-1761.

Labra, R., & Torrecillas, C. (2014). Guía CERO para datos de panel. Un enfoque práctico. *UAM-Accenture Working Papers*, 16(1), 57.

Lengai, G. M., Muthomi, J. W., & Mbega, E. R. (2020). Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. *Scientific African*, 7, e00239.

Maina, P., Wachira, P., Okoth, S., & Kimenju, J. (2017). Cultural, morphological and pathogenic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* causing wilt in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Advances in Microbiology*, 2(4), 1-9.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (n.d.). *Leguminosas grano (garbanzos, lentejas, judías secas, vezas y yeros)*. Recuperado el 17/04/2025 https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/leguminosas_grano.aspx

Mirasierra Velardo, R. (2021). *Control biológico in vitro de hongos patógenos de madera de vid mediante el uso de aceites esenciales* [Trabajo de fin de grado, Universidad de Valladolid]. UVaDOC. <https://uvadoc.uva.es>

Mirmajlessi, M., Najdabbasi, N., Sigillo, L., & Haesaert, G. (2024). An implementation framework for evaluating the biocidal potential of essential oils in controlling Fusarium wilt in spinach: from in vitro to in planta. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1444195. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1444195>

Narváez, S. (2006). Evaluación del efecto antifúngico In Vitro del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Loja]. *INNOVA Research Journal*, 3(2.1), 52–58. <https://doi.org/10.33890/innova.v3.n2.1.2018.667>

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.

Ngoya, Z. J., Mkindi, A. G., Vanek, S. J., Stevenson, P. C., Ndakidemi, P. A., & Belmain, S. R. (2024). Pesticidal plant treatments combined with improved soil fertility can reduce damage caused by Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) and bean fly (*Ophiomyia phaseoli*) in common bean production (*Phaseolus vulgaris* L.). *Sustainability*, 16(11), 4866. <https://doi.org/10.3390/su16114866>

Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M. R., Benito, E. P., & Díaz-Mínguez, J. M. (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 234.

Novoa Bueno, M., Mediavilla Estébanez, P., & Alves-Santos, F. M. (2018). Evaluación in vitro e in vivo (uva) de aceites esenciales (canela, clavo, citronela y sándalo) para control biológico de hongos oportunista. XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Toledo <http://sef.es/sites/default/files/2018-10/sef2018.pdf>

Odoi, B., Samita, S., Al-Hassan, S., & Twumasi-Ankrah, S. (2019). Efficiency of Bartlett and Levenes tests for testing homogeneity of variance under varying number of replicates and groups in one-way ANOVA. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(12), 1219-1223.

Organización Internacional de Normalización. (2013). *ISO 9235:2013 - Aceites esenciales: Nomenclatura*. ISO.

Paredes, M. C., Becerra, V. V., & Tay, J. U. (2009). Inorganic nutritional composition of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes race Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4), 486–495. <https://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v69n4/AT02.pdf>

Pastor-Corrales, M. A., & Abawi, G. S. (1987). Reactions of selected bean germplasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease*, 71(11), 990-993.

Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000-1007.

Poveda, J., Víttores, D., Sánchez-Gómez, T., Santamaría, O., Velasco, P., Zunzunegui, I., Rodríguez, V.M., Herrero, B., Martín-García, J. (2025). Use of by-products from the industrial distillation of lavandin (*Lavandula x intermedia*) essential oil as effective

bioherbicides, *Journal of Environmental Management*, Volume 373, January 2025, 123723, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.123723>.

Real Decreto 1311/2012 de 14 de septiembre. BOE núm. 223, de 15 de septiembre de 2012, páginas 65127 a 65171.

Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57, 405-424.

Salgado, M. O., & Schwartz, H. F. (1993). Physiological specialization and effects of inoculum concentration of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on common beans. *Plant Disease*, 77(5), 492-496.

Sepúlveda, G. (n.d.). *Aspectos generales de los virus de las plantas*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <https://biblioteca.inia.cl/>

Shakhmatov, E. G., Udoratina, E. V., Atukmaev, K. V., & Makarova, E. N. (2015). Extraction and structural characteristics of pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L. *Carbohydrate Polymers*, 123, 228-236.

Singh, S. (2013). The nutritional value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its benefits for human health: A review. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(8), 18–20. <https://www.isca.in/IJBS/Archive/v2/i8/12.ISCA-IRJBS-2013-031.pdf>

StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com

Thakur, S., Walia, B., & Chaudhary, G. (2021). Dalchini (*Cinnamomum zeylanicum*): a versatile spice with significant therapeutic potential: *Cinnamomum zeylanicum*. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 9(2), 126-136.

Tomlekova, N., Idziak-Helmcke, D., Franke, P., Rojek-Jelonek, M., & Kwasniewska, J. (2023). *Phaseolus vulgaris* mutants reveal variation in the nuclear genome. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1308830. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1308830>

Trombino, S., Cassano, R., & Procopio, A. (2022). Role of *Phaseolus vulgaris* L. in the prevention of cardiovascular diseases. *Nutrients*, 14(2), 295. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8779353/>

Villaolmillos Abarquero, C., Santamaria Cantero, R., Arribas Fernandez, A. M., & Alves Santos, F. M. (2018). Evaluación de aceite esencial de clavo frente a *Fusarium oxysporum* (in vitro) y de aceite esencial de canela en planta de judía frente a hongos oportunistas. XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Toledo <http://sef.es/sites/default/files/2018-10/sef2018.pdf>

Zhang, J., Zhao, Z., Liang, W., Bi, J., Zheng, Y., Gu, X., & Fang, H. (2022). Essential oil from *Sabina chinensis* leaves: A promising green control agent against *Fusarium* sp. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1006303.