

## Aceites Esenciales y Extractos Acuosaos para el Manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*

### Essential Oils and Aqueous Extracts for the *in vitro* Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*

Daniel Antonio Vásquez Covarrubias, Roberto Montes Belmont, Alfredo Jiménez Pérez e Hilda Elizabet Flores Moctezuma, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Apartado postal 24. Yauatepec, Morelos. Correspondencia: rbelmont@ipn.mx

(Recibido: Septiembre 09, 2013 Aceptado: Marzo 12, 2014 )

Vásquez Covarrubias DA, Montes Belmont R, Jiménez Pérez A y Flores Moctezuma HE. 2013. Aceites esenciales y extractos acuosaos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 170-179.

**Resumen.** El uso de fungicidas sintéticos favorece la aparición de hongos fitopatógenos resistentes, por lo que se requieren nuevos productos para el manejo de enfermedades. Una alternativa son los aceites esenciales (AE) y extractos acuosaos (EA) de origen vegetal. En este trabajo se evaluaron distintas concentraciones de AE y EA de cinco especies de la familia Chenopodiaceae sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) y *F. solani*. Se encontró que existe una respuesta diferencial entre las razas 2 y 3 de FOL e incluso entre aislamientos de una misma raza. Los AE de *Chenopodium album* [0.3 %] y *C. ambrosioides* [2 %] inhibieron totalmente el crecimiento y esporulación en ambas especies de *Fusarium*. De los EA probados, el de *Beta vulgaris* ejerció la mayor reducción del crecimiento micelial (38 %) y esporulación (61 %). Los EA al 5 %, de las cinco especies evaluadas, mostraron una estimulación del 27 al 183 % en el crecimiento micelial en las cuatro cepas empleadas. Al 10 %, *Beta vulgaris*, *C. album*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* y *C. graveolens* redujeron entre 11 y 38 % el crecimiento de *F. solani* y FOL raza 2 (aislamiento Yauatepec) con respecto al testigo.

Palabras clave adicionales: Plantas antifúngicas, Chenopodiaceae, epazote, epazote de borrego, betabel.

En la familia Chenopodiaceae existen varias especies con metabolitos con un amplio espectro de acción contra hongos fitopatógenos dentro de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phyllachora*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Tilletia* (Grainge y Ahmed, 1988; Rodríguez, 2005). Estos

**Abstract.** The use of synthetic pesticides favors the appearance of resistant pathogens and pest; therefore, new products are needed for disease management. The use of essential oils (EO) and aqueous extracts (AE) are an alternative option. In this work, different concentrations of EO and AE of five Chenopodiaceae species were evaluated on micelial growth and spore production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) and *F. solani*. It was found that there is a differential response between races 2 and 3 of FOL and even among isolates of the same race. EO of *Chenopodium album* [0.3 %] and *C. ambrosioides* [2 %] inhibited micelial growth and spore production on both *Fusarium* species. Of the EA tested, *Beta vulgaris* exercised the greatest reduction in mycelial growth (38 %) and sporulation (61 %). The EA 5 %, of the five species tested showed a stimulation by 27 to 183 % in mycelial growth on the four strains used. At 10 %, *Beta vulgaris*, *C. album*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* and *C. graveolens* reduced between 11 and 38 % growth of *F. solani* and FOL race 2 (isolate Yauatepec) compared with the control.

Additional keywords: Antifungal plants, Chenopodiaceae, american wormseed, lamb's quarters, beet.

In the Chenopodiaceae family there are several species with metabolites with a broad spectrum of activity against fungal pathogens within the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phyllachora*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* and *Tilletia* (Grainge and Ahmed, 1988; Rodríguez, 2005). These metabolites are detected in aqueous, ethanolic and methanolic extracts and in essential oils.

Rafik *et al.* (1984) found that the *Chenopodium album* aqueous extract, inhibits development of *Cochliobolus carbonum* and *Glomerella tucumanensis*. Grainge and Ahmed (1988) in a literature review, reported the *Beta vulgaris* antifungal activity against *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia penniseti*, *Fusarium*

metabolitos se detectan en extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y aceites esenciales.

Rafiq *et al.*, (1984) encontraron que el extracto acuoso de *Chenopodium album* inhibe el desarrollo de *Cochliobolus carbonum* y de *Glomerella tucumanensis*. Grainge y Ahmed (1988) en una revisión de literatura, indican la propiedad antifúngica en *Beta vulgaris* contra *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia penniseti*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Helminthosporium* spp. y *Rhizopus nigricans*. También mencionan que *C. album* actúa sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Monilia fructicola*, en tanto que *C. ambrosioides* inhibe a 20 especies de hongos incluyendo a dermatofitos de humanos.

En trabajo de campo, Montes-Belmont y Martínez (1992) aumentaron la producción de calabacita *Cucurbita pepo* en un 38 % con aplicaciones de extracto acuoso de *C. album* en comparación con plantas no tratadas contra *Erysiphe cichoracearum*. Bravo-Luna *et al.* (1998) reportaron que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* a una dosis de 500 ppm y la esporulación a 10000 ppm. Las saponinas de *C. quinoa* inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* (Woldemichael y Wink, 2001). Montes-Belmont y Flores-Moctezuma (2001) en trabajo sobre el causante del ergot del sorgo *Claviceps africana* reportaron que el extracto acuoso de *C. ambrosioides* al 4 % y la mezcla de los extractos acuosos de *Sizygium aromaticum* (0.5 %) y *C. ambrosioides* (3.5 %) redujeron significativamente el crecimiento micelial *in vitro*. Sin embargo, en pruebas *in vivo*, los polvos, extractos acuosos y etanólicos de *C. ambrosioides* no redujeron el crecimiento de este hongo sobre semillas de sorgo. Los aceites esenciales de esta planta al 5 y 10 %, mostraron un efecto fungicida sobre *F. thapsinum*, pero afectaron significativamente el porcentaje de germinación y la altura en plantas de sorgo. El aceite esencial de las partes aéreas de *C. botrys* tuvo actividad fungicida contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Tzakou *et al.*, 2006). Kumar *et al.* (2007) probaron que el aceite esencial de *C. ambrosioides* (100 µg/mL) actúa contra *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bipolaris oryzae*, y *Pythium debaryanum*.

Marangon *et al.* (2008) evaluaron el efecto del aceite esencial de *C. ambrosioides*, contra *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* y *F. semitectum*, encontrando que a una concentración del 0.3% se inhibe completamente el crecimiento, y que al 0.1 % alcanza una reducción superior al 90 %. Estos autores determinaron que el (Z)-ascaridol y E-ascaridol le confieren la actividad antifúngica a *C. ambrosioides*.

Saïdana *et al.* (2008) identificaron los compuestos volátiles y evaluaron el efecto de los aceites esenciales de *Suaeda fructicosa* (Chenopodiaceae) y *Limonium echioides* (Plumbaginaceae) sobre *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. sin encontrar efecto antifúngico. Javaid y Amin (2009) probaron *Chenopodium*

*oxysporum*, *F. solani*, *Helminthosporium* spp. and *Rhizopus nigricans*. They also mentioned that *C. album* acts on *Colletotrichum lindemuthianum* and *Monilia fructicola*, while *C. ambrosioides* inhibits 20 species of fungi including human dermatophytes.

In the fieldwork, Montes-Belmont and Martinez (1992) increased the production of *Cucurbita pepo* squash by 38 % with application of *C. album* aqueous extracts, compared to untreated plants against *Erysiphe cichoracearum*. Bravo-Luna *et al.* (1998) reported that the *Chenopodium ambrosioides* essential oil inhibited the mycelial growth of *Fusarium moniliforme* at a 500 ppm dose and sporulation at 10,000 ppm. *C. quinoa* saponins inhibited *Candida albicans* growth (Woldemichael and Wink, 2001). In the report of Montes-Belmont and Flores-Moctezuma (2001) about the causing agent of sorghum ergot (*Claviceps Africana*), they observed that the 4% *C. ambrosioides* aqueous extract and the mixture of the *Sizygium aromaticum* (0.5%) aqueous extracts and *C. ambrosioides* (3.5%), significantly reduced the *in vitro* mycelial growth. However, in *in vivo* tests, the powders, aqueous and ethanolic extracts of *C. ambrosioides* did not reduced the growth of this fungus in sorghum seeds. The 5 and 10 % essential oils of this plant showed a fungicidal effect on *F. thapsinum* but they significantly affected the germination percentage and plant height in sorghum. The essential oil of the *C. botrys* aerial parts had fungicidal activity against *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (Tzakou *et al.*, 2006). Kumar *et al.* (2007) proved that the *C. ambrosioides* essential oil (100 µg/mL) acts against *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bipolaris oryzae* and *Pythium debaryanum*.

Marangon *et al.* (2008) evaluated the effect of the *C. ambrosioides* essential oil against *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum*, and observed that at a 0.3% concentration, the growth was completely inhibited, and at 0.1 % over 90 % was reduced. These authors found that (Z)-ascaridole and (E)-ascaridole confer antifungal activity to *C. ambrosioides*.

Saïdana *et al.* (2008) identified the volatile compounds and they evaluated the effect of *Suaeda fructicosa* (Chenopodiaceae) and *Limonium echioides* (Plumbaginaceae) essential oils on *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. and *Alternaria* spp. without observing any antifungal effect. Javaid and Amin (2009) tested *Chenopodium album*, *C. murale* and *C. ambrosioides* against *Macrophomina phaseolina*, being *C. album* the best species in methanolic extract. Garduño-Pizaña *et al.* (2010) evaluated the effect of 15 plant species against *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, finding that the *C. ambrosioides* (5%) aqueous extract, significantly stimulated the growth and sporulation of the fungus, although it significantly reduced the germination of the conidia.

Recently, Rauf and Javaid (2013) tested different concentrations of methanolic extracts from leaves, stems, roots and inflorescences of *Chenopodium album* against

*album*, *C. murale* y *C. ambrosioides* contra *Macrophomina phaseolina*, siendo la mejor especie *C. album* en extracto metanólico. Garduño-Pizaña *et al.* (2010) evaluaron el efecto de 15 especies de plantas contra *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, encontrando que el extracto acuoso (5 %) de *C. ambrosioides* estimuló significativamente el crecimiento y esporulación del hongo y redujo significativamente la germinación de los conidios.

Recientemente, Rauf y Javaid (2013) probaron diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas, tallos, raíces e inflorescencias de *Chenopodium album* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* encontrando el mayor efecto en las inflorescencias.

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad biológica de aceites esenciales (AE) y extractos acuosos (EA) de *Chenopodium album*, *C. graveolens*, *C. berlandieri* subsp., *nuttalliae*, *C. ambrosioides* y *Beta vulgaris*, sobre el crecimiento micelial y producción de micro y macroconidios en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*.

**Especies de *Fusarium*.** Tanto *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* como *F. solani* se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (México). Del primero se manejaron dos cepas de la raza 2 (una de Cuautla 2RC y otra de Yautepec, Morelos 2RY) y una de la raza 3 3R proveniente de Emiliano Zapata en el mismo estado. La cepa de *F. solani* provino de Tepoztlán, Morelos. Todas las cepas provenían de plantas de jitomate y fueron identificadas morfológica y molecularmente (Domínguez, 2012). Las cepas se mantuvieron en cajas de Petri de 15 x 90 mm con medio papa-dextrosa-agar (PDA, BDBioxon®). La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 3$  °C durante el transcurso de los bioensayos.

**Especies vegetales.** Se utilizaron tres especies con antecedentes de propiedades antifúngicas: betabel (*Beta vulgaris*), epazote común (*Chenopodium ambrosioides*) y epazote de borrego (*C. album*). Una con efecto contra hormigas (epazote de zorrillo *C. graveolens*) (Grainge y Ahmed, 1988) y otra con propiedades alimenticias huauzontle (*C. berlandieri* subsp. *Nuttalliae*). Estas plantas se obtuvieron por colectas de campo en Jumiltepec, Morelos (epazote de borrego), Juchitepec, Edo. de México (epazote de zorrillo) y en la central de abastos de Cuautla, Morelos (epazote común, huauzontle y betabel).

**Procesamiento de las plantas.** Se establecieron dos tipos de bioensayos uno para AE y otro para EA. Los AE se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor de acuerdo al protocolo descrito por Marangon *et al.* (2008). Para esto, 4 L de material de la planta picada se introdujeron en un matraz de bola de 12 L y se sometió a ebullición; el vapor de agua se pasó a través de un condensador hasta que la destilación se detuvo y el destilado presentaba capa aceitosa. El destilado (hidrosol y AE) se congeló por un día con el propósito de congelar la fase acuosa (hidrosol) y facilitar la colecta del AE por decantación. Al hidrosol se le adicionó éter (Baker®) en una proporción 1:10 (éter: hidrosol), se agitó por 30 seg y se congeló nuevamente para

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* finding the highest effect on the inflorescences.

Based on these reports, the aim of this study was to determine the biological activity of essential oils (EOs) and aqueous extracts (AEs) of *Chenopodium album*, *C. graveolens*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae*, *C. ambrosioides* and *Beta vulgaris*, on mycelial growth and production of micro and macroconidia in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*.

***Fusarium* species.** Both *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani* were obtained from the collection of the Plant Pathology Laboratory of the Center for Development of Biotic Products of the Instituto Politecnico Nacional (Mexico). From the first one, two strains of the race 2 (one from Cuautla 2RC and the other from Yautepec, Morelos 2RY) and one from the race 3 3R from Emiliano Zapata, Morelos state, Mexico. The *F. solani* strain was from Tepoztlan, Morelos. All strains were from tomato plants and they were morphologically and molecularly identified (Dominguez, 2012). Strains were kept in Petri dishes of 15 x 90 mm with potato-dextrose-agar (PDA, BDBioxon®). Temperature was kept at  $25 \pm 3$  °C during the bioassays.

**Plant species.** Three species with a history of antifungal properties were used: Beet (*Beta vulgaris*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*) and lamb's quarters (*C. album*); another one effective against ants (fetid goosefoot, *C. graveolens*) (Grainge and Ahmed, 1988) and the last one with nutritional properties (huauzontle, *C. berlandieri* subsp. *Nuttalliae*). These plants were obtained by field collection in Jumiltepec, Morelos (*lamb's quarters*), Juchitepec, Mexico state (fetid goosefoot) and central de abastos market in Cuautla, Morelos (epazote, huauzontle and beets).

**Plants processing.** Two types of bioassays were established, one for Eos and another one for AEs. The EOs were obtained by steam distillation according to the protocol described by Marangon *et al.* (2008). Thus, 4 L of the chopped plant material were introduced into a 12 L round-bottomed flask until boiling; then water vapor passed through a condenser until distillation stopped and the distilled showed an oily layer. The distillate (hydrosol and EOs) was frozen for a day in order to freeze the aqueous phase (hydrosol) and facilitate the EOs collection by decantation. Ether (Baker®) was added to hydrosol in a 1:10 ratio (ether:hydrosol), stirred for 30 sec and frozen again in order to be able to separate the ether layer that contained EOs traces. Ether was removed in a water bath at a temperature between 35 and 45 °C. The EOs separated by freezing and with ether was mixed and dried by adding anhydrous sodium sulfate (Sigma®). EO was decanted and stored in amber flasks under refrigeration at 4 °C until use.

In order to obtain the AEs, the Montes-Belmont *et al.* (2000) protocol was followed. The previously ground material was placed in trays and dried in an oven between 45 and 55 °C (except for beets, which were cut into 3-5 mm slices and dried with a conventional fan during four days). Once plant material was dried, it was crushed with an electric mill to a mesh size No. 40. This fine powder was stored in plastic containers protected from light, in a cool

separar la fase etérea, la cual contenía trazas de AE. El éter se removió en baño maría a una temperatura entre 35 y 45 °C. El AE separado por congelación y por arrastre con éter se mezcló y secó adicionando sulfato de sodio anhidro (Sigma ®). El AE se separó por decantación y se almacenó en frascos ámbar en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para obtener EA se siguió el protocolo señalado por Montes-Belmont et al. (2000) el material previamente triturado se colocó en charolas y se secó en una estufa entre 45 y 55 °C; a excepción del betabel, el cual se partió en rebanadas de 3-5 mm y se secó con un ventilador convencional durante cuatro días. Una vez deshidratado el material vegetal, se procedió a triturarlo en un molino eléctrico a un tamaño de malla No. 40. Este polvo fino se almacenó en recipientes de plástico protegidos de la luz, en un lugar fresco (20 ± 3 °C) y seco hasta su uso.

Los EA se prepararon con agua destilada estéril, adicionando el polvo vegetal requerido para cada concentración [5, 10 ó 15 % p/v]. Cada matraz se colocó en agitación constante a 150 rpm durante 24 h. Pasado ese tiempo, se dejó reposar por 1 h y se filtró dos veces a través de gasas estériles. Inmediatamente después de filtrar cada EA, estos se incorporaron al medio de cultivo.

Los AE se incorporaron al medio de cultivo (PDA) después del proceso de esterilización del medio (15 lb/in durante 15 min) y hasta que el medio alcanzó una temperatura menor a 50 °C. Las concentraciones de AE empleadas fueron: 0.1, 0.3, 2 y 10 % v/v. Para facilitar la homogeneización de los AE en el medio, se agregó Tween 20 al 0.1 % en una proporción 1:5 (Tween:AE). Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar que incluyeron las 4 concentraciones y dos testigos: el control (únicamente PDA) y Tween 20 (proporción 1:5 respecto al AE). En todos los tratamientos se utilizaron seis repeticiones, considerando cada caja de Petri (90 x15 mm) como una unidad experimental. La temperatura de incubación fue a 25 ± 3 °C.

Con los EA, previamente filtrados, se preparó el medio de cultivo PDA, empleando al extracto acuoso como la cantidad de agua requerida para la preparación del medio, según instrucciones del fabricante, en condiciones normales. Es decir, si el medio requería 1,000 mL de agua, en su lugar se empleó 1000 mL de EA. Las concentraciones de EA empleadas fueron 5, 10 y 15 % (p/v). Una vez preparados los medios de cultivo, éstos se esterilizaron a 15 lb/in durante 15 min. El diseño experimental fue el mismo que para AE, además se incorporó un control (únicamente PDA).

#### Variables a medir:

**a) Crecimiento micelial.** El borde del micelio se marcó con un plumón indeleble cada 24 h después de la inoculación, hasta que el micelio del control (en al menos cuatro repeticiones) alcanzara el borde de la caja. Para determinar el área micelial se tomó una fotografía con una cámara digital fija en un tripie, manteniendo siempre las mismas condiciones (distancia, zoom, calidad en MPx y formato de imagen). En el programa ImageJ se calibró una distancia conocida para obtener la relación pixeles:mm. Una vez obtenida esta proporción, en Adobe Photoshop

(20 ± 3 °C) and dry place until use.

AEs were prepared with sterile distilled water, adding the plant powder required for each concentration [5, 10 or 15 % w/v]. Each flask was placed under constant stirring at 150 rpm for 24 h. After that time, they were allowed to stand for 1 h and filtered twice through sterile gauze pads. Immediately after filtering each AE, these were added to the culture medium.

EOs were added to culture media (PDA) after the sterilization process of the medium (15 lb/in for 15 min) and until the medium reached a temperature below 50 °C. The EOs concentrations used were: 0.1, 0.3, 2 and 10 % v/v. In order to facilitate the homogenization of the EOs in the medium, 0.1 % Tween 20 was added in a ratio 1:5 (Tween:EO). The treatments were established in a completely randomized design involving 4 concentrations and two controls: control (only PDA) and Tween 20 (1:5 ratio relative to EOs). In all treatments six replicates were done, considering each Petri dish (90 x15 mm) as an experimental unit. The incubation temperature was 25 ± 3 °C.

With the previously filtered AEs, the PDA culture media was prepared using the aqueous extract as the amount of water required for the media preparation, according to the manufacturer's instructions, under normal conditions. That is, if the media required 1,000 mL of water, then 1,000 mL of the AEs were used. The AEs concentrations used were 5, 10 and 15% (w/v). Once culture media were prepared, they were sterilized at 15 lb/in for 15 min. The experimental design was the same as for EOs, plus a control (only PDA).

#### Variables to be measured:

**a) Mycelial growth.** Mycelium border was marked with permanent marker every 24 h after inoculation, until control mycelia (in at least four repeats) reach the edge of the box. In order to determine the mycelial area, a picture was taken with a fixed digital camera (on a tripod), maintaining always the same conditions (distance, zoom, MPx quality and image format). With ImageJ software, a known distance was calibrated in order to obtain the pixels: mm ratio. Once this proportion was obtained, the "magnetic lasso" tool (Adobe Photoshop CS5®) was used to identify and measure the mycelial area expressed as mm<sup>2</sup>.

Once all photographs (one per petri dish) were obtained, they were selected and exported to a txt document tab-delimited, which then was open in Excel and saved as spreadsheet in order to obtain the percentage of growth inhibition with respect to the control (% GIC) using the following formula:

$$\% \text{ G.I.C.} = \frac{AMC - AMT}{AMC} * 100$$

Where CMA = control mycelial area and TMA = treatment mycelial area.

**b) Production of micro-and macroconidia.** Once the photography necessary to calculate the % GIC was obtained, a mycelial scraping with a sterile glass rod was done to each Petri dish. Then 15 mL of sterile distilled water were added and poured into a sterile beaker. The same

CS5®, se empleó la herramienta “lazo magnético” para señalar y medir el área micelial expresada como mm<sup>2</sup>.

Una vez tomadas las medidas de todas las fotografías (una por caja de Petri), se seleccionaron y exportaron a un documento txt delimitado por tabuladores, el cual se abrió en Excel y se guardó como hoja de cálculo para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control (% I.C.R.C.) mediante la fórmula:

$$\% \text{ I.C.R.C.} = \frac{AMC - AMT}{AMC} * 100$$

donde AMC= área micelial del control y AMT= área micelial del tratamiento.

**b) Producción de micro y macroconidios.** A cada caja de Petri se le realizó un raspado micelial con una varilla de vidrio estéril. Se adicionaron 15 mL de agua destilada estéril y se vació en un vaso de precipitado estéril. El mismo procedimiento se realizó en cada tratamiento y al final se obtuvo una suspensión de esporas por tratamiento, a partir de la cual se realizaron tres conteos por repetición en una cámara de Neubauer marca Marienfeld® (Alemania). La determinación del número de esporas se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. esporas/mL} = \frac{\text{No. esporas contadas}}{\text{No. cuadrantes contados}} \times \frac{\text{No. cuadrantes de la cámara}}{\text{volumen de la cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Se calculó el porcentaje de inhibición de la esporulación (% I.E.), de la siguiente manera:

$$\% \text{ I.E.} = \frac{\text{No. de esporas del control/mL} - \text{No. esporas del tratamiento/mL}}{\text{No. esporas del control/mL}} * 100$$

Ambos bioensayos fueron repetidos en dos ocasiones para confirmar los resultados. Los datos de las dos repeticiones fueron sometidos a ANOVA seguido de separación de medias por Holm-Sidak. El análisis se llevó a cabo en el programa Sigma-Plot versión 10.0 y la probabilidad de rechazo fue de 5 %.

## RESULTADOS

**Crecimiento micelial.** El AE de betabel al 0.3 % tuvo efecto fungistático con reducción significativa del crecimiento micelial de la cepa R2Y en un 71.12 %. Huauzontle y epazote de zorrillo, al 10 %, redujeron significativamente el crecimiento micelial de la cepa R3 (76.72 y 77 % respectivamente). Los AE de epazote de borrego y epazote común impidieron totalmente el crecimiento micelial de ambas especies *Fusarium* y las dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* desde la inoculación del patógeno hasta la última lectura de crecimiento (11 d) (Figura 1A).

Los cinco EA presentaron un efecto fungistático en el crecimiento micelial. La reducción máxima de crecimiento micelial (I.C.R.C.) para cada especie fue; huauzontle 10 %, epazote común 23 %, epazote de zorrillo 24 %,

procedure was done for each treatment and a spore suspension was obtained for each of them, from which three counts per repetition were done in a Neubauer chamber (Marienfeld®, Germany). Quantification of spores was done using the following formula:

$$\text{Spores \#/mL} = \frac{\text{Counted spores \#}}{\text{Counted quadrants \#}} \times \frac{\text{Chamber quadrants \#}}{\text{chamber volume}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Inhibition of sporulation percentage (% IS) was calculated as follows:

$$\% \text{ I.S.} = \frac{\text{Control spores \#/mL} - \text{Treatment spores \#/mL}}{\text{Control spores \#/mL}} * 100$$

Both bioassays were repeated twice to confirm the results. Data of the two repetitions were subjected to ANOVA followed by separation of Holm-Sidak means. The analysis was performed in Sigma-Plot version 10.0 and the probability of rejection was 5 %.

## RESULTS

**Mycelial growth.** The 0.3% beet's EOs showed fungistatic effect with significant reduction of mycelial growth of the R2Y strain down to 71.12%. The 10% Huauzontle and 10 % fetid goosefoot, significantly reduced the mycelial growth of R3 strain (76.72 and 77% respectively). The *lamb's quarters* and common epazote EOs completely prevented the mycelial growth of both *Fusarium* species and two *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains from pathogen inoculation until the last growth reading (11 d) (Figure 1A).

The five AEs showed a fungistatic effect on mycelial growth. The maximum reduction in mycelial growth (G.I.C) for each species was: huauzontle 10 %, epazote 23 %, fetid goosefoot 24 %, *lamb's quarters* 28 % and beet 38 % (Figure 1B).

**Microconidia production.** The beet (0.3%) and huauzontle (10%) EOs decreased by 74 and 52 % (respectively) the number of microconidia in the R3 FOL strain. The *lamb's quarters* and epazote (2% and 0.3% respectively) EOs decreased by 100% mycelial development and microconidia and macroconidia production (Figure 2A).

Only the 5% AEs reduced the microconidia production. *Lamb's quarters* 8% on R2C; epazote 37% on FS; fetid goosefoot 46% on R2Y; epazote, 51% for huauzontle on R2Y and 61% for beet on R2Y (Figure 2B).

**Macroconidia production.** The huauzontle and beets (0.3 %) EOs, reduced 87% macroconidia production of FOL R2Y. The fetid goosefoot EO, did not show difference with respect to the control, in the macroconidia number (Figure 3A).

Only the 5% AEs reduced the macroconidia production with respect to the control. The lowest reduction was that of beets against FS and R2Y (64% G.I.C.); while the maximum reduction was *lamb's quarters* on FS (90 % G.I.C) (Figure 3B).

## DISCUSSION

Although Grainge and Ahmed (1988) had already

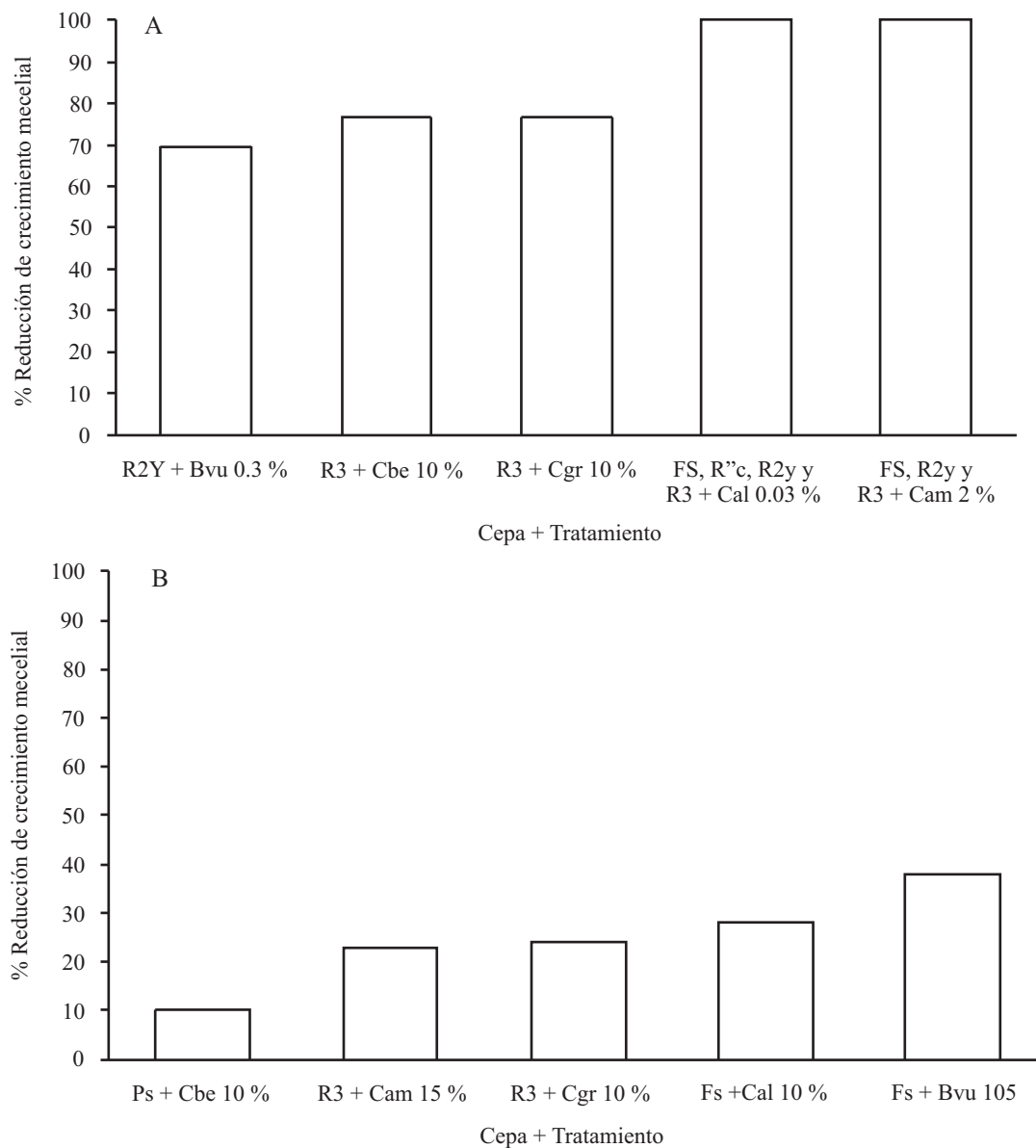


Figura 1. Reducción del crecimiento micelial con respecto al control de *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B) de Bvu.= *Beta vulgaris*, Cal = *Chenopodium album*, Cam = *C. ambrosioides*, Cbe = *C. berlandieri* subsp. *nutalliae* y Cgr = *C. graveolens*. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ). FS= *F. solani*, R2Y= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (Yautepec), R2C= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (Cuautla) y R3= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. (Cuautla) y R3= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

epazote de borrego 28% y betabel 38% (Figura 1B).

**Producción de microconidios.** Los AE de betabel (0.3 %) y AE de huauzontle (10 %) redujeron un 74 y 52 % (respectivamente) el número de microconidios en la cepa FOL R3. Los AE de epazote de borrego y epazote común (al 2 % y 0.3 % respectivamente) redujeron en 100 % el desarrollo micelial, y la producción de microconidios y macroconidios (Figura 2A).

reported the *B. vulgaris* and *C. ambrosioides* antifungal effect on *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, they did not compare the susceptibility between species and isolates of these two pathogens to the same essential oil or aqueous extract.

Differences in susceptibility (mycelial growth and conidial production) between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani* were found; there was also a

Únicamente los EA al 5 % redujeron la producción de microconidios. 8 % para epazote de borrego sobre R2C; 37 % para epazote común sobre FS, 46 % para epazote de zorrillo sobre R2Y, 51 % para huauzontle sobre R2Y y 61 % para betabel sobre R2Y (Figura 2B).

differential response between FOL races 2 and 3 and even among isolates of the same race. This is consistent with the diversity of responses found by other authors from a stimulus in the growth of *C. ambroioides* on *F. o. f. sp. gladioli* (Garduño-Pizaña *et al.*, 2010) till total inhibition of

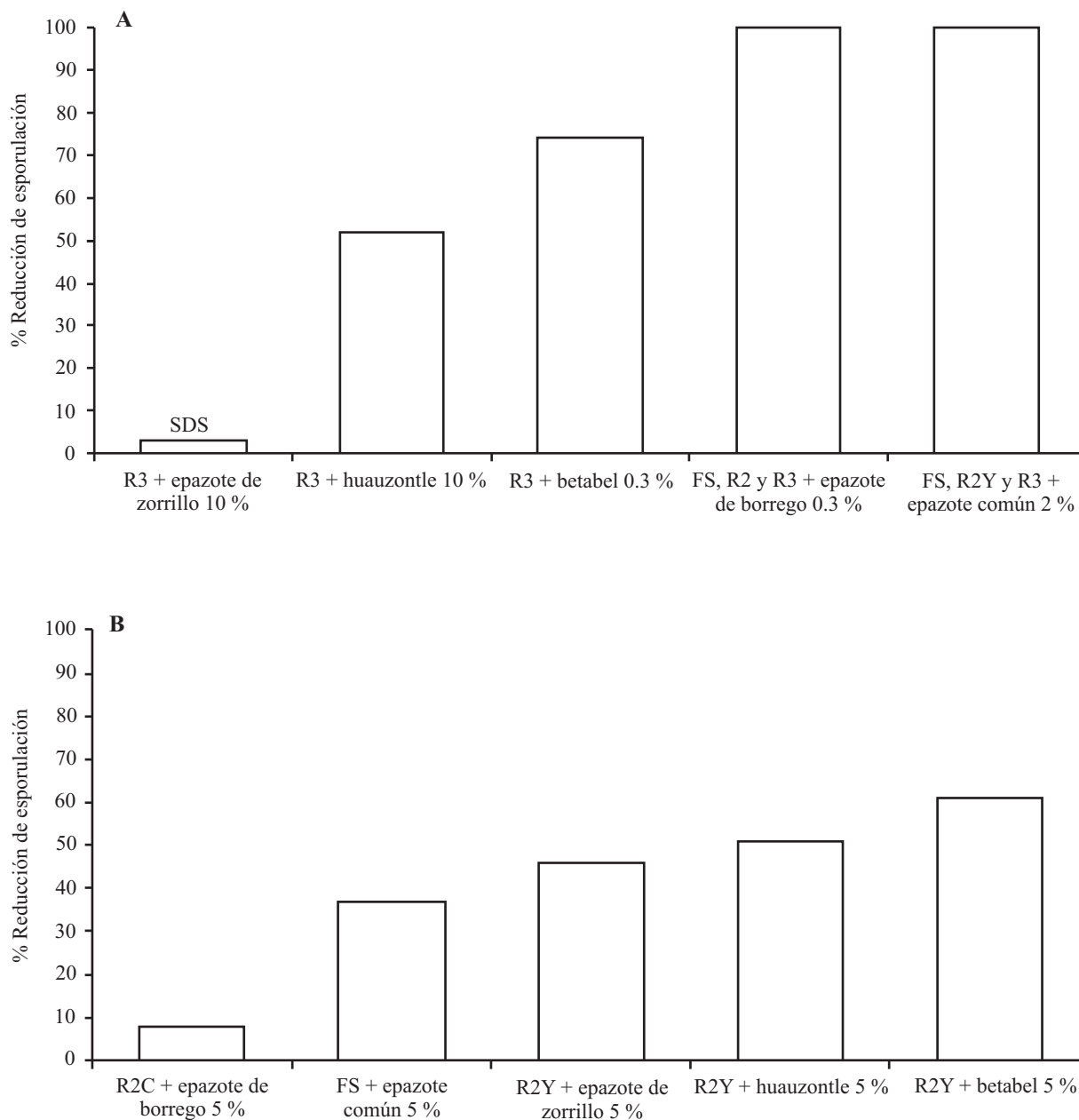


Figura 2. Porcentaje de reducción en la producción de microconidios en *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B). Todos los tratamientos, excepto el marcado con SDS presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ).  $n = 6$ . FS, *F. solani*; R2Y, FOL raza 2 (Yautepec); R2C, FOL raza 2 (Cuautla) y R3, FOL raza 3.

Figure 2. Percentage of reduction in the microconidia production in *Fusarium* spp. with essential oils (A) and aqueous extracts (B). All treatments, except the SDS labeled, showed significant difference from control (Holm-Sidak,  $p < 0.05$ ).  $n = 6$ . FS, *F. solani*; R2Y, FOL race 2 (Yautepec); R2C, FOL race 2 (Cuautla) and R3, FOL race 3.

**Producción de macroconidios.** Los AE de huauzontle y betabel (al 0.3 %) redujeron 87 % la producción de macroconidios de FOL R2Y. El AE de epazote de zorrillo no mostró diferencias, con respecto al control, en el número de macroconidios (Figura 3A).

Únicamente los EA al 5 % redujeron la producción de macroconidios con respecto al control. La menor reducción se encontró con betabel contra FS y R2Y (64 % I.C.R.C.); mientras que la máxima reducción se registró con epazote de borrego sobre FS (90 % I.C.R.C.) (Figura 3B).

*F. o. f. sp. cepae* by *C. album* (Rauf and Javaid, 2013).

For *C. album*, this is the first report of its effect on *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3. It is reported also for the first time the biological activity of EOs and AEs of *C. album*, *C. graveolens* and *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* on mycelial growth and conidial production of *Fusarium* species.

Even when *C. album* and *C. ambrosioides* EOs cause reduction, growth and sporulation inhibition of the tested species, their chemical composition is different (Duke,

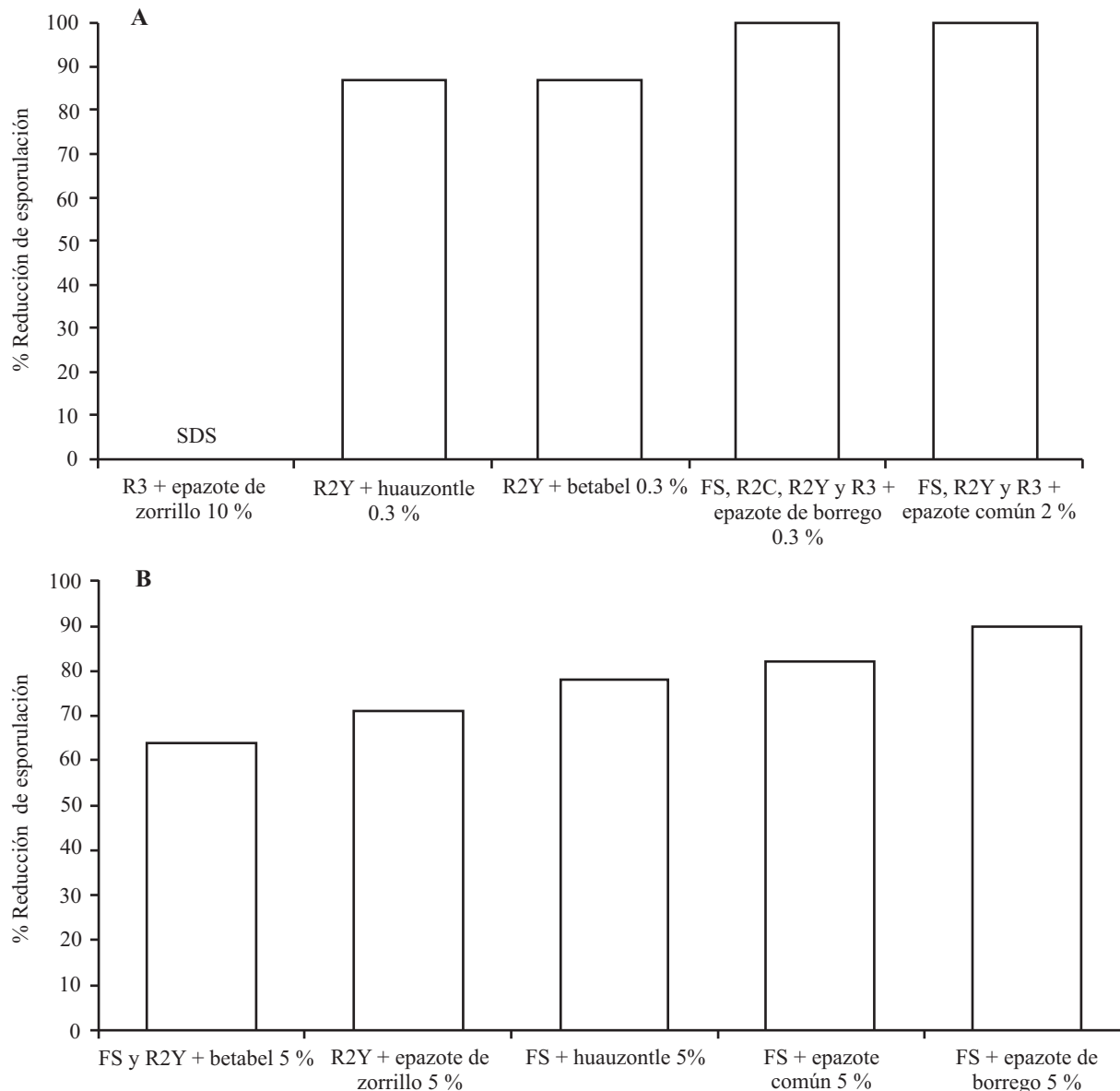


Figura 3. Porcentaje de reducción en la producción de macroconidios en *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B). Todos los tratamientos, excepto el marcado con SDS presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak,  $p < 0.05$ )  $n = 6$ . FS, *F. solani*; R2Y, FOL raza 2 (Yautepec); R2C, FOL raza 2 (Cuautla) y R3, FOL raza 3.

Figure 3. Percentage of reduction in the macroconidia production in *Fusarium* spp. with essential oils (A) and aqueous extracts (B). All treatments, except the SDS labeled, showed significant difference from control (Holm-Sidak,  $p < 0.05$ )  $n = 6$ . FS, *F. solani*; R2Y, FOL race 2 (Yautepec); R2C, FOL race 2 (Cuautla) and R3, FOL race 3.



## DISCUSIÓN

Aunque ya se había reportado el efecto antifúngico de *B. vulgaris* y *C. ambrosioides* sobre *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Grainge y Ahmed 1988) no se había comparado la susceptibilidad entre especies y aislamientos de estos dos patógenos ante un mismo aceite esencial o extracto acuoso.

Se encontraron diferencias en la susceptibilidad (crecimiento micelial y producción de conidios) entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*; también hubo una respuesta diferencial entre las razas 2 y 3 de FOL e incluso entre aislamientos de una misma raza. Esto concuerda con la diversidad de respuestas encontrada por otros autores desde un estímulo en el crecimiento de *C. ambrosioides* sobre *F. o. f. sp. gladioli* (Garduño-Pizaña *et al.*, 2010) hasta inhibición total de *F. o. f. sp. cepae* por parte de *C. álbum* (Raufy Javaid, 2013).

En el caso de *C. álbum*, este es el primer reporte de este efecto sobre *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 2 y 3. También se reporta por primera vez la actividad biológica de AE y EA de *C. álbum*, *C. graveolens* y *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* sobre el crecimiento micelial y producción de conidios de especies de *Fusarium*.

Aún cuando los AE de *C. álbum* y *C. ambrosioides* causan la reducción e inhibición del crecimiento y esporulación de las especies probadas, su composición química es diferente (Duke, 2008). Esta diferencia en la composición, así como diferencias en la concentración de los compuestos, podrían explicar el por qué los AE y EA de ambas especies provocan respuestas diferentes en *Fusarium* spp.

Bravo-Luna *et al.* (1998) y Kumar *et al.* (2007) mencionan que la susceptibilidad del patógeno a extractos vegetales será distinta según la especie, forma específica, raza y patogenicidad del hongo. Asimismo, esta susceptibilidad será distinta según la concentración del tratamiento a la que se someta al organismo.

Esta respuesta diferencial puede atribuirse a mecanismos de resistencia (enzimáticos, estructurales, cambio de la permeabilidad de la membrana, etc.) que le permitan aprovechar, evitar o detoxificar alguno de los compuestos presentes en los extractos vegetales (Vivanco *et al.*, 2005).

Otros compuestos, tales como ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, formaldehído, kaempferol, ácido p-cumárico, quercetina, entre otros, presentes en *B. vulgaris*, *C. ambrosioides* y *C. álbum* (Duke 2008) se han reportado también como fungicidas y/o fungistáticos, por lo que es difícil atribuir el efecto antifúngico a algún compuesto, sin pruebas específicas.

Los EA al 10 y 15 % redujeron significativamente el crecimiento micelial, pero estimularon la producción de esporas; caso contrario con EA al 5 %, donde estimularon el crecimiento micelial pero redujeron la producción de conidios.

La producción de estructuras de reproducción significa un gasto energético importante para el organismo, sin embargo, estas estructuras tienen un papel importante en el ciclo de vida del organismo. Su fabricación requiere del

2008). This difference in composition, as well as differences in concentration of the compounds, could explain why the EOs and AEs of both species cause different responses in *Fusarium* spp.

Bravo-Luna *et al.* (1998) and Kumar *et al.* (2007) reported that the susceptibility of the pathogen to plant extracts is different depending on the species, specifically, to fungus race and pathogenicity. Also, this susceptibility is different depending on the concentration of the treatment used to treat the organism.

This differential response may be attributed to resistance mechanisms (enzymatic, structural, change of the membrane permeability, etc.) that allow them to use, prevent or detoxify some of the compounds present in plant extracts (Vivanco *et al.*, 2005).

Other compounds, such as caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, formaldehyde, kaempferol, p-coumaric acid, quercetin, among others, present in *B. vulgaris*, *C. ambrosioides* and *C. álbum* (Duke, 2008), have been also reported as fungicidal and/or fungistatics, so it is difficult to attribute the antifungal effect to some compound, without specific tests.

The 10% and 15% AEs significantly reduced mycelial growth, but stimulated spore production; contrary to the 5% AE that stimulated the mycelial growth but reduced the conidia production.

The production of reproduction structures represents a significant energy consumption to the body, however, these structures have an important role in the life cycle of the organism. Their formation requires storage, synthesis or transformation of essential compounds to achieve the formation of functional conidia (Ramachandran *et al.*, 2008). Mainly for *Fusarium*, it is well known that its conidia contain high amounts of fatty compounds that require a carbon and nitrogen rich-substrate for germination (Palmero *et al.*, 2008). Based on the energy and nutritional requirements of the fungus for the formation of micro and macroconidia, it can be proposed that EOs provide carbon and nitrogen rich compounds and that the fungus is able to assimilate and use them in the conidia production (Garduño-Pizaña, 2010).

Essential oils (0.3-2%) of *C. álbum* and *C. ambrosioides* showed antifungal activity against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3, as they caused significant reduction in the mycelial growth and conidia production, proving to be the most efficient antifungal treatments against all four strains tested.

**Acknowledgments.** Thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and to the Instituto Politécnico Nacional for the financial support provided for the realization of this work. To Guillermo Fuentes Dávila, PhD and Luis Pérez Moreno, PhD, for the revision of this work.

## LITERATURA CITADA

Bravo-Luna L, Bermudez-Torres K y Montes-Belmont R. 1998. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium moniliforme* Sheld. mediante aceites esenciales vegetales y algunos de sus componentes

almacenamiento, síntesis o transformación de compuestos esenciales para lograr la formación de conidios funcionales (Ramachandran *et al.*, 2008). Particularmente para *Fusarium*, se sabe que sus conidios poseen altas cantidades de compuestos grasos y que requieren de un sustrato rico en carbono y nitrógeno para la germinación (Palmero *et al.*, 2008). Basado en los requerimientos energéticos y nutricionales del hongo para la formación de micro y macroconidios, se puede proponer que los EA proporcionan compuestos ricos en carbono y nitrógeno y que el hongo es capaz de asimilarlos y aprovecharlo para su beneficio en la producción de conidios (Garduño-Pizaña, 2010).

Los aceites esenciales (0.3 - 2 %) de *C. album* y *C. ambrosioides* mostraron ser antifúngicos para *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 2 y 3, ya que causaron reducción significativa del crecimiento micelial y producción de conidios, resultando ser los tratamientos con mayor actividad antifúngica frente a las cuatro cepas evaluadas.

**Agradecimientos.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico brindado para la realización del presente trabajo. A los doctores Guillermo Fuentes Dávila y Luis Pérez Moreno por la revisión del presente trabajo.

- químicos. Revista Mexicana de Fitopatología 16: 18-23.
- Dominguez, A. G. 2012. Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. En jitomate cultivado en suelo bajo invernadero en Morelos, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. 107 p.
- Duke, J. 2008. Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America. CRC Press. Florida. 832 p.
- Garduño-Pizaña C, Barrera-Necha LL and Rios Gomez MY. 2010. Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gadioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathology Journal 9: 103-111.
- Grainge M and Ahmed S. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley & Sons. New York, USA.
- Javaid A and Amin M. 2009. Antifungal activity of methanol and nhexane extracts of three *Chenopodium* species against *Macrophomina phaseolina*. Natural Products Research 23: 1120-1127.
- Kumar R, Kumar AM, Dubey NK and Tripathi YB. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic y antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology 115: 159-164.
- Marangon J, Newandram CG, Dev DJO and Moreira MF. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Chemical Ecology. 34: 1213-1218.
- Montes Belmont R, Cruz Cruz, V, Martinez Martinez G, Sandoval García G, Garcia Licon R, Zilch Domínguez Susano, Bravo Luna L, Bermudez Torres K, Dlores Moctezuma HE y Carvajal Moreno M. 2000. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología 18: 125-131.
- Montes-Belmont R y Flores-Moctezuma HE. 2001. Combate de *Fusarium thapsinum* y *Claviceps africana* mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales. Manejo Integrado de Plagas. 61: 23-30.
- Montes-Belmont R y Martínez GM. 1992. Control de la cenicilla *Erysiphe cichoracearum* y el mildiu de la calabacita *Pseudoperonospora cubensis* mediante extractos vegetales en Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca. Revista Mexicana de Fitopatología 10: 86-91.
- Palmero L., D., M. de Cara G., C. Iglesias G., G. Ruiz L and JC. Tello M. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 3 y 5: 1411-1418.
- Rafiq M, Nassir MA and Bhatti, MAR. 1984. Antifungal properties of certain common wild plants against different fungi. Pakistan Journal of Agricultural Research 5: 236-238.
- Ramachandran S., C. Larroche and A. Pandey. 2008. Production of spores. p: 231-246. In: Pandey, A., C. R. Soccol y C. Larroche (eds). Current Developments in Solid-State Fermentation. Springer Asiatech Publishers. New Delhi, India.
- Rauf S and Javaid A. 2013. Antifungal activity of different extracts of *Chenopodium album* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the cause of onion basal rot. International Journal of Agriculture and Biology 15: 367-371
- Rodríguez HC. 2005. Plantas contra plagas 2; epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuera y sabadilla. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Latina, Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, Colegio de Posgraduados e Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Estado de México, México. 209 p.
- Saïdana D, Mahjoub S, Boussaada O, Chriaa J, Mahjoub M, Cheraïf I, Daami M, Mighri Z and Helal A. 2008. Antibacterial and antifungal activities of the essential oils of two saltcedar species from Tunisia. Journal of the American Oil Chemists' Society 85: 817-826.
- Tzakou O, Pizzimenti A, Pizzimenti FC, Sdrafkakis V and Galati EM. 2006. Composition and antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* L. Essential oil from Greece. Journal of Essential Oil Research 19: 292-294.
- Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM y Flores HE. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia 2: 68-75.
- Woldemichael GM and Wink M. 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. Journal of Agricultural Food Chemistry 49: 2327-2332.