

Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals

Efecto de aceites naturales contra *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones *in vitro* y detección de fitoquímicos activos

Eduardo Gutiérrez-Jiménez, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Chapingo, Estado de México; **Aurelio Pedroza-Sandoval***, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas, Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez Km 40, CP. 35230, Bermejillo, Durango; **Luciano Martínez-Bolaños**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Sur Sureste, Km 7 Carretera Teapa - Vicente Guerrero, CP. 86800, Teapa, Tabasco; **José Alfredo Samaniego-Gaxiola**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Blvd. José Santos Valdéz No. 1200, Centro, CP. 27440, Matamoros, Coahuila; **Fabián García-González**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. Km 40 Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez, CP. 35230, Bermejillo, Durango. *Autor para correspondencia: apedroza@chapingo.uruz.edu.mx.

Recibido: 25 de Julio, 2017.

Aceptado: 19 de Octubre, 2017.

Gutiérrez-Jiménez E, Pedroza-Sandoval A, Martínez-Bolaños L, Samaniego-Gaxiola JA, García-González F. 2017. Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1) 141-150.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-4

Primera publicación DOI: 04 de Noviembre, 2017.

First DOI publication: November 04, 2017.

Resumen. El control químico de la sigatoka negra en banano *Mycosphaerella fijiensis* ha incrementado la presión de selección en el patógeno, con el consecuente impacto en el ambiente. El objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de los aceites esenciales de *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*,

Abstract. Chemical control of black sigatoka in banana *Mycosphaerella fijiensis* has increased the selection pressure on the pathogen, a fact which in turn creates an environmental impact. The objective of this study was to evaluate the effect of essential *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana*, and *Origanum majorana* oils on *M. fijiensis* growth under *in vitro* conditions, and to identify their active metabolites. The oils were obtained by hydrodistillation. *M. fijiensis* was isolated and developed on PDA culture medium. Thin layer chromatography (TLC) and column chromatography (CC) were used to identify the metabolites of each essential oil. Five concentrations: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm of each oil were used. *P. dioica*, *C. zeylanicum* and *O. vulgare* oils had a significant effect with lower *M. fijiensis* mycelial growth at a concentration of

Origanum vulgare, *Artemisia ludoviciana* y *Origanum majorana*, en el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* e identificar sus metabolitos activos. Los aceites se obtuvieron mediante el método de hidrodestilación. El patógeno se aisló y desarrolló en medio de cultivo PDA. Se usaron cinco concentraciones: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm de cada aceite. Para identificar los metabolitos de cada uno de los aceites esenciales, se usó cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC). Los aceites de *P. dioica*, *C. zeylanicum*, *O. vulgare* presentaron menor crecimiento micelial de *M. fijiensis* a una concentración de 500 ppm; mientras que *O. majorana* y *A. ludoviciana* a 1000 ppm. El aldehído cinámico fue el principal metabolito detectado en la especie *C. zeylanicum*; el eugenol y carvacrol, en las especies *P. dioica* y *O. vulgare*.

Palabras clave: extractos vegetales, metabolitos secundarios, inhibición fúngica, control biológico.

El uso de plaguicidas en la agricultura, es una herramienta que permite alcanzar los objetivos de productividad y sustentabilidad si se combina con tecnologías adecuadas de manejo (Wheeler, 2002). Esto es necesario porque la mayoría de los microorganismo fitopatógenos han generado resistencia a los ingredientes activos de los fungicidas químicos (Chávez-Solís *et al.*, 2014). Una alternativa eficiente y económica para el control de enfermedades es el uso de extractos de plantas que tengan propiedades fungicidas (Guerrero *et al.*, 2007). Los extractos vegetales y aceites esenciales, son biodegradables con un impacto negativo menor en el ambiente (Bravo *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, se ha incrementado el interés por el uso de aceites esenciales de especias y otras plantas como antimicrobianos naturales en alimentos y cultivos agrícolas (Celis *et al.*, 2012). Lambert *et al.* (2001),

500 ppm, whereas the effect on *O. majorana* and *A. ludoviciana* was observed at a concentration of 1000 ppm. Cinnamic aldehyde was the main metabolite detected in *C. zeylanicum* species, and eugenol and carvacrol in *P. dioica* y *O. vulgare* species.

Key words: plants extract, secondary metabolites, fungi inhibition, biological control.

The use of chemicals to control crop pests is a useful tool to fulfill productivity and sustainability objectives, provided that such tool is combined with proper management technologies (Wheeler, 2002). This is necessary because most of the phytopathogen microorganisms have become resistant to active ingredients of chemical fungicides (Chávez-Solís *et al.*, 2014). An efficient and inexpensive alternative for controlling diseases is the use of plant extracts with fungicidal properties (Guerrero *et al.*, 2007). Plant extracts and essential oils are biodegradable and have a limited environmental impact (Bravo *et al.*, 2000). Based on this, there is an increased interest in using essential spice and other plants oils as natural antimicrobials in food and agricultural crops (Celis *et al.*, 2012). Lambert *et al.* (2001) state that nowadays there is an increasing demand to precisely obtain the values of the inhibitory minimum concentration (CMI) of diverse essential oils so as to achieve a balance between sensory acceptance and antimicrobial effectiveness, which can be attained by conducting *in vitro* and *in vivo* studies.

In Mexico, the most used fungicides against *M. fijiensis* are: mancozeb and chlorothalonil, as well as systemic ingredients from the groups of benzimidazoles, triazoles, strobirulins and anilopyrimidines (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012). Chemical management of black sigatoka requires

señalan que existe actualmente una demanda creciente por obtener en forma precisa los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos aceites esenciales, con la finalidad de obtener un balance entre la aceptación sensorial y la eficacia antimicrobiana, lo cual puede lograrse mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

En México, los fungicidas más usados contra *M. fijiensis* son: mancozeb y clorotalonil e ingredientes sistémicos de los grupos benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas, y anilopirimidinas (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012). El manejo químico de la sigatoka negra requiere de 10 a 45 aplicaciones de fungicidas por año, principalmente de mancozeb, propiconazol y tridemorf, con el consecuente riesgo de desarrollo de resistencia del patógeno a estos fungicidas (Mena-Espino y Couoh-Uicab, 2015). El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica de diferentes aceites esenciales extraídos de plantas nativas, sobre el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* y la identificación de los principales compuestos químicos activos.

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de hojas de momo (*Piper auritum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), mejorana (*Origanum majorana*), y frutos de pimienta (*Pimenta dioica*) y clavo (*Syzygium aromaticum*). Las muestras vegetales fueron colectadas en los Municipios de Teapa, Tabasco y Pichucalco, Chiapas, México. El material se secó bajo sombra y se trituró en molino manual. El polvo resultante se sometió a un proceso de hidrodestilación por dos horas en una proporción de 30 g en 500 ml de agua (Domínguez, 1979) y el aceite fue capturado mediante uso de un aparato tipo Clevenger (Muñoz *et al.*, 2001). El aceite se conservó en frascos color ámbar bajo refrigeración.

Mycosphaerella fijiensis fue aislado directamente de tejido infectado a partir de plantas enfer-

from 10 to 45 fungicide applications per year (mainly mancozeb, propiconazole and tridemorph), but there is the risk that the pathogen may develop resistance to those fungicides (Mena-Espino and Couoh-Uicab, 2015). The objective of this study was to evaluate the biological effectiveness of different essential oils extracted from native plants on *M. fijiensis* mycelial growth under *in vitro* conditions, and identify their main active chemical compounds.

Essential oils were obtained from momo (*Piper auritum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), oregano (*Origanum vulgare*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), marjoram (*Origanum majorana*) leaves, and pepper (*Pimenta dioica*) and clove (*Syzygium aromaticum*) fruits. Plant samples were collected in the municipalities of Teapa, Tabasco, and Pichucalco, Chiapas, Mexico. The samples were dried under shade and grinded using a manual mill. The obtained powder was subjected to hydrodistillation for two hours in a proportion of 30 g in 500 ml of water (Domínguez, 1979), and the oil was collected using a Clevenger-type equipment (Muñoz *et al.*, 2001). The oil was poured in amber jars and kept in refrigeration.

Mycosphaerella fijiensis was directly isolated from infected tissue from infected banana plants collected at the producing zones of the municipalities of Teapa, Tabasco. Bits of around 1 cm² from diseased-plant tissue were cut and stuck to filter paper discs. The infected tissue was superficially disinfected in a 3% hypochlorite solution and then washed three times with distilled water. The discs were placed on Petri dish covers that contained solid culture medium (agar-water). Three days after the fungus started to grow, it was transferred to PDA culture medium for development (Stover, 1963).

Different concentrations of each oil were prepared in assay tubes with 10 mL of sterile

mas de banano colectadas en las zonas productoras del Municipio de Teapa, Tabasco. Se cortaron trozos de tejido vegetal enfermo de aproximadamente 1 cm² y se pegaron a discos de papel filtro. El material enfermo se desinfectó superficialmente en una solución de hipoclorito al 3% y posteriormente se lavó por triplicado con agua destilada. Los discos se colocaron en la tapa de placas Petri con medio de cultivo sólido (Agar-Agua). A los tres días de crecimiento del hongo, éste se transfirió a medio de cultivo PDA para su desarrollo (Stover, 1963).

Se prepararon las diferentes concentraciones de cada aceite vegetal: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm, en tubos de ensaye con 10 mL de agua destilada estéril. El contenido de cada tubo se mezcló en matraces con medio PDA (30 mL) y a continuación el contenido de cada matraz se distribuyó en cuatro placas Petri (10 mL). Como testigo se utilizaron placas PDA sin tratamiento. Los aceites esenciales extraídos de siete especies vegetales fueron evaluados en las cinco concentraciones, excepto *S. aromaticum*, el cual no fue evaluado a la concentración de 50 ppm. Para la inoculación, a partir del medio de cultivo con la cepa de *M. fijiensis*, se cortaron pequeños discos de 0.4 mm² aproximadamente y se colocaron al centro de cada placa Petri.

Se usó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, donde los tratamientos fueron las cinco concentraciones de cada aceite vegetal, más un testigo absoluto (PDA).

Las variables medidas fueron el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y el propio crecimiento de *M. fijiensis*. Para evaluar la eficacia de los tratamientos, se midió el desarrollo de la colonia fúngica (mm) hasta que las cajas Petri del testigo estuvieron completamente cubiertas con micelio. El PICR se calculó con la fórmula:

$$PICR(\%) = \left(\frac{RC - RT}{RC} \right) 100$$

distilled water: 50, 100, 500, 1000 and 5000 ppm. The content of each tube was mixed in flasks containing PDA medium (30 mL) and then the content of each flask was distributed among four Petri dishes (10 mL). PDA plates without treatment were used as control. Essential oils extracted from seven plant species were evaluated at the five concentrations (50, 100, 500, 1000 and 5000 ppm), except for *S. aromaticum* that was not evaluated at the concentration of 50 ppm. For inoculation, small discs of around 0.4 mm² from the culture medium containing the *M. fijiensis* isolate were cut and placed in the middle of each Petri dish.

In this study, a completely randomized design with four replications was used, where the treatments were the five concentrations of each plant oil plus an absolute control (PDA).

The measured variables were the percentage of radial growth inhibition (PICR) as well as that of *M. fijiensis* own growth. To evaluate the efficacy of the treatments, the fungal colony development was measured (in mm) until the Petri dishes containing the control were completely covered with mycelium. The PICR was calculated according to the following formula:

$$PICR(\%) = \left(\frac{RC - RT}{RC} \right) 100$$

where *RC*= mycelium radius in the control, and *RT*= mycelium radius in the treatments.

Data were analyzed using the SAS version 9.0 software. To determine the effect of the treatment, a variance analysis and Tukey's multiple range test of means were carried out.

After the antifungal activity of the plant oils ended, those showing the highest biological activity were selected to know their approximate chemical composition using the thin-layer

donde RC = radio del micelio en el testigo y RT = radio del micelio en los tratamientos.

Los datos fueron analizados con el programa SAS, versión 9.0. Se realizó un análisis de varianza y prueba de rango múltiple de medias Tukey, para identificar el efecto de tratamiento.

Después de determinar la actividad antifúngica de los aceites vegetales, se eligieron aquéllos que mostraron la mayor actividad biológica, para conocer su composición química aproximada, aplicando las técnicas cromatografía en capa fina (CCF) (Randerath, 1970) y cromatografía en columna (CC) (Abbot y Andrews, 1970). Previo a la cromatografía, se revisó la literatura para tener referencia del tipo de metabolitos presentes en los extractos crudos obtenidos y su actividad biológica, con lo cual se efectuó la relación correspondiente con los resultados de fitoquímicos identificados en este estudio.

De acuerdo al porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y el crecimiento del micelio de *M. fijiensis*, los aceites de mejor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, fueron los extraídos de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* y *P. dioica*, con efecto inhibitorio a partir de la dosis de 100 ppm, con valores de 90.5, 71.5 y 58%, de inhibición, respectivamente; a una concentración de 500 ppm, la inhibición fue del 100 %. Los otros aceites registraron valores menores: *S. aromaticum* 10.5%, *P. auritum* 22.5%, *A. ludoviciana* 38% y *O. majorana* 45.9%. Los aceites de *A. ludoviciana* y *O. majorana*, mostraron efecto inhibitorio significativo a una concentración de 1000 y 5000 ppm. *S. aromaticum* no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el hongo (Cuadro 1).

El primer día de exposición, los aceites de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* y *P. dioica* a una dosis de 100 ppm, registraron un 100% PICR, con nulo crecimiento de *M. fijiensis* y este mismo efecto se

chromatography (CCF) (Randerath, 1970) and column chromatography (CC) techniques (Abbot and Andrews, 1970). Before using chromatography, the literature was reviewed to know what type of metabolites were present in the raw extracts obtained, as well as their biological activity, and then the corresponding relation was established with the phytochemical results achieved in this study.

According to the percentage of *M. fijiensis* radial growth inhibition (RGI) and mycelial growth, the oils with the best inhibitory effect on *Mycosphaerella fijiensis* development were those extracted from *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica*, whose inhibitory effect was observed at a dose of 100 ppm, with inhibition values of 90.5, 71.5 and 58%, respectively. When the oils were used at a concentration of 500 ppm, 100% inhibition was achieved. The other oils showed lower values: *S. aromaticum*: 10.5%, *P. auritum*: 22.5%, *A. ludoviciana*: 38% and *O. majorana*: 45.9%. *A. ludoviciana* and *O. majorana* oils had a significant inhibitory effect at a concentration of 1000 and 5000 ppm. *S. aromaticum* did not show any inhibitory effect on the fungus (Table 1).

On the first day of exposure, *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica* oils at a dose of 100 ppm showed 100% PICR with no *M. fijiensis* growth. The same effect lasted up to three days when essential *C. zeylanicum* oil was used. On day five of exposure, the same oils showed minimum *M. fijiensis* mycelial growth, with values from 2 to 9 mm (Figure 1A), but when the three oils were used at a concentration of 500 ppm, fungal growth inhibition was 100% (Figure 1B).

The antifungal capacity of the essential *C. zeylanicum* oil partially coincides with that reported by Barrera and García (2008), who found a growth inhibitory effect of 70% in *Fusarium* spp isolated from papaya at a concentration of

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *Mycosphaerella fijiensis* por efecto de los aceites esenciales, cinco días después de la inoculación.
Table 1. Percentage of radial growth inhibition (PRGI) of *Mycosphaerella fijiensis* by the effect of essential oils five days after inoculation.

Especie	Concentración (ppm)					
	Control	50	100	500	1000	5000
<i>Origanum vulgare</i>	0 D	23 C b	71.5 B b	100 A a	100 A a	100 A a
<i>Artemisia ludoviciana</i>	0 D	13.5 C c	17 C e	38 B cd	100 A a	100 A a
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0 D	32.5 C a	90.5 B a	100 A a	100 A a	100 A a
<i>Piper auritum</i>	0 D	9.5 D cd	8.5 D ef	22.5 C def	49.5 B c	90.0 A a
<i>Pimenta dioica</i>	0 D	14.5 C bc	58 B c	100 A a	100 A a	100 A a
<i>Syzygium aromaticum</i>	0 A	3.5 A de	10.5 A ef	10.5 A efg	10 A de	10.5 A c
<i>Origanum majorana</i>	0 D	-----	36.9 C d	45.9 B c	94.7 A a	98.0 A a
Control	----	0 f	0 f	0 g	0 e	0 d

Cifras con la misma letra en las filas no son estadísticamente diferentes (Pruebas de agrupamiento Tukey, $p \leq 0.01$). Letras mayúsculas: agrupamiento entre concentraciones por cada aceite (fila). Letras minúsculas: agrupamiento entre concentraciones entre aceites (columna) / Figures with the same letter in the rows are not statistically different (Tukey's grouping test, $p \leq 0.01$). Capital letters: grouping among concentration of each oil (row). Lowercase letters: grouping among oil concentrations (column).

prolongó hasta los tres días con el aceite esencial de *C. zeylanicum*. A los cinco días de exposición, estos mismos aceites registraron un mínimo desarrollo micelial de *M. fijiensis* con valores de 2 a 9 mm (Figura 1A); mientras que, con la concentración de

150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the case of *O. vulgare* oil, Soyulu *et al.* (2006) found *Phytophthora infestans* total growth inhibition at concentrations from 0.3 to 6.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cáceres *et al.* (2013) reported that an *O. vulgare* extract at a concentration of 200 ppm caused

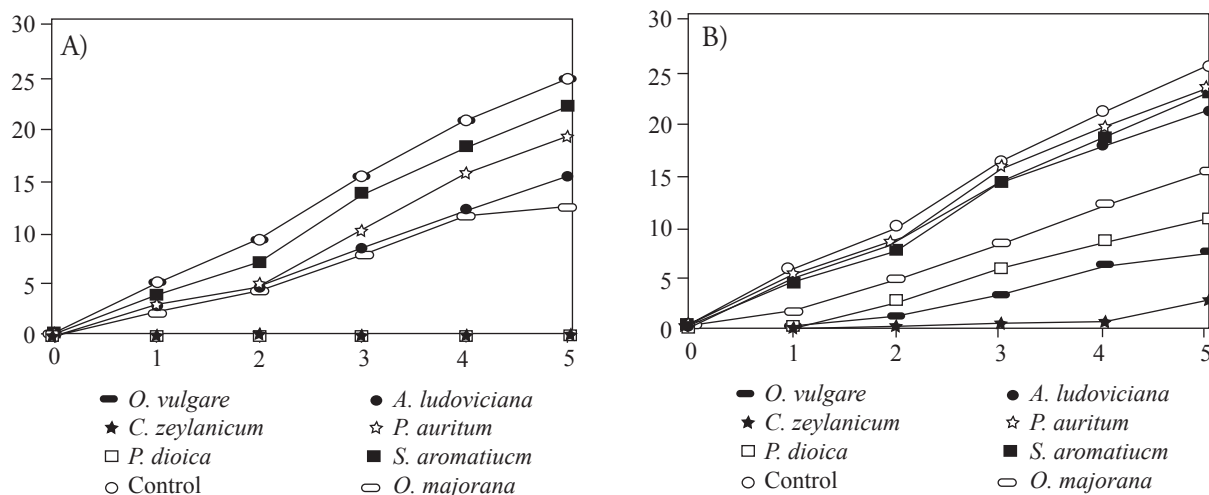


Figura 1. Crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (mm) en los aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes especies de plantas. a) 100 ppm y b) 500 ppm. DDI= días después de la inoculación.

Figure 1. *Mycosphaerella fijiensis* growth (in mm) in essential oils obtained from different plant species. a) at 100 ppm and b) at 500 ppm. DAI= days after inoculation.

500 ppm en los tres aceites, la inhibición del crecimiento del hongo fue del 100% (Figura 1B).

La capacidad antifúngica del aceite esencial de *C. zeylanicum* coincide parcialmente con lo reportado por Barrera y García (2008), quienes encontraron que este aceite tuvo un efecto inhibitorio del 70% en el crecimiento de *Fusarium* spp aislado de papaya a una concentración de 150 µg mL⁻¹. Con respecto al aceite de *O. vulgare*, Soylu *et al.* (2006) encontraron inhibición completa del crecimiento de *Phytophthora infestans* a partir de 0.3 y 6.4 µg mL⁻¹. Cáceres *et al.* (2013) reportaron que el extracto de *O. vulgare* a una concentración de 200 ppm, causó inhibición total de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*; en tanto que para *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. y *Penicillium digitatum* la inhibición fue a partir de 0.25 µL mL⁻¹. Ramírez *et al.* (2011) reportaron que el mismo aceite obtenido como hidrolato por destilación al 50% (volumen-volumen) inhibió completamente el desarrollo de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo. También Ramírez *et al.* (2016), concluyen que los hidrodestilados y aceites de *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* y *P. dioica* obtenidos por microondas, son eficientes en inhibir el desarrollo de *A. solani* y *C. gloesporioides*.

El aceite de *O. majorana* mostró efecto inhibitorio del 95% a la concentración de 1000 ppm. El efecto fungistático de esta especie fue reportado por Gamboa *et al.* (2003), quienes encontraron que el extracto metanólico de mejorana inhibió el 100% del crecimiento micelial de *P. infestans* a partir de 8000 ppm y 59 a 80% de inhibición de *Rhizoctonia solani* a 2000 y 4000 ppm, respectivamente. Damian *et al.* (2010), observaron que el principio activo del extracto de *A. ludoviciana* fue el diclorometanol-metanol (1:2 v/v), el cual inhibió el 100% del crecimiento micelial de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. mirabilis*, así como un 60% de *P. infestans*, a una concentración de 100 ppm. En estudio, el aceite de *A. ludoviciana*

total growth inhibition of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger*, whereas in the case of *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. and *Penicillium digitatum*, growth inhibition started at a concentration of 0.25 µL mL⁻¹. Ramírez *et al.* (2011) reported that *Moniliophthora roreri* development in culture medium was totally inhibited by the same oil obtained as a hydrolate by distillation at 50% (volume-volume). Also, Ramírez *et al.* (2016) state that hydrodistillates and *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* and *P. dioica* oils obtained by microwaving can efficiently inhibit *A. solani* and *C. gloesporioides* development.

Origanum majorana oil had a 95% inhibition effect at a concentration of 1000 ppm. The fungistatic effect of this species was reported by Gamboa *et al.* (2003), who found that the methanol extract of marjoram inhibited 100% of *P. infestans* mycelial growth at 8000 ppm, and from 59-80% *Rhizoctonia solani* growth at 2000 and 4000 ppm, respectively. Damian *et al.* (2010) observed that the active principle of the extract of *A. ludoviciana* was dichloromethanol-methanol (1:2 v/v), which inhibited 100% of *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* and *P. mirabilis* growth, and 60% of *P. infestans* growth, at a concentration of 100 ppm. In this study, *A. ludoviciana* oil inhibited 100% of *M. fijiensis* mycelial development at a concentration of 1000 ppm.

The main active chemical components identified were cinnamic aldehyde and eugenol in essential *C. zeylanicum* oils (50 and 10%, respectively); *P. dioica* and *O. vulgare*. *P. dioica* and *O. vulgare* had the highest concentration of eugenol (72.6 and 76.3%), followed by caryophyllene and limonene. The other components were reported in lower concentrations; for example, safrole was present only in *C. zeylanicum* oil; myrcene and O-cimene were present only in *P. dioica* oil; and limonene and carvacrol were present only in *O. vulgare* oil (Table 2).

inhibió el 100% del desarrollo micelial de *M. fijiensis* a una concentración de 1000 ppm.

Los componentes químicos principales activos identificados fueron el aldehído cinámico y el eugenol en los aceites esenciales de *C. zeylanicum* (50 y 10%, respectivamente), *P. dioica* y *O. vulgare*. El eugenol, es el de mayor concentración en *P. dioica* y *O. vulgare*, con 72.6 y 76.3%, respectivamente, seguido del cariofileno y limoneno. El resto de los compuestos se reportaron en concentraciones menores, de los cuales el safrol solo se presenta en el aceite de *C. zeylanicum*, mientras que el mirceno y el O-cimeno solo están en el aceite de *P. dioica*; el limoneno y el carvacrol, solo están presentes en el aceite de *O. vulgare* (Cuadro 2).

Barrera y García (2008), reportaron que el aldehído cinámico y el carvacrol inhibieron completamente el crecimiento del micelio del hongo *Fusarium* spp. a partir de 100 µg mL⁻¹. Wang *et al.* (2010) reportaron que *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora beticola*, *Mycogone perniciosa*, *Macrophoma kawatsukai*, *Thanatephorus cucumeris*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, fueron altamente sensibles a la aplicación de eugenol, de los cuales *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* fueron los más sensibles a este principio activo, con valores de CE₅₀ de 38.6 y 39.9 ug mL⁻¹, respectivamente.

Gill y Holley (2006) evaluaron el eugenol, carvacrol y cinamaldehído sobre los cambios de ATP y viabilidad celular de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus sakei*. Los resultados indican que el mecanismo de acción del eugenol y carvacrol es la disrupción de la actividad citoplasmática de la membrana, lo que aumenta su permeabilidad no específica. La ausencia de un aumento en el ATP extracelular de células tratadas con cinamaldehído, sugiere que eugenol y carvacrol poseen actividad inhibidora de la ATPasa que carece de cinamaldehído. Ante estas evidencias, se

Cuadro 2. Principales compuestos químicos activos como constituyentes de los aceites esenciales de tres especies de plantas.

Table 2. Main active chemical compounds as ingredients of essential oils from three plant species.

Compuestos	Concentración (%)		
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Pimenta dioica</i>	<i>Origanum vulgare</i>
Mirceno		4.17	
Felandreno		1.11	0.06
Limoneno			6.19
O-cimeno		0.98	
Carvacrol			1.06
Safrol	8		
Eucaliptol		3.4	0.24
Aldehído cinámico	50	0.82	0.39
Terpineno		0.47	0.06
Terpinoleno		1.39	2.20
Alpha-terpineol		1.07	2.20
Eugenol	10	72.6	76.31
Cariofileno		6.13	0.21

Barrera and García (2008) reported that cinnamic aldehyde and carvacrol inhibited completely *Fusarium* spp fungal mycelial growth at 100 µg mL⁻¹. Wang *et al.* (2010) reported that *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora beticola*, *Mycogone perniciosa*, *Macrophoma kawatsukai*, *Thanatephorus cucumeris*, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* were highly sensible to eugenol applications, and from these *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* were the most sensible to such active principle, with values of CE₅₀ of 38.6 and 39.9 ug mL⁻¹, respectively.

Gill and Holley (2006) evaluated eugenol, carvacrol and cinnamic aldehyde to observe ATP changes and cell variability in *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Their results show that eugenol and carvacrol action mechanism is a disruption of the membrane

relaciona que el efecto de los aceites de *C. zeylanicum*, *P. dioica* y *O. vulgare*, inhibieron el crecimiento del micelio de *M. fijiensis*, por la presencia de eugenol y aldehído cinámico; así como el carvacrol en el aceite de *O. vulgare*.

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de *C. zeylanicum* y *O. vulgare* y *P. dioica* fueron los de mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* a una concentración de 100 ppm, con una inhibición del 100% a partir de 500 ppm. Los aceites de *A. ludoviciana*, y *O. majorana*, presentaron efecto inhibitorio a concentraciones de 1000 ppm; *P. auritum* a 5000 ppm y *S. aromaticum*, no presentó efecto inhibitorio. El aldehído cinámico fue el principal compuesto químico detectado en *C. zeylanicum*; el eugenol en *P. dioica* y *O. vulgare*, ésta última también con pequeñas concentraciones de carvacrol.

LITERATURA CITADA

- Abbott D, and Andrews RS. 1970. Introducción a la Cromatografía, 3ª ed. Alhambra, Madrid. 122p.
- Barrera NLL, y García BL. J. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista científica UDO Agrícola 8(1):33-41. Disponible en línea: www.bioline.org.br/pdf/cg08005
- Bravo LL, Bermudez TK and Montes BR. 2000. Inhibition of *Fusarium moniliforme* by plant powders and some of their chemical constituents. Manejo Integrado de Plagas (CA-TIE) 57:29-34. Disponible en línea: <http://www.sidalc.net/cgibin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=073431> (consulta, mayo 2014)
- Cáceres-Rueda de León I, Colorado-Vargas R, Salas-Muñoz E, Muñoz-Castellanos LN y Hernández-Ochoa L. 2013. Actividad Antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología 31(2):105-112. Disponible en línea: www.rmfmf.org.mx/Vol3122013/Integrado/VOLUMEN3122013.pdf

cytoplasmic activity, which increases their non-specific permeability. The absence of extracellular ATP of cells treated with cinnamic aldehyde suggests that eugenol and carvacrol have inhibitory activity from ATPase, which contains no cinnamic aldehyde. These results suggest that the effect of *C. zeylanicum*, *P. dioica* and *O. vulgare* oils inhibited *M. fijiensis* mycelial growth because of the presence of eugenol and cinnamic aldehyde, as well of carvacrol in *O. vulgare* oil.

CONCLUSIONS

Essential *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica* oils had the best inhibitory effect on *M. fijiensis* mycelial growth under *in vitro* conditions at a concentration of 100 ppm, with 100% inhibition at 500 ppm. *A. ludoviciana* and *O. majorana* oils showed an inhibitory effect at concentrations of 1000 ppm; *P. auritum* at 5000 ppm; *S. aromaticum* did not show any inhibitory effect. Cinnamic aldehyde was the main chemical compound principle detected in *C. zeylanicum*; eugenol in *P. dioica* and *O. vulgare*. The latter also showed small concentration of carvacrol.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Celis FA, Mendoza FC, Pachón SE. 2012. Plantas aromáticas silvestres promisorias por su contenido de aceites esenciales. Universidad de Cundinamarca, Editorial Produmedios. Bogotá DC. Colombia. 56 p.
- Chávez-Solís AL, Pedroza SA, Nava DC, Cano RP y Castro FR. 2014. Control de la cenicilla del melón (*Podosphaera xanthii*) mediante el uso de extracto de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (L.). Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 2:103-113. DOI:10.5154/r.chsza.2012.08.038
- Damian BLM, Martínez MRE, Salgado GR and Martínez PMM. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 9(2):136-142. Disponible en línea: [www.re-dalyc.org/html/856/85612475009/](http://www.re-dalyc.org/html/856/85612475009/)

- Domínguez XA. 1979. Método de investigación fitoquímica. Ed Limusa. Mexico, D. F. 281p.
- Gamboa AR, Hernández CFD, Guerrero RE, Sánchez AA y Lira SSH. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont (De Barry) con extractos vegetales metanólicos de hojaseñ ( *Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvatdia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. Revista Mexicana de Fitopatología 21:13-18. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221102>
- Gill A and Holley RA. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology 108(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>
- Guerrero E, Solís S, Hernández F, Flores A, Sandoval V y D Jasso. 2007. Actividad biológica in vitro de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25:48-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225107>
- Lambert RJW, Skandאים PN, Coote PJ and Nychas GJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91:453-462. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556910>
- Mena-Espino X y Couoh-Uicab Y. 2015. Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la salud pública. Tecnociencia Chihuahua 9(2): 91-98. Disponible en línea: [http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v9n2/data/Efectos\\_de\\_los\\_plaguicidas\\_utilizados\\_para\\_el\\_control\\_de\\_la\\_Sigatoka\\_negra\\_en\\_plantaciones\\_bananeras.pdf](http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v9n2/data/Efectos_de_los_plaguicidas_utilizados_para_el_control_de_la_Sigatoka_negra_en_plantaciones_bananeras.pdf)
- Muñoz L, Montes M y Wilkomirsky T. 2001. Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. 330p.
- Martínez-Bolaños L, Téliz-Ortiz D, Rodríguez-Maciél JC, Mora-Aguilera JA, Nieto-Ángel D, Cortés-Flores JI, Mejía-Sánchez D, Nava-Díaz C y Silva-Aguayo G. 2012. Fungicides resistance on *Mycosphaerella fijiensis* populations of southeastern Mexico. Agrociencia 46: 707-717. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a6.pdf>
- Ramírez GSI, López BO, Espinosa ZS y Wong VA. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Noviembre-Diciembre, 1879-1891. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149505008>
- Ramírez GS, López BO, Guzmán HT, Munguía US y Espinosa ZS. 2011. Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). Tecnología en Marcha 24(2):3-17. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835560.pdf>
- Randerath K. 1970. Cromatografía de capa fina. Ediciones Urmo, S.A. Bilbao 3.
- Soylu EM, S Soylyu and S. Kurt. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathology 161(2):119-128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Stover RH. 1963. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: Associated ascomycetous fungi. Canadian Journal of Botany 41(10):1481-1485. <https://doi.org/10.1139/b63-128>
- Wheeler WB. 2002. Pesticides in Agriculture and the Environment. Ed. Dekker. New York. 337p.
- Wang C, Zhang J, Chen H, Fan Y, & Shi Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. Tropical Plant Pathology 35(3):137-143. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000300001>