

# Potencial de los aceites esenciales en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Fusarium* sp. *in vitro* en *Cinnamomum verum*

## Potential of essential oils in the control of *Phytophthora cinnamomi* Rands and *Fusarium* sp. *in vitro* in *Cinnamomum verum*

Petra Andrade-Hoyos<sup>1</sup> , José Alberto Urrieta-Velázquez<sup>2</sup> , Nadia Landero-Valenzuela<sup>3</sup> ,  
Homero Reyes-de la Cruz<sup>4</sup> , Salvador Sampayo-Maldonado<sup>5</sup>  y Alfonso Luna-Cruz<sup>6</sup> 

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec-Galeana s/n, km 0.5, Colonia IMMS. 62780 Zacatepec, Morelos, México.

<sup>2</sup> Agricultura Protegida. CENID-RASPA, INIFAP. Margen Derecho Canal de Sacramento km 6.5., ejido Las Huertas. 35140 Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Química Aplicada. Departamento de Biociencias y Agrotecnología. Enrique Reyna H. no. 140., San José de los Cerritos. 25294 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>4</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Av. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria. 58030 Morelia, Michoacán, México.

<sup>5</sup> Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala. 54090 Tlalnepantla de Baz, Edo. de México, México.

<sup>6</sup> CONACYT-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Av. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria. 58030 Morelia, Michoacán, México.

‡ Autor para correspondencia (alunacr@conacyt.mx)

### RESUMEN

La canela (*Cinnamomum* sp.) es una especie con algunas limitantes sanitarias pero significativas, siendo *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp. las de mayor importancia que afectan la raíz. Su control con fungicidas sintéticos ha favorecido el desarrollo de resistencia debido a su mal manejo, por lo que su control con aceites esenciales es una alternativa viable. El objetivo fue determinar el potencial antifúngico de los aceites esenciales de tomillo y clavo para el control de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. aislados de *Cinnamomum verum*. Se evaluaron concentraciones de 60, 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  para los dos aceites esenciales. Los datos registrados sobre la tasa de crecimiento radial micelial de los patógenos después de la incubación de *Fusarium* sp. a  $25 \pm 1$  °C y  $28 \pm 1$  °C tuvo diferencia significativa en las concentraciones ensayadas. *P. cinnamomi*, no creció radialmente con la concentración de 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , mientras que con 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  la tasa de crecimiento fue de 0.06 mm por día. En tanto, con *Fusarium* sp. se inhibe por completo el crecimiento micelial con las dosis de 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceites esenciales.

Con el aceite de tomillo se observó una tendencia similar en las concentraciones 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  con mayor efecto de inhibición de los dos patógenos. La dosis de 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  de los dos aceites esenciales son capaces de inhibir en su totalidad ( $P \leq 0.05$ ) el crecimiento de ambos patógenos. En una concentración máxima de 280 esporas de ambos patógenos; se observó que, el número de esporas se reduce hasta 73 esporas con 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceite de tomillo. Por tanto, pueden ser una alternativa preventiva en el control de enfermedades de la raíz en canela.

**Palabras clave:** aceites esenciales, canela, control alternativo, *Fusarium* sp., *P. cinnamomi*.

### SUMMARY

Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) is a species with few but significant health limitations, of which *Phytophthora cinnamomi* and *Fusarium* sp. are the most important ones that affect the root. Their control based on synthetic fungicides has favored resistance due to poor handling, so their control with essential

#### Cita recomendada:

Andrade-Hoyos, P., Urrieta-Velázquez, J. A., Landero-Valenzuela, N., Reyes-de la Cruz, H., Sampayo-Maldonado, S. y Luna-Cruz, A. (2022). Potencial de los aceites esenciales en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Fusarium* sp. *in vitro* en *Cinnamomum verum*. *Terra Latinoamericana*, 40, 1-10. e1004. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1004>

oils is a viable alternative. The objective of this study is to determine the antifungal potential of thyme and clove – essential oils for the control of *P. cinnamomi* and *Fusarium* sp. isolated from *Cinnamomum verum*. Concentrations of 60, 120 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  were evaluated for both oils and phytopathogens. Data recorded on the mycelial growth rate of pathogens after incubation of *Fusarium* sp. at  $25 \pm 1$  °C and  $28 \pm 1$  °C had a significant difference in the concentrations tested. When clove essential oil was used in *P. cinnamomi*, the pathogen did not grow with the concentration of 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; with 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  growth rate was 0.06 mm per day, and with the concentration of 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ , it reached a growth rate of 1.16 mm per day. With respect to *Fusarium* sp. mycelial growth was completely inhibited with doses of 120 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  of essential oils; with thyme oil a similar trend was observed at concentrations of 120 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  greatly inhibiting effects of the two pathogens. It is noteworthy that the doses of 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  of the two essential oils are able to inhibit in their entirety ( $P \leq 0.05$ ) growth of both pathogens. The use of thyme and clove essential oils can be an alternative in preventive control of cinnamon root diseases.

**Index words:** essential oils, cinnamon verum, alternative control, *Fusarium* sp., *P. cinnamomi*.

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales tienen potencial natural en los mecanismos de defensa de los vegetales, son compuestos volátiles producidos por muchas especies y actúan contra microorganismos fitopatógenos (Elshafie, *et al.*, 2015). Su uso surge como una alternativa para prevenir y controlar enfermedades en la agricultura actual, cuyas prácticas de cultivo permiten utilizar determinadas sustancias en el manejo de patógenos (Robu, Covaci y Popescu, 2015). Entre los grupos importantes de plantas, las hierbas aromáticas contienen diferentes sustancias utilizadas en la medicina y agricultura para prevenir y tratar diferentes enfermedades (Juárez-Rosete *et al.*, 2013; Chouhan, Sharma y Guleria, 2017).

El combate de enfermedades de la raíz de diversas especies de plantas cultivadas puede realizarse con aceites esenciales, cuyas propiedades con efecto fungicida (Wilson, Ghaouth y Wisniewski, 1999), pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos. Por otro lado, su uso y aplicación son prácticas sostenibles

que mejoran la inocuidad de los cultivos y se consideran de bajo riesgo para el ser humano (Isman, 2000; Villa-Martínez *et al.*, 2015). Dicho potencial antifúngico ha incrementado el interés para prevenir enfermedades de humanos y vegetales (Celis-Forero, Mendoza y Pachón, 2012; O'Bryan, Pendleton, Grandall y Ricke, 2016; Gogoi, Baruah y Nath, 1997; Wilson *et al.*, 1999).

Un ejemplo de ello es el eugenol contenido en el clavo aromático, cuyos efectos son similares al fenol, considerado un anestésico que a dosis altas puede causar quemaduras a la superficie de estructuras de organismos plaga (Isaacs, 1983), por ejemplo, el sitio blanco del eugenol es la membrana citoplasmática de las bacterias (Devi, Nisha, Sakthivel y Pandian, 2010). Específicamente, el monoterpeno eugenol actúa sobre *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum* y *Phytophthora citrophthora* en naranjas, peras y manzanas (Amiri, Dugas, Pichot y Bompeix, 2008; Landero *et al.*, 2016).

Otra sustancia reportada por Matiz, Fuentes y León (2015), es el aceite de tomillo, al actuar como antibacteriana en el control del acné. Al respecto, Coy y Acosta (2013) mencionan que la actividad antibacteriana se debe al 1,8-cineol con 21.5% en el control de *Staphylococcus aureus*, mientras que en otras investigaciones se observó efectividad sobre bacterias gram positivas y negativas (Nevás, Korhonen, Lindström, Turkki y Korkeala, 2004). Este compuesto también ha mostrado cierto control sobre hongos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y de los pseudohongos *Phytophthora italicum* y *P. citrophthora* en post-cosecha (Camele *et al.*, 2010).

Por otro lado, la canela (*Cinnamomum* sp.) es una especie que tiene algunas limitantes sanitarias pero significativas, como el daño causado por *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp., que el manejo que se realiza generalmente mediante fungicidas químicos, lo cual ha tenido huella ambiental, siendo su mal uso la generación de resistencia en los patógenos del suelo (Baraldi *et al.*, 2003). Por ello, existe la necesidad de alternativas menos tóxicas, de menor impacto para el ambiente y que sean efectivas para el manejo de estas enfermedades, sugiriendo así los aceites esenciales y extractos naturales en el manejo potencial de la marchitez causada por diferentes especies de *Fusarium* (Abdel-Monahim, Abo-Elyousr y Morsy, 2011).

Basado en la eficacia y las diferentes propiedades de los aceites naturales de plantas aromáticas

o medicinales, se planteó determinar el potencial antifúngico de los aceites esenciales de tomillo y clavo sobre el control *in vitro* de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. aislados de *Cinnamomum verum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de Muestras y Ubicación del Estudio

El oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands y el hongo *Fusarium* sp. se aislaron de raíces de plantas de canela (*Cinnamomum verum*) con lesiones rojizas inducidas por *Fusarium* sp. y pudrición de raíces por *P. cinnamomi*. Durante la primavera/verano de 2018, se colectaron raíces de plantas de canela a 30 cm de profundidad, en Zozocolco de Hidalgo, Veracruz, México (20° 08' 25.80" N, 97° 34' 31.80" O). Posteriormente, las raíces se trasladaron en bolsas Ziploc® y se procesaron en el laboratorio de hongos y patología vegetal del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### Aislamiento de Patógenos

El oomicete *P. cinnamomi* y el hongo *Fusarium* sp., se aislaron de raíces de canela, de forma aleatoria, se obtuvieron fracciones de raíces de un centímetro de longitud, posteriormente, se lavaron con NaClO al 1% v/v por 1 minuto y se enjuagaron tres veces (durante 3 min) con agua destilada. Para aislar a *P. cinnamomi*, se siguió la metodología de Andrade-Hoyos *et al.* (2012); los fragmentos de raíz se colocaron en cajas de Petri (de 9 cm), utilizando dos medios de cultivo, uno fue papa dextrosa agar (PDA de Bioxon®) y jugo-V8®, para este último se adicionaron antibióticos (pimaricina 10 µg L<sup>-1</sup>, ampicilina 292 µg L<sup>-1</sup>, rifampicina 10 µg L<sup>-1</sup>, pentacloronitrobenzeno 0.10 g L<sup>-1</sup> e himexazol 0.25 µg L<sup>-1</sup>); finalmente, se colocaron a 28 ± 2 °C por 72 h. Para el aislamiento y purificación de *Fusarium* sp., se llevó a cabo un proceso similar, la siembra se hizo solo en PDA sin antibióticos y se incubó a 28 ± 2 °C por 72 horas.

### Caracterización Morfológica

La identificación morfológica del género *Fusarium* sp. causante de infección de raíces de canela,

previamente se realizó inoculación en plántulas y se encontró la reproducción de síntomas y reislamamiento, se realizó de acuerdo con Burgess, Summerell, Bullock, Gott y Backhouse (1994) y *P. cinnamomi*, se llevaron a cabo estudios detallados sobre morfología de colonias, esporangios elipsoides papilados, y clamidosporas en placas de jugo V-8 clarificado, incubados a 28 °C en la oscuridad durante 15 días. Se caracterizó con base en la metodología propuesta por Erwin y Ribeiro (1996).

### Aceites Esenciales

Las muestras frescas de hojas y tallo de tomillo se recolectaron en Atlixco, Puebla, y en el mercado local se compró el clavo seco, las fechas en las que se realizaron las colectas fueron en mayo del 2018. El material vegetal se trasladó dentro de una hielera y en el laboratorio se mantuvieron a 4 °C, posteriormente se realizó la extracción del aceite esencial a partir de 1 kg de material vegetal.

Los aceites de tomillo y clavo se extrajeron mediante hidrodestilación como lo indican Wang, Wang y Yang (2009), utilizando un equipo Clevenger®, pesando 50 g de cada una de las especies (muestra fresca de tomillo y seca de clavo). Posteriormente, se agregó agua destilada estéril hasta cubrir en su totalidad a cada una de las muestras, enseguida se sometieron a temperatura de 100 °C por 2 h. Los aceites se separaron del hidrolato correspondiente y se almacenaron a 4 °C, previo a su uso.

### Control *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp. con *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris*

Para la preparación de cada tratamiento con sus respectivas repeticiones, previo a la solidificación (entre 40 y 50 °C) del medio, en placas con 100 mL del cultivo PDA se adicionaron los aceites *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Thymus vulgaris* (tomillo) a tres concentraciones (60, 120 y 300 µL L<sup>-1</sup>) y cinco repeticiones por tratamiento y un tratamiento negativo (sin aceite). Posteriormente, un disco de 5 mm de diámetro de PDA con cultivo puro de 72 h de crecimiento, de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp., se transfirió al centro de otras placas con papa dextrosa agar (PDA) gelificado e incubó a 28 ± 2 °C por 192 h (Figura 1).

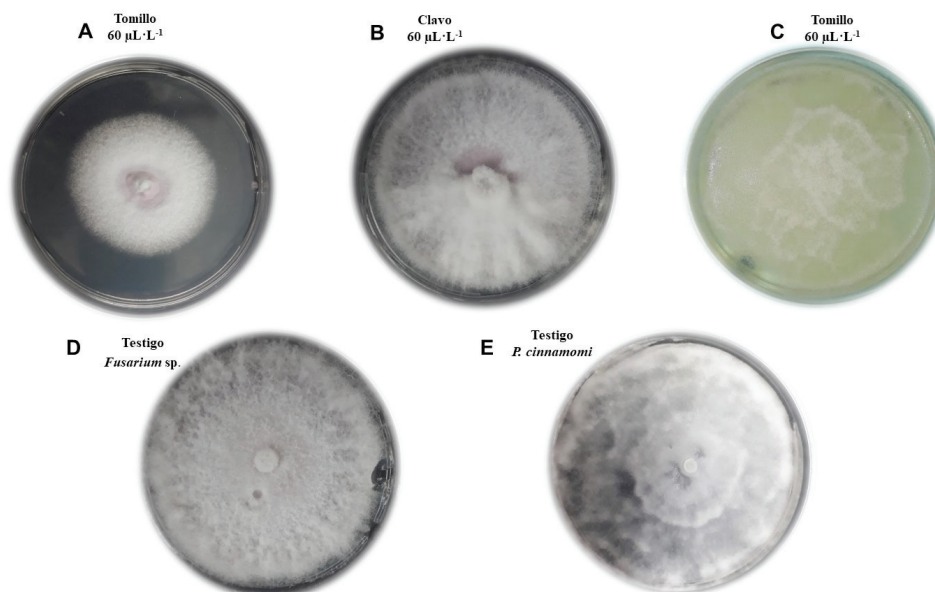


Figura 1. A, B) Crecimiento radial de *Fusarium* sp. en medio PDA con 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceites esenciales de tomillo y clavo; C) *P. cinnamomi* en medio PDA con 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceite de tomillo; D) testigo para *Fusarium* sp. y E) testigo de *P. cinnamomi*. Durante ocho días de crecimiento. Figure 1. A, B) Radial growth of *Fusarium* sp. in PDA medium with 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  of thyme and clove essential oils; C) *P. cinnamomi* in PDA medium with 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  of thyme oil; D) control for *Fusarium* sp. and E) *P. cinnamomi* control. During eight days of growth.

### Tasa de Crecimiento (Tc) de Especies Fúngicas

Se calculó la tasa de crecimiento por día (mm/día), de acuerdo con el procedimiento establecido por Mead, Hudson y Hinton (1993), mediante la Ecuación 1. Para ello, se registraron los radios de crecimiento micelial de la colonia fúngica del día inicial y final. La Tc micelial se determinó registrando medidas con un vernier digital de los dos patógenos cada 8 h (*Fusarium* sp.) y 12 h (*P. cinnamomi*) durante 10 días (Abdel-Fattah, Shabana, Ismail y Rashad, 2007).

$$Tc = \frac{(cf-ci)}{(Tf-Ti)} \quad (1)$$

donde:

Tc = tasa de crecimiento

Cf = crecimiento diametral final en cm

Ci = crecimiento diametral inicial (día uno) en cm

Tf = tiempo final del crecimiento fúngico (día final)

Ti = tiempo inicial (día uno)

### Esporulación

La esporulación de las colonias de *P. cinnamomi* se cuantificó a los 19 días de incubadas y en *Fusarium* sp. los conidios se contabilizaron a los 15 días, para ello, cada placa de Petri se enjuagó con 15 mL de agua destilada estéril, la superficie se raspó ligeramente con una espátula estéril y se filtró con gasa de algodón estéril (Protec®). Posteriormente, se tomó una alícuota de 0.5 mL de la suspensión de esporas del patógeno de cada tratamiento, y se transfirieron a una cámara de Neubauer para el conteo de conidios (Landeró *et al.*, 2016).

### Análisis Estadístico

El análisis de los resultados obtenidos se realizó considerando un diseño experimental completamente al azar, se realizaron análisis de regresión para los tratamientos *S. aromaticum* y *T. vulgaris* generando una ecuación con una curva representativa de cada uno de ellos (Liengme, 2002). Los resultados de crecimiento



micelial y tasa de crecimiento de los patógenos se compararon mediante análisis de varianza utilizando un diseño factorial  $2 \times 2$  y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) con el software SAS v.9 para Windows® (SAS, 1999). Los valores de crecimiento micelial mínimos y de producción de esporas máximos se estimaron a partir de la ecuación de regresión generada por el modelo con la ayuda del software Microsoft Excel®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Control *in vitro* de *P. cinnamomi* y *Fusarium sp.*

Al utilizar los aceites de tomillo y clavo a concentraciones diferentes, es notorio el efecto sobre el crecimiento de los patógenos aislados de *Cinnamomum* (Figura 1). El análisis del crecimiento de *P. cinnamomi* y *Fusarium sp.* con tratamientos de aceite esencial de tomillo y clavo, mostró coeficientes de variación entre 2 y 74%. Se identificaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los efectos principales y la interacción simple en el crecimiento del micelio de

ambos patógenos. Ambos aceites esenciales, a dosis bajas, muestran resultados estadísticamente iguales a los de los testigos, a excepción del aceite de tomillo que fue similar a las dosis más elevadas en control del crecimiento de los patógenos, mientras que la dosis media ( $120 \mu\text{L L}^{-1}$ ) y alta ( $300 \mu\text{L L}^{-1}$ ), inhibieron el crecimiento de *Fusarium sp.* y *P. cinnamomi* (Figura 2 y 3). Esto ha quedado de manifiesto con otros autores, quienes han investigado el potencial de estos aceites para el control de *Rhizoctonia solani* y *Penicillium expansum* en poscosecha de frutos (Landeró *et al.*, 2016), y en la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Streptomyces sp.* (Arici y Sanli, 2014). Otro efecto observado, es la disminución de la actividad de enzimas degradadoras de la pared celular en la aplicación foliar de mentol sobre enfermedades causadas por patógenos necrótrofos en el frijol (Khaledi, Taheri y Tarighi, 2015). En el presente estudio, los aceites esenciales de clavo y tomillo tuvieron un 100% de control de *Fusarium sp.* y *P. cinnamomi* como se muestra en la Figura 2, demostrando el potencial control o inhibición de hongos fitopatógenos *in vitro*.

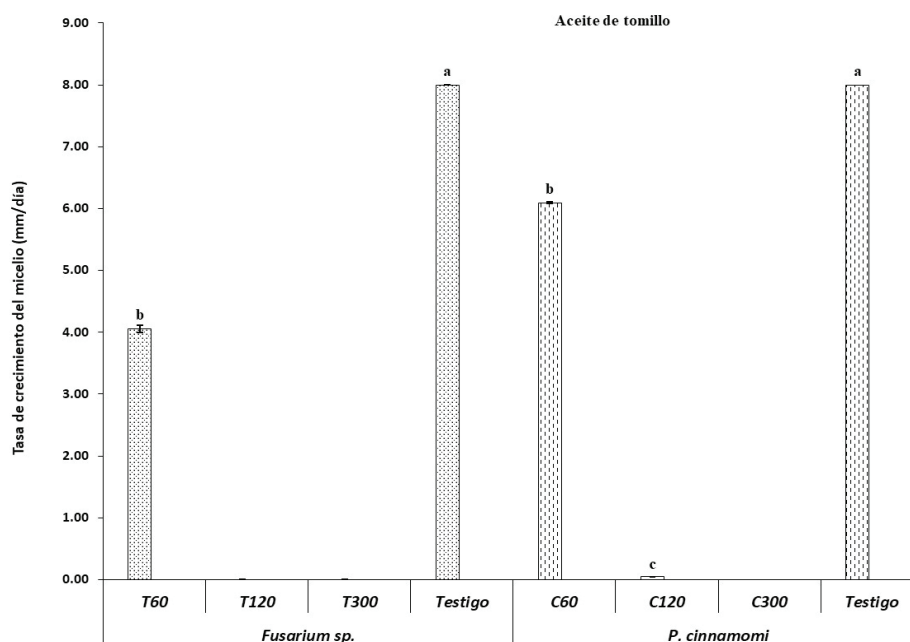


Figura 2. Crecimiento micelial *in vitro* de los patógenos *P. cinnamomi* y *Fusarium sp.* con tres dosis (60, 120 y  $300 \mu\text{L L}^{-1}$ ) de aceite de tomillo (T). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $P = 0.05$ ).

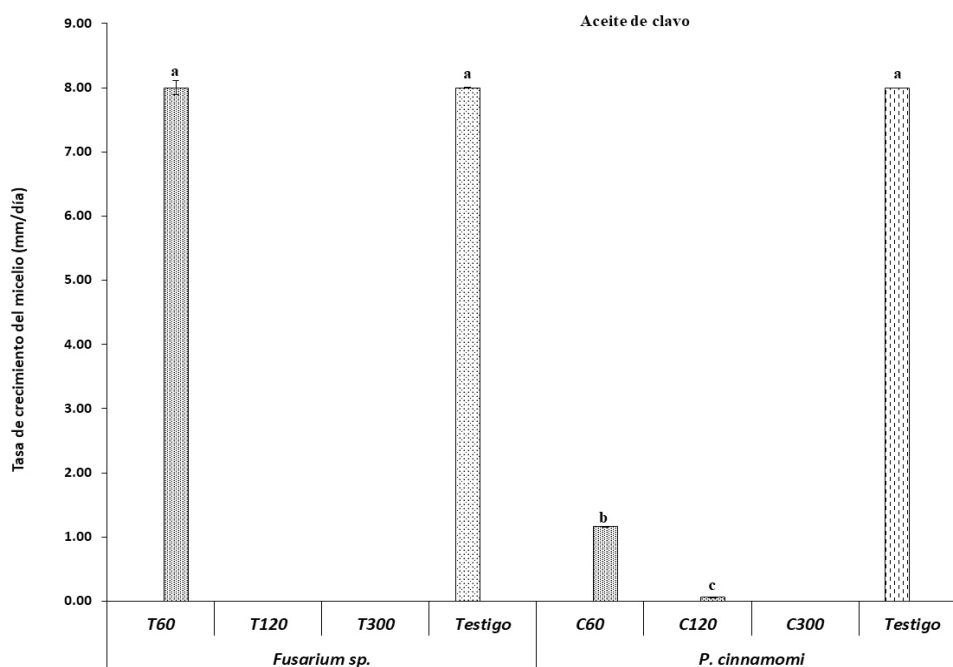
Figure 2. *In vitro* mycelial growth of the pathogens *P. cinnamomi* and *Fusarium sp.* with three doses (60, 120 and  $300 \mu\text{L L}^{-1}$ ) of thyme oil (T). Bars with the same letter are statistically equal (Tukey,  $P = 0.05$ ).

De acuerdo con el análisis de varianza (Figura 1 y 2), existen diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.0001$ ) entre tratamientos (60, 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) a base de aceite esencial de clavo y tomillo sobre el crecimiento *in vitro* de cada uno de los patógenos. La tasa de crecimiento micelial es inversamente proporcional a las concentraciones de los aceites esenciales empleados. De tal modo que los testigos, tanto de *Fusarium* sp. como de *P. cinnamomi*, tuvieron una tasa de crecimiento de 8 mm por día. Las tres concentraciones de aceite de tomillo mostraron diferencia significativa, siendo las mejores 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Sin embargo, también la dosis de 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ , resultó mejor que el testigo (Figura 2).

Con el aceite de clavo, el crecimiento de *Fusarium* sp. fue nulo al utilizar dosis de 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , mientras que, con el mismo aceite el crecimiento de *P. cinnamomi* presentó una Tc micelial de 1.16 mm por día utilizando una dosis de 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ . De igual manera, las dosis de 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  inhibieron la Tc micelial a un valor cercano a cero, con respecto al testigo (Figura 3).

Los aceites esenciales han demostrado potencial antimicrobiano como conservadores en el control de *Rhizoctonia solani* y *Streptomyces scabies* en cultivo de papa (Arici y Sanli, 2014); en otros resultados, el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* reduce hasta en un 60% el efecto de *P. capsici* y *P. melonis* (Amini, Farhang, Javadi y Nazemi, 2016). En el caso particular del aceite esencial de tomillo, se encontró que el efecto de su fase volátil es capaz de inhibir completamente el crecimiento de *P. infestans* (Soylu, Soyly y Kurt, 2006) y de la germinación de esporangios y zoosporas, y crecimiento micelial de *P. capsici* (Bi, Jiang, Hausbeck y Hao, 2012); así como en algunas especies de hongos en cereales (Matusinskya, Zouhar, Pavela y Novy, 2015). En otro estudio, los autores reportan que el follaje de orégano, romero y lavanda inhiben el crecimiento de *Botrytis cinerea*, esto en función de la dosis utilizada (Soylu *et al.*, 2006).

La inhibición *in vitro* de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. con los aceites de clavo y tomillo demuestran su capacidad antimicrobiana para el control de estas dos enfermedades importantes en la producción agrícola.



**Figura 3.** Crecimiento micelial en el control *in vitro* de los patógenos *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. con tres dosis de aceite de clavo (C60, C120 y C300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $P = 0.05$ ).

**Figure 3.** Mycelial growth in the *in vitro* control of the pathogens *P. cinnamomi* and *Fusarium* sp. with three doses of clove oil (C60, C120 and C300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Bars with the same letter are statistically the same (Tukey,  $P = 0.05$ ).

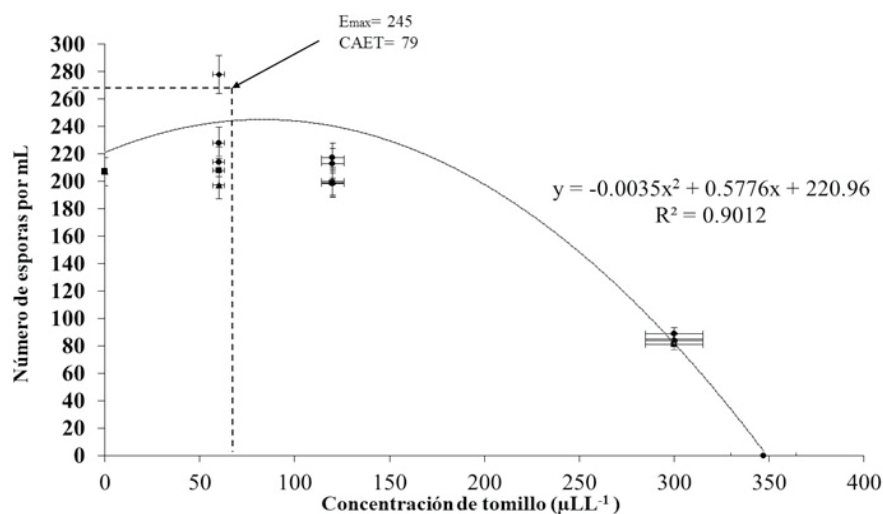
Dicho efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos puede atribuirse a compuestos antimicrobianos como el carvacrol y eugenol, identificados en tomillo y clavo respectivamente (Daferera, Ziogas y Polissiou, 2003). En un estudio a diferentes concentraciones de aceite esencial de canela (60, 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) sobre frutos de pera en poscosecha afectados por *P. expansum*, el crecimiento micelial del patógeno se detuvo 81 h posteriores al tratamiento con la dosis más alta (Landeró *et al.*, 2016). Por otro lado, Sharma, Rajendran, Srivastava, Sharma y Kundu (2017), encontraron que el aceite de clavo inhibió el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322 y la germinación de las esporas a 125  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Por lo tanto, sugieren que el aceite de clavo es un potente agente antifúngico que podría usarse como biofungicida para el control de *F. oxysporum* y otros patógenos de forma preventiva. Se recomienda realizar pruebas a nivel de campo, ya que existen otros factores bióticos y abióticos que disminuyen la efectividad de los aceites esenciales en el control de enfermedades en los cultivos.

## Esporulación

Con el aceite esencial del tomillo, *Fusarium* sp. disminuyó el número de esporas producidas. De acuerdo con los modelos matemáticos, se estima que el valor máximo de producción (245 esporas por mL) se presentaría si el hongo se desarrollara a una concentración de 79  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceite esencial o bien, si se incrementa la concentración de este aceite arriba de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , el número de esporas se reduciría completamente con 346.97  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 3).

El modelo matemático (Figura 4), estimó la producción máxima de esporas, correspondiendo a 207 esporas por mL cuando el hongo se colocó a 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceite esencial de clavo. También se observó que, por arriba de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  de aceite de tomillo, el número de esporas se reduce hasta 73 esporas con 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Sin embargo, después de 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  empieza a incrementar la cantidad de esporas (Figura 4).

La inhibición *in vitro* de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. con los aceites esenciales de clavo y tomillo, indican su capacidad antimicrobiana para



**Figura 4. Producción de esporas en *Fusarium* sp. con aceite esencial de tomillo.  $E_{max}$  = producción máxima de esporas por mililitro; CAET = concentración de aceite esencial de tomillo en  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Los dos parámetros se estimaron a partir de la ecuación de la forma  $y = ax^2 + bx + c$ ;  $y$  = número de esporas por mililitro,  $x$  = concentración de aceite esencial de tomillo.**

**Figure 4. Spore production in *Fusarium* sp. with thyme essential oil.  $E_{max}$  = maximum spore production per milliliter; CAET = concentration of thyme essential oil in  $\mu\text{L L}^{-1}$ . The two parameters were estimated from the equation of the form  $y = ax^2 + bx + c$ ;  $y$  = number of spores per milliliter,  $x$  = concentration of thyme essential oil.**

el control de estas dos enfermedades importantes en la producción agrícola. De acuerdo con Daferera *et al.* (2003), el tomillo es una planta rica en carvacrol y el tomillo en eugenol; compuestos capaces de inhibir el crecimiento de algunos hongos y pseudohongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp.). Además, se ha reportado que los aceites esenciales disminuyen la severidad de algunas enfermedades afectando la germinación de esporas de algunas especies de hongos, entre ellos, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium solani*; esto los convierte en candidatos para la prevención de fitopatógenos en los programas de manejo integrado (Raymaekers, Ponet, Holtappels, Berckmans y Cammue, 2020).

### CONCLUSIONES

Los aceites de tomillo y clavo inhibieron el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. *in vitro* a dosis de 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ . El más efectivo fue el aceite de clavo al inhibir completamente el crecimiento micelial y la germinación de esporas a 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  con un valor  $\text{IC}_{50}$  de 18.2 y 0.3  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente. Cabe resaltar que con 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  de los aceites de clavo y tomillo son suficientes para detener el crecimiento de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp.

Los aceites esenciales son una alternativa potencial para el control de estos dos patógenos en plantas de canela. Sin embargo, es conveniente realizar pruebas de efectividad biológica en campo para tener mayor precisión en el control de los patógenos *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp.

### DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplica.

### CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplica.

### DISPONIBILIDAD DE DATOS

El conjunto de datos utilizados o analizados durante el estudio actual, están disponibles con el autor de correspondencia.

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

### FONDOS

No hubo fondos de financiamiento público o privado para la realización de este estudio y todos los gastos corrieron a cargo de los autores.

### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: P.A.H. y N.L.V. Metodología y adquisición de fondos: P.A.H., N.L.V. Análisis formal, redacción, revisión y edición: P.A.H., A.L.C., J.A.U.V., N.L.V., H.R.C., S.S.M. Supervisión: P.A.H. y A.L.C. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece por las facilidades de trabajo en las instalaciones del laboratorio de hongos y patología vegetal ubicado en el Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### LITERATURA CITADA

- Abdel-Fattah, G. M., Shabana, Y. M., Ismail, A. E., & Rashad, Y. M. (2007). *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164, 81-89. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9032-9>
- Abdel-Monahim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M., & Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*. 30(2), 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Amini, J., Farhang, V., Javadi, T., & Nazemi, J. (2016). Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *Plant Pathology Journal*, 32(1), 16-24. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2015.0091>
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A. L., & Bompeix, G. (2008). *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 13-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.022>



- Andrade-Hoyos, P., de León, C., Espíndola B., M. C., Alvarado R., D., López J., A., & García E., R. (2012). Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas. *Spanish Journal of Rural Development*, 3(4), 23-30.
- Arici S. E., & Sanli, A. (2014). Effect of some essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces scabies* on potato plants in field conditions. *Annual Research & Review in Biology*, 4(12), 2027-2036. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/8526>
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*, 52(3), 362-370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00861.x>
- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K., & Hao, J. J. (2012). Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 96(6), 797-803. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0933>
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., & Backhouse, D. (1994). *Laboratory manual for Fusarium Research*. (3<sup>rd</sup> ed.). Sydney, Australia: University of Sydney.
- Camele, I., De Feo, V., Altieri, L., Mancini, E., De Martino, L., & Rana, G. L. (2010). An attempt of postharvest orange fruit rot control using essential oils from Mediterranean plants. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1515-1523. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0285>
- Celis-Forero, A., Mendoza-Forero, C., & Pachón-Suárez, M. E. (2012). *Plantas aromáticas silvestres promisorias por su contenido de aceites esenciales* (1<sup>a</sup> ed.). Colombia: Produmedios.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Coy B., C. A., & Acosta, G. E. (2013). Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237-246.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39-44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025>
- Elshafie, H. S., Mancini, E., Sakr, S., De Martino, L., Mattia, C. A., De Feo, V., & Camele, I. (2015). Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against post-harvest disease of peach fruit. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 929-934. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0167>
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). Phytophthora diseases worldwide. *The Journal of Agricultural Science*, 131(2), 245-249. <https://doi.org/10.1017/S001447979825109X>
- Gogoi, P., Baruah, P., & Nath, S. C. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba*. *Journal of Essential Oils Research*, 9(2), 213-215. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9699462>
- Isaacs, G. (1983). Permanent local anesthesia and anhydrosis after clove oil spillage. *The Lancet*, 321(8329), 882. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)91428-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)91428-9)
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Juárez-Rosete, C. R., Aguilar-Castillo, J. A., Juárez-Rosete, M. E., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., & Cruz Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 119-129. <https://doi.org/10.15741/revbio.02.03.06>
- Khaledi, N., Taheri, P., & Tarighi, S. (2015). Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 704-717. <https://doi.org/10.1111/jam.12730>
- Landeró V., N., Lara V., F. M., Aguado R., G. J., Andrade H., P., Encarnación A., D., & Pérez-R., Y. (2016). Essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*: control alternative for *Penicillium expansum* on pear in postharvest. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1017-1028.
- Liengme, B. V. (2002). *A guide to microsoft excel 2002 for scientists and engineers*. England: Newnes. ISBN13: 9780750656139
- Matiz, G. E., Fuentes, K., & León, G. (2015). Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 44(2), 189-207. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n2.56293>
- Matusinsky, P., Zouhar, M., Pavela, R., & Novy, P. (2015). Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products*, 67, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.022>
- Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. *British Poultry Science*, 34(3), 497-503. <https://doi.org/10.1080/00071669308417605>
- Nevas, M., Korhonen, A. R., Lindström, M., Turkki, P., & Korkeala, H. (2004). Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(1), 199-202. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.1.199>
- O'Bryan, C. A., Pendleton, S. J., Grandall, P. G., & Ricke, S. C. (2016). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture-*in vitro* studies on antibacterial mode action. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management-A review. *Biological Control*, 144, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- Robu, V., Covaci, G., & Popescu, I. M. (2015). The use of essential oils in organic farming. *Research Journal of Agricultural Science*, 47(4), 134-137.

- SAS Institute. (1999). *SAS/STAT User guide. Release 9.0*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *123*(3), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Soylu, E. M., Soyly, S., & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, *161*(2), 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales- Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, *64*(2), 194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Wang, R., Wang, R., & Yang, B. (2009). Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*(2), 289-292. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.002>
- Wilson, C. L., Ghaouth, A. E., & Wisniewski, M. E. (1999). Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *17*(1), 49-53.