

Efecto inhibitorio *in vitro* de aceites esenciales contra *Colletotrichum gloeosporioides*

In vitro inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides*

Francisco Manuel Morales-Chávez^{1,2} , Jesús Rubén Rodríguez-Núñez² , Adán Topiltzin Morales-Vargas² , Luis Antonio Mariscal-Amaro³ , Carlos Alberto Núñez-Colín^{2*} 

¹Programa de Doctorado en Ciencias en Producción Agroalimentaria, Tecnológico Nacional de México, Campus Roque, Carr. Celaya-Juventino Rosas Km. 8, 38110, Celaya, Guanajuato, México.

²Programa de Ingeniería en Biotecnología, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Mutualismo #303, Col. La Suiza, 38060, Celaya, Guanajuato, México.

³Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, 38010, Celaya, Guanajuato, México.

*Autor para correspondencia: carlos.nunez@ugto.mx

RESUMEN

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc se caracteriza como agente causal de antracnosis, importante enfermedad fúngica de frutales tropicales. Existe información del efecto de aceites esenciales sobre el control de enfermedades fúngicas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar efectos fungicidas y fungistáticos de aceites esenciales de clavo, canela, tomillo y limón contra *C. gloeosporioides*. Se aisló una cepa de frutos de guanábana con síntomas típicos de antracnosis y se identificó morfológica y molecularmente. Se generaron tres experimentos *in vitro*: el primero probó 1, 2 y 3 por ciento de aceites esenciales de canela, tomillo, clavo y limón; el segundo probó 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 0.75 por ciento de aceites esenciales de canela, tomillo y clavo; en ambos se evaluó el crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo sólido. Finalmente, se generó una prueba de viabilidad de esporas basado en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI₉₅). El aceite esencial de limón no fue efectivo contra *C. gloeosporioides*; por su parte, los aceites esenciales de canela y tomillo presentaron efecto fungicida a 0.1 por ciento de concentración con inhibición de crecimiento en placa de 98.1 y 97.76 por ciento y reducción de esporas de 66.67 y 56.67 por ciento, respectivamente; el efecto fungistático fue a 0.05 por ciento, con reducción de esporas de 50 por ciento; en tanto, el aceite esencial de clavo únicamente fue fungistático a partir 0.25 por ciento, con inhibición del crecimiento en placa de 93.27 por ciento y reducción de esporas de 43.3 por ciento. Estos resultados muestran que los aceites esenciales de canela y tomillo pueden ser utilizados para formular posibles fungicidas biológicos o en recubrimientos como tecnología poscosecha.

PALABRAS CLAVE

Antracnosis, concentración mínima inhibitoria, fungicidas biológicos

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. and Sacc is characterised as the causal agent of anthracnose, an important fungal disease of tropical fruits. There is information about the effect of essential oils about the control of fungal diseases. This research aims to evaluate the fungicidal and fungistatic effects of clove, cinnamon, thyme, and lemon essential oils against *C. gloeosporioides*. A strain was isolated from fruits of soursop with typical anthracnose symptoms, which was morphologically and molecularly identified. Three *in vitro* experiments were generated: the first tested 1, 2 and 3% of cinnamon, thyme, clove, and lemon essential oils; the second tested 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 0.75% of cinnamon, thyme and clove essential oils; in both experiments the mycelial growth of the fungus was evaluated in solid culture medium. Finally, a spore viability

Fecha de recepción:

11 de febrero de 2023

Fecha de aceptación:

18 de octubre de 2023

Disponible en línea:

23 de julio de 2024

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

test was generated based on the essential oil minimal inhibitory concentration (MIC₉₅). Lemon essential oil was not effective against *C. gloeosporioides*; while cinnamon and thyme essential oils showed fungicidal effect at concentration of 0.1%, with plate growth inhibition of 98.1 and 97.76% and spore reduction of 66.67 and 56.67% respectively; the fungistatic effect was at 0.05%; with a spore reduction of 50%; meanwhile the clove essential oil only was fungistatic effect beginning with 0.25% with 93.27% inhibition of plaque growth and spore reduction of 43.3%. These results show that cinnamon and thyme essential oils can be used to formulate potential biological fungicides or in coatings as a postharvest technology.

KEYWORDS

Anthracnose, minimal inhibitory concentration, biological fungicides

INTRODUCCIÓN

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. es el agente causal de la antracnosis, la cual ataca a diferentes frutales tropicales y subtropicales en México. Este hongo es capaz de afectar diferentes órganos de la planta, sobre todo los frutos, y se desarrolla en diferentes etapas fenológicas, lo cual causa pérdidas significativas en los cultivos, principalmente en papaya, mango, guanábana, aguacate, entre otros (Gutiérrez-Alonso et al. 2001; Tapia-Rodríguez et al. 2020). Es un hongo de distribución cosmopolita y predominante en los trópicos y subtrópicos (Landeró-Valenzuela et al. 2016). Además, presenta un crecimiento lento *in vitro* y tiene hifas septadas, cuyas dimensiones varían de 4 a 12 µm de largo (Rodríguez-López et al. 2008). El micelio de este hongo es blanco cuando crece en papa dextrosa agar (PDA), y toma una coloración salmón con el paso del tiempo, lo que indica el desarrollo de conidios que son hialinos cilíndricos obtusos en el ápice, los cuales miden de 9 a 24 µm de largo y de 3 a 4.5 µm de ancho (Cano et al. 2004).

La antracnosis causa una pudrición negra en los frutos y ataca a sus huéspedes en todas las etapas de su desarrollo, principalmente, en los tejidos tiernos, los cuales se momifican y caen (Andrades et al. 2009; Tapia-Rodríguez et al. 2020). Los síntomas de esta enfermedad empiezan con pequeñas manchas que aparecen en cualquier parte de la epidermis de los frutos; estas manchas, ligeramente hundidas con diámetros de 2 a 3 mm, pueden desarrollarse independientes o aglomerarse formando podredumbres cafés a negras hasta de 10 cm de diámetro (Cambero-Ayón et al. 2019). En guanábana, las áreas necróticas son corchosas, las cuales

eventualmente pueden presentar grietas y, cuando se hace un corte para examinar la pulpa de esa área necrótica, se observa una pudrición seca y oscura que contrasta con la pulpa sana que es blanca y jugosa (Hernández-Fuentes et al. 2013).

Por otro lado, las plantas —en su evolución— han sido capaces de protegerse a sí mismas de plagas y enfermedades antes de que el hombre se involucrara activamente en su protección, pues han logrado sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios relacionados con algunos de sus mecanismos de defensa (Hernández et al. 2007; Miresmailli e Isman 2014). Estos metabolitos pueden encontrarse en los aceites esenciales (Bakkali et al. 2008). La bioactividad de los aceites esenciales se ha investigado con base en sus efectos farmacológicos, y son obtenidos por diferentes técnicas fisicoquímicas de tejidos vegetales (Armas-Caballero et al. 2011).

Los aceites esenciales de cultivos frutales, herbáceos, especias, entre otros, son los agentes antimicrobianos de origen natural más estudiados, entre los cuales destacan la pimienta gorda (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), el orégano (*Origanum vulgare* L.), el tomillo (*Thymus vulgaris* L.), el clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), la canela (*Cinnamomum verum* J. Presl) y el limón (*Citrus × limon* (L.) Osbeck), cuyos principales constituyentes son el eugenol, el timol, el carvacrol, el aldehído cinámico y el limoneno, respectivamente (Armas-Caballero et al. 2011; Cerutti y Neumayer 2004). Los principales constituyentes de los aceites esenciales son los terpenos de bajo y medio peso molecular, como los monoterpenos —los cuales representan más de 90 por ciento de la composición de los aceites—, los sesquiterpenos y, en menor medida,

los diterpenos (Usano-Aleman et al. 2014). El cinamaldehído es el principal metabolito (80% de aceite esencial) del aceite esencial de canela (Benavides et al. 2016; Mohammadi et al. 2015; Ramírez et al. 2016); en el caso del aceite esencial de tomillo, su composición es timol (~22.1-38.45%), β -pineno (~29%), 1,8-cineolo (~21.5%) y *o*-cimeno (~17.9%) (Bill et al. 2014; Coy y Acosta 2013; Zambonelli et al. 2004); la composición del aceite esencial de limón es limoneno (~63%), β -pineno (~12%) y γ -terpineno (~9%) (Cerutti y Neumayer 2004; Perdones et al. 2012), y, finalmente, el aceite esencial de clavo está constituido por eugenol (~83.6%), eugenil acetato (~11.6%) y cariofileno (~4.2%) (Aguilar-González y López-Malo 2013; Ramírez et al. 2016).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto fungicida y fungistático de los aceites esenciales de canela (*C. verum*), tomillo (*T. vulgaris*), limón (*Citrus × limon*) y clavo (*S. aromaticum*) en contra de *C. gloeosporioides*, mediante pruebas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de la cepa *C. gloeosporioides*

Una cepa de *C. gloeosporioides* fue aislada de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.), provenientes de huertas comerciales de Nayarit, México, con síntomas típicos de antracnosis. Para su aislamiento, se tomaron piezas de 5 mm de tejido dañado de la periferia del área dañada por antracnosis. Estas piezas se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 5 por ciento por 90 s y después fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril, dos minutos cada vez, y se pusieron a secar sobre toallas de papel estériles hasta su uso. Se sembraron cuatro piezas de tejido desinfectado por caja Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Bioxon®, CDMX, México, 3 g L⁻¹) en una campana de flujo laminar. Las cajas Petri se mantuvieron en incubación a 24 °C hasta observar crecimientos miceliales (aproximadamente quince días) y se aplicó la técnica de punta de hifa para obtener cultivos puros del hongo, los cuales fueron usados para la identificación morfológica y molecular.

Identificación morfológica de *C. gloeosporioides*

Se hizo la identificación cultural y morfológica mediante observación de características de micelio, coloración del mismo, forma y tamaño de estructuras reproductivas (conidios), mediante preparaciones temporales y con asistencia de un microscopio compuesto (Motic® BA410, Richmond, Canada) y de los programas computacionales Motic® Live Imaging Module y Motic® Images Advanced 3.2. Para la identificación a nivel de especie se utilizaron las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Bolaños y Leyva (2010). La identificación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en Celaya, Guanajuato.

Identificación molecular de *C. gloeosporioides*

La identificación molecular fue realizada mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2. La extracción del ADN de los cultivos puros se efectuó adaptando el protocolo de Lievens et al. (2003). Para la amplificación por PCR se utilizó el oligonucleótido directo ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes y Bruns 1993) y el oligonucleótido reverso ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). La mezcla de reacción de PCR consistió en 25 ng de ADN template, búfer de PCR 1x (SENNA®), 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 μ M del oligonucleótido directo, 1.0 μ M del oligonucleótido reverso y 1 U de Taq Polimerasa de alta fidelidad (Taq plus DNA, SENNA®, CDMX, México), en un volumen total de reacción de 25 μ L. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100™ (Bio-Rad®, Berkeley, Estados Unidos) con el siguiente programa: un ciclo 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 59 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y un ciclo 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron purificados con el Kit Freeze 'N Squeeze™ de columnas de centrifugación para extracción de ADN en gel (Bio-Rad®), siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación en el departamento de servicios genómicos del LANGEBIO-CINVESTAV, Campus Irapuato, usando el método Sanger. Las secuencias obtenidas se compararon y alinearon con secuencias resguardadas en la base de datos de secuencias de nucleótidos del

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GeneBank database, Estados Unidos), utilizando Blast nucleotide® como método de comparación (NCBI 2015).

Inhibición del crecimiento micelar por aceites esenciales

Se probaron aceites esenciales de canela, tomillo, clavo y limón para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*, todos ellos de la marca Piping Rock®, una gama de aceites de Melaleuca Company (Ronkonkoma, Nueva York, Estados Unidos). Para su adición al medio se esterilizaron con filtros de jeringa Millipore (0.2 µm) dentro de una campana de flujo laminar y se guardaron en botellas estériles.

Para evaluar la inhibición del crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* se hicieron dos experimentos: en el primero se evaluaron concentraciones de 1, 2 y 3 por ciento de cada aceite esencial (canela, tomillo, clavo y limón) para determinar la inhibición de *C. gloeosporioides* contrastado con un control (sin aceite esencial). Siguiendo el protocolo utilizado por Bosquez-Molina et al. (2010), se utilizó medio de cultivo PDA (Bioxon®, 39 g L⁻¹), en cajas Petri de 5 cm de diámetro, donde el pH del medio se ajustó a 4 con 1 por ciento de ácido láctico y se añadió el aceite esencial a las concentraciones señaladas (v/v). Los aceites estériles se añadieron al medio PDA estéril dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente, el medio fue vertido en las cajas Petri previamente etiquetadas con el correspondiente aceite esencial y concentración, donde cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Una vez que el medio solidificó, se inoculó un fragmento de 0.75 cm² del hongo, el cual fue puesto en el centro de la caja y finalmente fueron incubadas a 25 °C por quince días.

Una vez concluido el primero, se realizó un segundo experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI₉₅), de acuerdo con las recomendaciones de Griffin et al. (2000), donde sólo se probaron los aceites esenciales de canela, tomillo y clavo —debido a que tuvieron resultados positivos en el primer experimento, menos el de limón—; aquí, las concentraciones probadas fueron de 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 0.75 por ciento. Se repitió el mismo procedimiento de preparación usado en el primer experimento, incluidas las tres repeticiones por tratamiento.

En ambos experimentos, la medición del crecimiento micelial se llevó a cabo cada tres días en cada una de las cajas Petri, con la finalidad de determinar cuál aceite esencial y qué concentración tenía el más alto porcentaje de inhibición. Para las mediciones del segundo experimento se tomaron fotografías, utilizando una cámara Samsung (Smart Camera NX2000, Suwon, Corea del Sur) y se usó el *software* Image Tool v. 3.0 (Wilcox et al. 2002) para medir el área exacta de crecimiento del micelio.

Evaluación de la inhibición de la germinación de esporas

Para obtener las esporas de *C. gloeosporioides*, el hongo se sembró en medio PDA e incubó a 28 °C durante siete días para la aparición de esporas, las cuales se cosecharon mediante la adición de 100 µL de una solución estéril de Tween® 80 (Tween® 80 Surfact-Amps™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) a 0.5 por ciento para separarlas; posteriormente, las cajas Petri se rasparon con ayuda de un asa estéril para recuperar las esporas, las cuales fueron colocadas en tubos de 1.5 mL y se aforaron a 1.5mL con una solución estéril de Tween® 80 a 0.5 por ciento. La concentración de esporas fue determinada en una cámara Neubauer (esporas mL⁻¹) a una concentración inicial de 86 x 10⁴ esporas mL⁻¹.

Para evaluar el desarrollo y germinación de las esporas se siguió el protocolo propuesto por Kefialew y Ayalew (2008), donde se adicionaron 20 µL de la solución inicial de esporas de *C. gloeosporioides* y 100 µL de una solución de Tween® 80 a 0.5 por ciento en un tubo Eppendorf de 0.2 mL y a cada tubo se le agregó aceite esencial (v/v) de acuerdo con su CMI₉₅ —tomando en cuenta su CMI₉₅ y evaluando una concentración por debajo y otra por encima de su CMI₉₅, de acuerdo con el experimento para determinar este valor.

Para el caso de los aceites esenciales de tomillo y canela se evaluaron las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento, mientras que para el aceite esencial de clavo fueron de 0.25, 0.5 y 0.75 por ciento. El tratamiento control fue sin adicionar ningún aceite esencial. Los tubos fueron incubados por 72 h y se evaluó la presencia de esporas con ayuda de una cámara de Neubauer, con la que se precisó la concentración final de esporas y de esporas germinadas, las cuales mos-

traban la formación de un tubo germinativo (Kefialew y Ayalew 2008). Posteriormente, se determinó la viabilidad de las esporas de *C. gloeosporioides* al transferir 100 μ l de cada tubo de los tratamientos de la solución de esporas con Tween 80 y el aceite esencial, así como del testigo a cajas Petri con medio PDA, donde estas cajas se incubaron durante 15 días y se evaluó el número de colonias presentes.

Análisis estadístico

Para los experimentos, los tratamientos fueron comparados utilizando pruebas de Kruskal-Wallis, con la de *post hoc* basada en Z a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ usando MS Excel®. Se decidió utilizar esta prueba no paramétrica debido a que los datos de los experimentos no cumplían con los supuestos estadísticos para poder evaluarlos mediante métodos paramétricos como el análisis de varianza, de acuerdo con recomendaciones de Núñez-Colín (2018).

RESULTADOS

Identificación morfológica

La cepa del hongo utilizada en el estudio en sus primeros días de crecimiento presentó un micelio blanco semiesponjoso sin coloración del medio de cultivo. Conforme el hongo fue envejeciendo, el micelio central se tornó más plano y se observó la presencia de masas de color salmón a naranja, donde se desarrollaron los conidios, y, en el envés, las cajas Petri con el hongo presentaron una tonalidad salmón. Los conidios fueron hialinos, ovalados, no septados, de $11.4\text{-}17.2 \times 4.1\text{-}4.6 \mu\text{m}$. Las características y tamaño promedio de los conidios correspondieron con lo reportado por Villanueva-Arce et al. (2008) para *C. gloeosporioides*.

Identificación molecular

La secuencia obtenida mediante amplificación por PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 para la cepa del hongo aislado de frutos de guanábana (*A. muricata*) de huertas comerciales de Nayarit generó un amplicon de 560 pb

(Cuadro 1), y, mediante Blast nucleotide® (Altschul et al. 1990), se comparó esta secuencia con las resguardadas en el Genbank® (NCBI 2015), donde se obtuvo 98 por ciento de identidad con la accesión FJ455526.1 y 96 por ciento con las accesiones KP145432.1 y FJ455528.1, todas ellas identificadas como *C. gloeosporioides* (Cuadro 1), lo que corroboró la identidad de la cepa utilizada, mediante la identificación morfológica.

Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* por aceites esenciales

Los aceites esenciales de tomillo, canela y clavo inhibieron totalmente a *C. gloeosporioides* en todas las concentraciones evaluadas (1, 2 y 3%), mientras que la adición de aceite esencial de limón al medio de cultivo no mostró diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en la inhibición del crecimiento micelial con respecto al control (Figura 1) para todas las concentraciones evaluadas (1, 2 y 3%).

Con estos resultados se diseñó el experimento para probar las CMI_{95} , para lo cual se evaluaron concentraciones menores a 1 por ciento de los aceites esenciales de tomillo, canela y clavo; de igual manera, se descartó al aceite esencial de limón al no ser efectivo para inhibir *C. gloeosporioides*.

En el experimento para estimar la CMI_{95} se encontró que los aceites esenciales de tomillo y canela a una concentración de 0.05 por ciento mostraron una inhibición mayor a 95 por ciento del crecimiento de *C. gloeosporioides* comparada con el control, mientras que el aceite esencial de clavo mostró este nivel de inhibición hasta una concentración de 0.5 por ciento (Cuadro 2, Figura 2). El aceite esencial de clavo a 0.01 y 0.05 por ciento, así como el de canela a una concentración de 0.01 por ciento no mostraron diferencias significativas en el crecimiento ($\alpha = 0.05$) con respecto al control; por otro lado, el aceite esencial de clavo a 0.1 por ciento y el de tomillo a 0.01 por ciento mostraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) con los tratamientos que mostraron una inhibición mayor a 95 por ciento a *C. gloeosporioides*, así como con el control (Cuadro 2). Por lo tanto, la CMI_{95} para el aceite esencial de clavo se estableció en una concentración de 0.5 por ciento, mientras que la de los aceites esenciales de canela y tomillo en una concentración de 0.05 por ciento.

Cuadro 1. Comparación de la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 en la cepa aislada en guanábana con registros del GenBank®.

Muestra	Identificación	Secuencia	Porcentaje de homología
Cepa aislada de guanábana	<i>C. gloeosporioides</i> (morfológicamente)	aatgacgggcatcatacatgatccgaggtcacctttggaaaattggggggttttacggcaagagtcctccg gatccagtcgagacgtaaagtactacgcaaaggaggctccgggagggtccgcactactccttgagggg cctacatcagctgtagggcccaacaccaagcagagctgagggtgaaatgacgctcgaacagcagatcccg caagaatgctggcggcgcaatgtgcttcaaagattcgatgattcactgaaattctgcaattcacattactatc gatttcgctgcttctcatgatgccaaacaaagagatccgtgttaaagtttgattattgctgtaccact cagaagaacgctgtaaatcagagtttggtatctccggcggcgccgaccgcccggaggcgggaggccg ggagggtcggagacctaccgccgaagcagcaggggggaggatgttcacaaagggttatatagcgta aactcattaatgatcctctgtaacccaacgagacctgaaac	No aplica
FJ455526.1	<i>C. gloeosporioides</i>	tcttggtccaattagaggaagtaaagtctgtaacaaggctcctgtgggtaaccgaggggatcattact gagttacgctctacaacctttgtgaacatacctacaactgttctcggcgggtaggggtctccgcacctcccg gctcccgcctcgggcgggctggcggccggaggataaccaaactgatttaacgagcttctctgagtggt tacaagcaataatacaaaactttaacaacggatctctgttctggatcatgaaagcagcagcaaatgagata agtaattgaaatgcagaatcagtgaaatcgaatcttgaacgcacattgcgcccgccagcatttggcgggat gcctgttcgagcgtcattcaacctcaagctctgtgttggggccctacagccgatgtaggcctcaaaagg tagtggcgaccctccggagcctcttgcgtagtaacttactctgcactgggatccggagggactcttgcg taaaaccccccaatttccaagggtgacctcgatcagtagatccccactg	98%
KP145432.1	<i>C. gloeosporioides</i>	tggaaagtaaaaaatcgtaacaaggctcctgtgggtaaccgaggggatcattactgagttacgctcta caacctttgtgaacatacctacaactgttctcggcgggtaggggtctccgcacctcccgcctccgcctc cggggcgggtcggcggccggaggataaccaaactctgatttaacgagcttctctgagtggtacaag caaataatacaaaactttaacaacggatcttgggtctggatcatgaaagcagcagcaaatgagataagta atgtaattgcagaatcagtgaaatcgaatcttgaacgcacattgcgcccgccagcatttggcgggcatg cctgttcgagcgtcattcaacctcaagctctgttgggttggggccctacagccgatgtaggcctcaaaagg tagtggcggaccctccggagcctcttgcgtagtaacttactctgcactgggatccggagggactcttgc cgtaaaaccccccaatttccaagggtgacctcgatcagtagatcctgctctcattttctcttaata	96%
FJ455528.1	<i>C. gloeosporioides</i>	ttgaggaagtaaaagtcgtaacaaggctcctgtgggtaaccgaggggatcattactgagttacgctctata acctttgtgaacatacctacaactgttctcggcgggtaggggtctccgtgacctcccgcctccgcccccg ggggtcggcggcggaggataaccaaactctgatttaacgagcttctctgagtggtacaagcaata atcaaaaactttaacaacggatcttgggtctggatcatgaaagcagcagcaaatgagataagtaattg gaattgcagaatcagtgaaatcgaatcttgaacgcacattgcgcccgccagcatttggcgggcatgctt cgtgagcgtcattcaacctcaagctctgttgggttggggccctacagctgatgtaggcctcaaaaggtagt ggccgacctcccggagcctcttgcgtagtaacttactctgcactgggatccggagggactcttgcgta aaaaccccccaatttccaagggtgacctcgatcagtagatgccccgat	96%

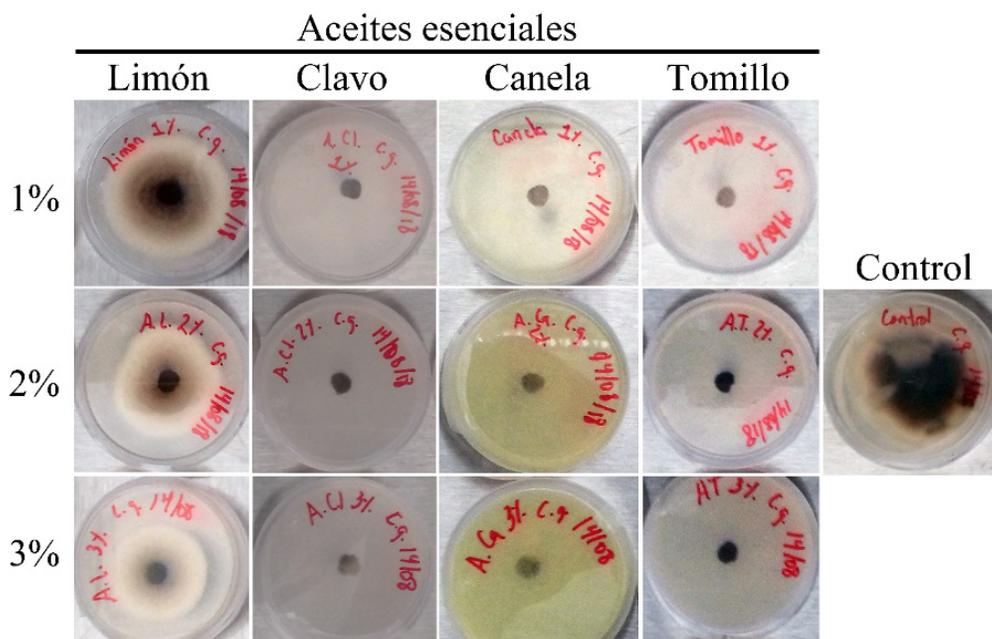


Figura 1. Efecto de los aceites esenciales de clavo, canela, tomillo y limón a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* aislada de frutos de guanábana de huertas comerciales de Nayarit, México.

Cuadro 2. Comparación del crecimiento radial del micelio de *C. gloeosporioides* y porcentaje de inhibición con respecto al control después de quince días de la inoculación para determinar CMI₉₅.

Tratamiento	Concentración (%)	Crecimiento radial (cm ²)	Inhibición (%)
Control	0	230 a ¹	0 d ¹
Aceite esencial de clavo	0.01	230 a	0 d
	0.05	204.65 ab	11.08 cd
	0.1	167.25 b	27.28 a
	0.25	15.49 d	93.27 a
	0.5	5.83 d	97.47 a
	0.75	4.77 d	97.93 a
Aceite esencial de canela	0.01	183.18 ab	20.36 cd
	0.05	4.2 d	98.17 a
	0.1	4.38 d	98.1 a
	0.25	5.1 d	97.78 a
	0.5	4.15 d	98.2 a
	0.75	5.25 d	97.72 a
Aceite esencial de tomillo	0.01	76.97 c	66.53 b
	0.05	4.92 d	97.86 a
	0.1	5.16 d	97.76 a
	0.25	5.43 d	97.64 a
	0.5	5.07 d	97.80 a
	0.75	5.18 d	97.75 a

¹Valores acompañados de la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas mediante la prueba *post hoc* basada en Z de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$).

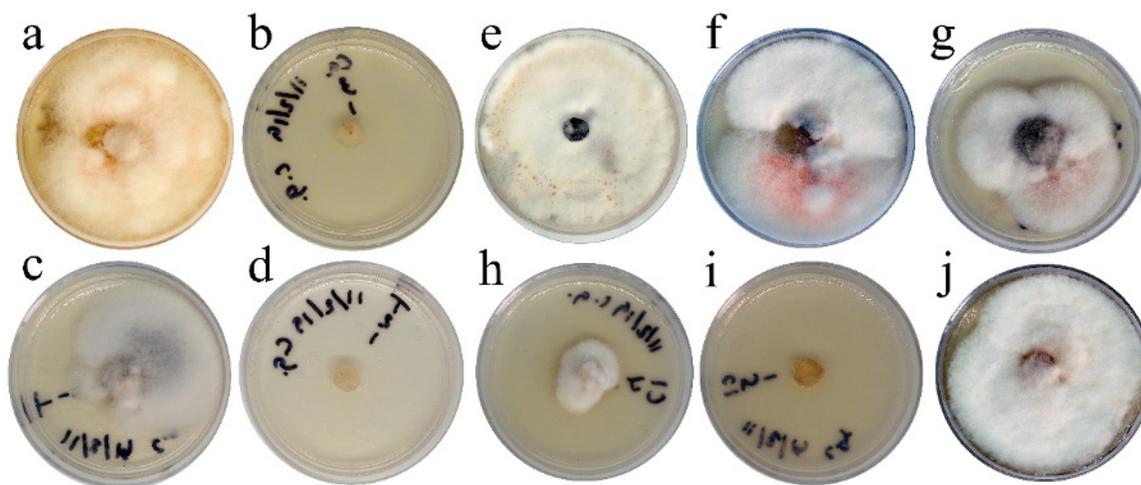


Figura 2. Efecto de los aceites esenciales de canela (a = 0.01% [v/v] y b = 0.05%), tomillo (c = 0.01% y d = 0.05%) y clavo (e = 0.01%, f = 0.05%, g = 0.1%, h = 0.25%, i = 0.5) con respecto a un control (j) para la determinación de la CMI₉₅ sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* aislada de frutos de guanábana de huertas comerciales de Nayarit, México.

Efecto de los aceites esenciales sobre la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*

El conteo de esporas de *C. gloeosporioides* después de 72 h de contacto con los distintos tratamientos de aceites esenciales fue significativamente menor ($\alpha = 0.05$) a medida que se incrementó la concentración de cada aceite esencial con respecto al control, a excepción de la concentración de 0.01 por ciento de aceite esencial de tomillo (Cuadro 3). Los aceites esenciales de canela y tomillo a concentración de 0.1 por ciento mostraron el efecto más sobresaliente, con 56.67 y 66.67 por ciento de reducción del número de esporas con respecto al control. Cabe destacar que sólo el control mostró esporas germinadas (Cuadro 3).

Finalmente, luego de cultivar en cajas Petri con medio PDA y sin aceite esencial todos los tratamientos (incluyendo el control), se demostró que los aceites esenciales de tomillo y canela tienen un efecto fungicida a una concentración de 0.1 por ciento, mientras que las concentraciones más bajas, así como todas las concentraciones probadas del aceite esencial de clavo sólo tuvieron efecto fungistático, al poder desarrollarse el hongo después de estar en contacto con el respectivo aceite esencial (Figura 3).

DISCUSIÓN

La identificación morfológica y molecular de la cepa aislada de frutos de guanábana de huertas comerciales

de Nayarit, México, sugiere que se trata de *C. gloeosporioides*; sin embargo, Weir et al. (2012) mencionan que *C. gloeosporioides* es un complejo de distintas especies que pueden confundirse. En este sentido, aunque la secuencia de la cepa utilizada en este trabajo da 98 por ciento de identidad con la accesión MS296048 del Genbank® (NCBI, 2015), clasificada como *C. fruticola*, Weir et al. (2012) mencionan que esta especie puede generar falsos positivos con otras especies del complejo utilizando la región ITS1-5.8S-ITS2, mientras que *C. gloeosporioides* no, lo que genera una certeza sobre la identificación utilizada en este trabajo.

Las pudriciones poscosecha y el incremento de la vida de anaquel son dos de los factores que pueden prevenirse y favorecerse, respectivamente, con técnicas poscosecha; por ejemplo, usando aceites esenciales, los cuales pueden resultar en beneficios económicos en las cadenas de suministro de alimentos vegetales frescos (Sivakumar y Bautista-Baños 2014). En estos experimentos, los resultados muestran que es posible la aplicación de aceites esenciales como agentes de control sobre el desarrollo de antracnosis en frutos, por lo que el uso de los aceites esenciales de tomillo y canela puede ser una alternativa, principalmente para frutas tropicales, aplicado como un aditivo en recubrimientos, por ejemplo.

Ramírez et al. (2016) reportaron que los aceites esenciales de clavo y canela inhibieron a *C. gloeosporioides* a una concentración de 0.1 por ciento, al igual que Sukatta et al. (2008), los cuales mencionaron que

Cuadro 3. Número de esporas y esporas germinadas después de 72 h de contacto con los aceites de canela, clavo y tomillo.

Tratamiento	Concentración (%)	Número de esporas μL^{-1}	Reducción del número de esporas (%)	Número de esporas germinadas μL^{-1}
Control	0	750 a [†]	0	50
Aceite esencial de clavo	0.25	425 cd	43.33	0
	0.5	412.5 bc	45	0
	0.75	400 bc	46.67	0
Aceite esencial de canela	0.01	412.5 bcd	45	0
	0.05	375 de	50	0
	0.1	250 f	66.67	0
Aceite esencial de tomillo	0.01	437.5 ab	41.67	0
	0.05	375 de	50	0
	0.1	325 ef	56.67	0

[†]Valores acompañados de la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas mediante la prueba *post hoc* basada en Z de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$).

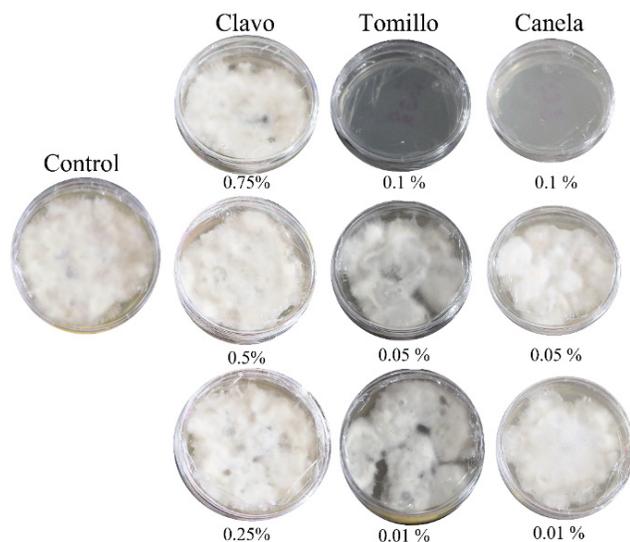


Figura 3. Colonias de *C. gloeosporioides* con cinco días de crecimiento de medio de cultivo PDA, provenientes de esporas tratadas con aceites esenciales de tomillo y canela a 0.01, 0.05 y 0.1 por ciento y clavo a 0.25, 0.5 y 0.75 por ciento.

el aceite esencial de canela a una CMI de 200 ppm y el aceite esencial de clavo a una CMI de 400 ppm inhibieron por completo el crecimiento de este hongo. Bosquez-Molina et al. (2010) señalaron la inhibición de *C. gloeosporioides* en 100 por ciento mediante el uso de aceite esencial de tomillo a 0.15 por ciento. Estos mismos autores reportaron éxito en la inhibición de este patógeno usando aceite esencial de limón; no obstante, ellos utilizaron una especie diferente, ya que su aceite esencial fue de *Citrus aurantifolia* Swingle y no de *Citrus × limon*.

En otro sentido, en un ensayo *in vitro*, Hong et al. (2015) reportaron inhibición total de *C. gloeosporioides* usando 2 μL de aceite de canela en 80 μL de solución en concentraciones de conidios de 16,000 conidios μL^{-1} . Mientras que Correa-Pacheco et al. (2017) demostraron que el desarrollo de esporas, así como la esporulación de *C. gloeosporioides* fue completamente inhibido usando aceite esencial de tomillo en concentraciones a partir de 1 por ciento.

Los efectos inhibitorios de los aceites esenciales de clavo, tomillo y canela contra *C. gloeosporioides*, tanto fungistáticos como fungicidas, puede ser atribuido al efecto de sus principales componentes activos. Por ejemplo, el aceite esencial de clavo tiene como principal compuesto activo al eugenol, el cual ha demostrado

actividad antimicrobiana debido a la presencia de un núcleo aromático ligado a un grupo hidroxilo (-OH), es decir, compuestos fenólicos, conocidos por ser reactivos y poder formar puentes de hidrógeno con grupos sulfhidrilos (-SH) presentes en sitios activos de enzimas, lo que provoca su inhibición (Bullerman et al. 1977; Sukatta et al. 2008); esto explicaría el efecto fungistático y no fungicida reportado en el presente trabajo.

En contraste, el principal compuesto activo en el aceite esencial de la canela es el cinamaldehído, que contiene un grupo aldehído (-COH) y un doble enlace conjugado por fuera de su anillo de benceno; este compuesto posee una actividad antifúngica debido al control de la síntesis de β -(1,3)-glucano y quitina tanto en levaduras como en hongos (Sukatta et al. 2008; Wang et al. 2005), lo que explica el efecto fungicida observado en el presente trabajo contra *C. gloeosporioides*. Asimismo, el principal componente activo del aceite esencial de tomillo es el timol, el cual presenta un compuesto fenólico en su estructura y se le atribuye una actividad antifúngica al incrementar la vacuolización del citoplasma, la acumulación de cuerpos lipídicos, ondulaciones de la plasmalema y alteraciones de la mitocondria y el retículo endoplasmático (Zambonelli et al. 2004), lo que explicaría el efecto fungicida encontrado en este trabajo.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de clavo mostró actividad fungistática inhibiendo la producción de esporas y el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a una CMI_{95} de 0.5 por ciento, y no mostró actividad fungicida en los ensayos. Los aceites esenciales de canela y tomillo presentaron un efecto fungicida y fungistático a una CMI_{95} de 0.1 por ciento y con CMI_{95} de 0.05 por ciento se observó sólo el efecto fungistático. Los aceites de canela y tomillo pueden ser usados en recubrimientos de frutos que son atacados por *C. gloeosporioides* para controlar la pérdida de poscosecha causada por la antracnosis o en la formulación de posibles fungicidas biológicos. El aceite esencial de limón no fue efectivo para inhibir *C. gloeosporioides*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el fondo SAGARPA-CONACYT (proyecto número 266891) y por la Universidad de Guanajuato (proyecto CIIC 197/2023).

LITERATURA CITADA

- Aguilar-González AE, López-Malo A. 2013. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7: 35-41.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrades I, Yender F, Labarca J, Ulacio D, Paredes C, Marín Y. 2009. Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo Gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. *Revista UDO Agrícola* 9: 148-157.
- Armas-Caballero C, Márquez-Villacorta L, Pretell-Vásquez C. 2011. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morado. *Pueblo Continente* 22: 123-132.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barnett H, Hunter B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Mineápolis, Estados Unidos.
- Benavides OL, Arturo D, Villegas C. 2016. Cuantificación de cinamaldehído y rendimiento en aceite esencial de canela comercial obtenido por hidrodestilación asistida con microondas. *Vitae* 23: S640-S642.
- Bill M, Sivakumar D, Korsten L, Thompson AK. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection* 64: 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>
- Bolaños BT, Leyva MG. 2010. *Manual de micología taxonómica*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Bosquez-Molina E, Ronquillo-de Jesús E, Bautista-Baños S, Verde-Calvo JR, Morales-López J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology* 57: 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
- Bullerman LB, Lieu FY, Seier SA. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science* 42: 1107-1109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb12677.x>
- Camero-Ayón C, Luna-Esquivel G, Rios-Velasco C, Díaz-Heredia M, Rodríguez-Palomera M, Betancourt-Aranguré A, Camero-Campos OJ. 2019. Causal agents of rot in Soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6: e538. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Cano J, Guarro J, Gené J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2450-2454. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2450-2454.2004>
- Cerutti M, Neumayer F. 2004. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio* 7: 149-155.
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Valle-Marquina MA, Hernández-López M. 2017. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* and on cv Hass avocado and fruit quality. *Journal of Phytopathology* 165: 297-305. <https://doi.org/10.1111/jph.12562>
- Coy CA, Acosta GE. 2013. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18: 237-246.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>

- Griffin SG, Markham JL y Leach DN. 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 12: 249-255. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699509>
- Gutiérrez-Alonso JG, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E, Vaquera-Huerta H, Martínez-Damián T, Delgadillo-Sánchez F. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 90-93.
- Hernández AN, Bautista S, Velázquez MG. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 119-123.
- Hernández-Fuentes LM, Gómez-Jaimes R, Andrés-Agustín J. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Santiago Ixcuintla, México.
- Hong JK, Yang HJ, Jung H, Yoon DJ, Sang MK, Jeun Y. 2015. Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Plant Pathology Journal* 31: 269-277. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027>
- Kefialew Y, Ayalew A. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology* 50: 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>
- Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Andrade-Hoyos P, Aguilar-Pérez LA, Aguado GJ. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1189-1198.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Lévesque CA, Cammue BPA, Thomma BPHJ. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 223: 113-122. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00352-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00352-5)
- Miresmailli S, Isman MB. 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Science* 19: 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.002>
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. 2015. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 110: 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.019>
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. [internet]. 2015. Standard Nucleotide BLAST. [citado 2020 abril 15]. Disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
- Núñez-Colín CA. 2018. Análisis de varianza no paramétrica: un punto de vista a favor para utilizarla. *Acta Agrícola y Pecuaria* 4: 69-79. <https://doi.org/10.30973/aap/2018.4.3/1>
- Perdones A, Sánchez-González L, Chiralt A, Vargas M. 2012. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 70: 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.002>
- Ramírez SI, López O, Espinosa S, Wong A. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1879-1891.
- Rodríguez-López ES, González-Prieto JM, Mayek-Pérez N. 2008. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 53-63.
- Sivakumar D, Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64: 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sukatta U, Haruthaithanasan V, Chantarapanont W, Dilokkunanant U, Suppakul P. 2008. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. *Agriculture and Natural Resources* 42: 169-174.
- Tapia-Rodríguez A, Ramírez JF, Salgado ML, Castañeda A, Maldonado FI, Lara AV. 2020. Distribución espacial de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en aguacate en el Estado de México, México. *Revista Argentina de Microbiología* 52: 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.004>
- Usano-Aleman J, Palá-Paúl J, Santa-Cruz Rodríguez M, Herraiz-Peñalver D. 2014. Chemical description and

- essential oil yield variability of different accessions of *Salvia lavandulifolia*. *Natural Product Communications* 9: 273-276. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900236>
- Villanueva-Arce R, Yáñez-Morales MJ, Hernández-Anguiano AM. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia* 42: 689-701.
- Wang S-Y, Chen P-F, Chang S-T. 2005 Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresources Technology* 96: 813-818. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.010>
- Weir BS, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, Academic Press. P. 315-322.
- Wilcox D, Dove B, McDavid D, Greer D. 2002. *Image Tool Version 3: Users' Guide*. University of Texas. San Antonio, Estados Unidos.
- Zambonelli A, D'Aulerio AZ, Severi A, Benvenuti S, Maggi L, Bianchi A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research* 16: 69-74. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698653>