

# EFFECTO INHIBITORIO DE ACEITES ESENCIALES EN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Penicillium digitatum* (PERS.) SACC. AISLADO DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis* OSBECK)

## INHIBITORY EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE MYCELIAL GROWTH OF *Penicillium digitatum* (PERS.) SACC. ISOLATED FROM SWEET ORANGE (*Citrus sinensis* OSBECK)

Fatima L. **Gandarilla-Pacheco**<sup>2</sup>, Stephanie **Torres-Caraballo**<sup>1</sup>, Erick J. de **Luna-Santillana**<sup>3</sup>, Isela **Quintero-Zapata**<sup>2</sup>, Nancy **Arroyo-González**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico, Centro de Enseñanza e Investigación en Biotecnología y Agrobiotecnología, 2250. Boulevard. Luis A. Ferre Aguayo, Ponce, Puerto Rico. (nancy\_arroyo@puopr.edu). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Avenida Pedro de Alba s/n cruz con Avenida Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. <sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Medicina de Conservación. Boulevard del Maestro s/n esquina Elías Piña, Colonia Narciso Mendoza, 88710, Reynosa, Tamaulipas, México.

### RESUMEN

La incidencia de patologías fúngicas en frutos poscosecha o en almacenamiento, o ambos, aún es un problema en la actualidad debido a las grandes pérdidas que ocasionan a productores y comercializadores de estos productos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto inhibitorio de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), guanábana (*Annona muricata*), jengibre (*Zingiber officinale*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y salvia (*Salvia officinalis*) a diferentes concentraciones sobre una cepa nativa de *Penicillium digitatum* como un alternativa orgánica al uso de fungicidas de origen sintético. Para obtener la cepa se seleccionaron frutos de localidades productoras de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) en Puerto Rico. Las pruebas de inhibición con aceites esenciales se hicieron en una cepa de la localidad de Guayanilla con identificación morfológica y molecular. Las pruebas de inhibición se realizaron *in vitro* e *in vivo*. El diseño experimental fue completamente al azar y las medias se compararon con la prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Tres métodos de inoculación *in vitro* se utilizaron con los aceites esenciales en el medio de cultivo en concentraciones diferentes. Además, *in vivo* se trató al hongo en su ambiente natural con los aceites que mostraron más de 90% de inhibición en los métodos *in vitro*. Los

### ABSTRACT

The incidence of fungal diseases in post-harvest fruits, in storage, or both, is still a problem today due to the large losses caused to producers and merchandisers of these products. Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the inhibitory effect of essential oils of basil (*Ocimum basilicum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove (*Syzygium aromaticum*), soursop (*Annona muricata*), ginger (*Zingiber officinale*), mint (*Mentha piperita*), oregano (*Origanum vulgare*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) at different concentrations on a native strain of *Penicillium digitatum* as an organic alternative to the use of synthetic fungicides. In order to obtain the strain, fruits from localities producing sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) in Puerto Rico were selected. Inhibition tests with essential oils were performed on a strain from the Guayanilla locality with morphological and molecular identification. Inhibition tests were performed *in vitro* and *in vivo*. The experimental design was completely randomized, and the means were compared with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Three *in vitro* inoculation methods were used with the essential oils in the culture medium at different concentrations. In addition, the fungus was treated *in vivo* in its natural environment with the oils that showed more than 90% inhibition in the *in vitro* methods. Cinnamon, clove and oregano leaf and bark oils inhibited 90 to 100% of *P. digitatum* development. Oils of basil, soursop, ginger, mint, rosemary, and sage inhibited little or not at all the fungal growth. There were some differences *in vivo* regarding *in vitro* methods, since only clove oil maintained similar levels to

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2018. Aprobado: mayo, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 209-225. 2020.

aceites de hoja y corteza de canela, clavo y orégano inhibieron 90 a 100% el desarrollo de *P. digitatum*. Los aceites de albahaca, guanábana, jengibre, menta, romero y salvia inhibieron poco o nada el desarrollo del hongo. *In vivo* hubo algunas diferencias respecto a los métodos *in vitro*, pues solo el aceite de clavo mantuvo niveles similares al control *in vivo* e *in vitro*; ya que los frutos tratados no mostraron contaminación con *P. digitatum* a los 7 y 14 d.

**Palabras clave:** aceites esenciales, *Citrus sinensis*, canela, clavo, efecto inhibitorio, *Penicillium digitatum*.

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos son uno de los frutos más producidos en el mundo debido a su sabor, nutrientes y disponibilidad generalizada (Liu *et al.*, 2012). Por su gran contenido de agua y composición de nutrientes, los cítricos son susceptibles a la infección por patógenos microbianos durante el período comprendido entre la cosecha y el consumo (Tripathi y Dubey, 2003) porque se almacenan antes de llegar al mercado; y por lo tanto al consumidor final. El período de almacenamiento es el tiempo crítico para la conservación de los cítricos por las condiciones de estrés biótico y abiótico a las cuales se someten (Marcet-Houben *et al.*, 2012). Dentro de los principales factores desencadenantes de estrés biótico están las enfermedades poscosecha, las cuales son uno de los principales retos de la citricultura mundial, por ello su control es uno de los aspectos más importantes en la comercialización.

Entre las pérdidas poscosecha, el 80% se atribuye a infecciones fúngicas que producen podredumbre en los frutos. *Penicillium digitatum* Sacc. es causa de la enfermedad conocida como “podredumbre verde”, cuya mayor incidencia y severidad está en los cítricos (Fogliata *et al.*, 2000). Los frutos se infectan por lesiones causadas en el tejido, ya sea por alteraciones fisiológicas (en el crecimiento del fruto) o daños mecánicos (en la recolecta o empaque del fruto) (Visintin *et al.*, 2007).

El control convencional poscosecha de las enfermedades causadas por patógenos se realiza a través de fungicidas de síntesis química como imazalil, tiabendazol y o-fenilfenol (Poppe *et al.*, 2003), fludioxonil, pirimetanilo o diferentes mezclas de estos compuestos (Ismail y Zhang, 2004). Estos productos presentan inconvenientes con impactos negativos en

the *in vivo* and *in vitro* control as the treated fruits showed no contamination with *P. digitatum* at 7 and 14 days.

**Key words:** essential oils, *Citrus sinensis*, cinnamon, clove, inhibitory effect, *Penicillium digitatum*.

## INTRODUCTION

Citrus fruits are one of the most widely produced fruits in the world because of their flavor, nutrients, and widespread availability (Liu *et al.*, 2012). Because of their high content of water and nutrient composition, citrus fruits are susceptible to infection by microbial pathogens during the period between harvest and consumption (Tripathi and Dubey, 2003) because they are stored before reaching the market; and therefore, the final consumer. The storage period is the critical time for the conservation of citrus fruits because of the biotic and abiotic stress conditions to which they are subjected (Marcet-Houben *et al.*, 2012). Among the main factors that trigger biotic stress are post-harvest diseases, which are one of the main challenges of the global citrus industry, so its control is one of the most important aspects in marketing.

Among post-harvest losses, 80% are attributed to fungal infections that cause fruit rot. *Penicillium digitatum* Sacc. is the cause of the disease known as “green rot”, which greater incidence and severity is in citrus fruits (Fogliata *et al.*, 2000). Fruits are infected by lesions caused in the tissue, either by physiological alterations (in the fruit growth) or mechanical damages (in the fruit harvest or packing) (Visintin *et al.*, 2007).

Conventional post-harvest control of diseases caused by pathogens is done through chemically synthesized fungicides such as imazalil, thiabendazole and o-phenylphenol (Poppe *et al.*, 2003), fludioxonil, pyrimethanil or different mixtures of these compounds (Ismail and Zhang, 2004). These products have drawbacks with negative impacts on health and the environment, and the restrictions imposed by international markets are greater than the maximum limits for chemical residues and the development of resistance to diseases (Holmes and Eckert, 1999). Therefore, the challenge is to develop alternative strategies that pose less risk to health and the environment for the control of post-harvest diseases in citrus fruits.

la salud y el ambiente, y las restricciones impuestas por los mercados internacionales son mayores a los límites máximos de residuos químicos y el desarrollo de resistencia a enfermedades (Holmes y Eckert, 1999). Por lo tanto, el desafío es desarrollar estrategias alternativas que representen menos riesgo para la salud y el ambiente para el control de enfermedades poscosecha en cítricos.

En años recientes se ha dedicado atención especial a la explotación de los productos de las plantas superiores como nuevos fungicidas botánicos para el manejo de enfermedades en cítricos. Más de 1340 especies de plantas son fuentes potenciales de compuestos antimicrobianos, y alrededor de 10 000 metabolitos secundarios tienen definición química como antimicrobianos (Tripathi y Dubey, 2003). Los aceites esenciales son compuestos naturales, volátiles y complejos conocidos por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y medicinales (Bakkali *et al.*, 2008). En consecuencia, la investigación de sustancias bioactivas de origen vegetal para desarrollar fungicidas se ha intensificado. Un conjunto amplio de aceites esenciales de plantas (Daferera *et al.*, 2000; Gómez-Sánchez y López-Malo 2009; Louhibi *et al.*, 2016) se han probado *in vitro* e *in vivo* para detectar la actividad antifúngica sobre una amplia variedad de hongos fitopatógenos.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto inhibitorio de aceites esenciales de albahaca, canela, clavo, guanábana, jengibre, menta, orégano, romero y salvia con diferentes concentraciones y por tres métodos de inoculación en medio de cultivo, sobre el desarrollo de una cepa nativa de *P. digitatum* aislada de naranja dulce, como posibles controladores de la podredumbre verde causada por este microorganismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento

Las cepas de *P. digitatum* se aislaron de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) procedentes de seis localidades en Puerto Rico (Cuadro 1). Los frutos se lavaron y desinfectaron con NaClO al 1% en agua bidestilada durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada. Una vez finalizado el proceso de desinfección, con una asa bacteriológica se tomaron muestras y se sembraron en placas de agar papa dextrosa (PDA), a  $25 \pm 2$  °C durante 7 d.

In recent years special attention has been given to the exploitation of higher plant products as new botanical fungicides for disease management in citrus fruits. More than 1340 plant species are potential sources of antimicrobial compounds, and about 10 000 secondary metabolites are chemically defined as antimicrobials (Tripathi and Dubey, 2003). Essential oils are natural, volatile and complex compounds known for their antimicrobial, antioxidant and medicinal properties (Bakkali *et al.*, 2008). As a result, research on bioactive substances of plant origin to develop fungicides has intensified. A wide range of plant essential oils (Daferera *et al.*, 2000; Gómez-Sánchez and López-Malo 2009; Louhibi *et al.*, 2016) have been tested *in vitro* and *in vivo* to detect antifungal activity on a wide variety of phytopathogenic fungi.

Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the inhibitory effect of essential oils of basil, cinnamon, clove, soursop, ginger, mint, oregano, rosemary and sage with different concentrations and by three methods of inoculation in culture medium, on the development of a native strain of *P. digitatum* isolated from sweet orange, as possible controllers of green rot caused by this microorganism.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation

*P. digitatum* strains were isolated from sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) from six locations in Puerto Rico (Table 1). The fruits were washed and disinfected with 1% NaClO in double-distilled water for 5 minutes and rinsed with distilled water. Once the disinfection process was finished, samples were taken with an inoculation loop and planted in potato dextrose agar plates (PDA), at  $25 \pm 2$  °C for 7 days.

### Morphological characterization of the isolates

For the identification of each isolate a colony was selected and with a sterile loop a fragment was extracted and deposited on a slide containing a drop of sterile water. Then a coverslip was placed gently pressed to disperse the inoculum and observed under the optical microscope at 40× to make observations about the microscopic morphology and discard contamination. Once this process was completed, the uncontaminated isolates were

**Cuadro 1. Localidades de Puerto Rico donde se cultiva *Citrus sinensis* Osbeck.****Table 1. Locations in Puerto Rico where *Citrus sinensis* Osbeck is cultivated.**

Localidad	Localización geográfica		Altitud (m)
Adjuntas	18° 9' 46" N	66° 43' 20" O	504
Barranquitas	18° 11' 12" N	66° 18' 23" O	601
Guayanilla	18° 1' 9" N	66° 47' 31" O	49
Moca	18° 23' 4" N	67° 6' 48" O	76
Las Marías	18° 15' 5" N	66° 59' 36" O	218
Orocovis	18° 13' 37" N	66° 23' 28" O	505

### Caracterización morfológica de los aislamientos

Para la identificación de cada aislado se seleccionó una colonia y con una asa estéril se extrajo un fragmento que se depositó sobre un portaobjetos que contenía una gota de agua estéril, luego se colocó un cubreobjetos, se presionó suavemente para dispersar el inóculo y se observó bajo el microscopio óptico a 40× para realizar observaciones acerca de la morfología microscópica y descartar contaminaciones. Una vez finalizado este proceso los aislados que no presentaron contaminación se resembraron en agar papa dextrosa (BD, N. J., EE.UU.), a  $25 \pm 2$  °C por 7 d.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar microcultivos, los cuales se examinaron cada día y al observar crecimiento se retiraron con cuidado los cubreobjetos con pinzas estériles, se colocaron en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol, se observaron al microscopio óptico a 40×, y los aislados se identificaron morfológicamente con claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998). Después se seleccionaron los aislados con clave CG1-CG3 (cultivos Guayanilla # 1-3) para su conservación en viales criogénicos (-80 °C en glicerol al 10%) e identificación molecular porque fueron los primeros que completaron el proceso de caracterización y purificación. Al demostrar morfológicamente que todos los aislados eran *P. digitatum* se seleccionó un aislado de Guayanilla clave GPD-1 para su identificación molecular.

### Identificación molecular

Para la extracción del ADN se utilizó el micelio de una colonia crecida durante 3 d en caldo papa dextrosa (BD, N. J., EE.UU.). El ADN se extrajo con la técnica Cloroformo- Octanol (Reader y Broda, 1985) a partir de micelio fresco obtenido de un cultivo de 48 h de incubación a 26 °C y una agitación de 250 rpm (New Brunswick Scientific, N. J., EE.UU.). Un fragmento de las regiones internas ITS1 e ITS4 (espaciadores internos transcritos) se amplificó entre los genes ribosomales (ADNr) 18S

reseeded on dextrose potato agar (BD, N. J., USA), at  $25 \pm 2$  °C for 7 d.

After the incubation time, microcultures were made, which were examined every day and when growth was observed, the cover slides were carefully removed with sterile tweezers, placed on a slide with a drop of lactophenol blue, observed under the optical microscope at 40×, and the isolates were identified morphologically with taxonomic keys by Barnett and Hunter (1998). Isolates with CG1-CG3 key (Guayanilla # 1-3 cultures) were then selected for preservation in cryogenic vials (-80 °C in 10 % glycerol) and molecular identification because they were the first to complete the characterization and purification process. By demonstrating morphologically that all isolates were *P. digitatum*, a key GPD-1 isolate from Guayanilla was selected for molecular identification.

### Molecular identification

The mycelium of a colony grown for 3 days in potato dextrose broth (BD, N. J., USA) was used for DNA extraction. The DNA was extracted with the Chloroform-Octanol technique (Reader and Broda, 1985) from fresh mycelium obtained from a 48 h incubation culture at 26 °C and 250 rpm shaking (New Brunswick Scientific, N. J., USA). A fragment of the ITS1 and ITS4 (internal transcribed spacers) internal regions was amplified between the ribosomal genes (rDNA) 18S - 5.8S and 5.8S - 28S by using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGG-3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

The PCR product was obtained using the Promega GoTaq DNA Polymerase system (Cat. M3005) and the reaction mixture was prepared with the following concentrations: 10 µL GoTaq Buffer (1X, 2 µM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µL of dinucleotide triphosphates (200 µM), 0.5 µL of GoTaq Polymerase (2U), 2 µL of each primer (0.2 µM), 2 µL of the DNA tempering (200 ng) and 33 µL of sterile milliQ water, for a total volume of 50 µL. The amplifications were performed in a thermal cycler (Labnet

- 5.8S y 5.8S - 28S al utilizar los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTA-GGTGAACCTGCGG- 3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

El producto de PCR se obtuvo con el sistema Promega Go-Taq DNA Polymerase (Cat. M3005) y la mezcla de reacción se preparó con las siguientes concentraciones: 10  $\mu$ L de GoTaq Buffer (1X, 2  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>), 0.5  $\mu$ L de dinucleótido trifosfatados (200  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ L de GoTaq Polymerase (2U), 2  $\mu$ L de cada iniciador (0.2  $\mu$ M), 2  $\mu$ L del templado de ADN (200 ng) y 33  $\mu$ L de agua mili-Q estéril, para un volumen total de 50  $\mu$ L. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Labnet Optimax Modelo: TC9610) con un ciclo inicial de 5 min a 72 °C, y 35 ciclos que comprendieron una desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 59 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1.5 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% preparado con amortiguador Tris - Acetato - EDTA 1X y corrido en el mismo amortiguador a 87 V aproximadamente 1 hora. El producto de PCR obtenido con los iniciadores ITS 1 /ITS 4 se purificó con el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Cat. 28706). Las muestras se enviaron a EurofinsScientific® (Huntsville, AL) para secuenciarlas mediante electroforesis capilar. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con una búsqueda de secuencias homólogas con el algoritmo BLASTX<sup>2</sup>, en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La historia evolutiva se dedujo con el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA). El árbol filogenético se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon con el método de máxima probabilidad compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucró 27 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos se eliminaron. Existe un total de 471 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA v.7. (Badaluddin *et al.*, 2018.).

### Ensayos de inhibición

Los aceites esenciales utilizados se adquirieron en Edens Garden® (San Clemente, CA, EE.UU.), los cuales de acuerdo con las especificaciones del fabricante tienen un grado de pureza del 100%, libres de aditivos y se extraen por las técnicas de destilación por arrastre de vapor y prensado en frío (Cuadro 2).

Optimax Model: TC9610) with an initial cycle of 5 minutes at 72 °C, and 35 cycles comprising denaturation at 95 °C for 1 minute, alignment at 59 °C for 1 minute, and extension at 72 °C for 1.5 minute, and a final extension cycle at 72 °C for 10 minutes.

Amplifications were verified by electrophoresis in a 1% agarose gel prepared with Tris-Acetate-Edta 1X buffer and run on the same buffer at 87 V for approximately 1 hour. The PCR product obtained with ITS 1 /ITS 4 primers was purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Cat. 28706) system. The samples were sent to Eurofins Scientific® (Huntsville, AL) for sequencing by capillary electrophoresis. The nucleotide sequence obtained was compared with a search for homologous sequences with the BLASTX<sup>2</sup> algorithm, in the NCBI gene bank database (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The evolutionary history was deduced with the unweighted pair grouping method with arithmetic mean (UPGMA). The phylogenetic tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were calculated with the maximum compound probability method and expressed in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 27 nucleotide sequences. All positions that contained gaps and missing data were eliminated. There is a total of 471 positions in the final data set. The evolutionary analyses were performed in the MEGA v.7 program (Badaluddin *et al.*, 2018).

### Inhibition tests

The essential oils used were purchased from Edens Garden® (San Clemente, CA, USA), which according to the manufacturer's specifications are 100% pure, additive-free and extracted through the techniques of steam distillation and cold pressing (Table 2).

### Preparation of the inoculum

*Penicillium digitatum* was cultivated on potato dextrose agar plates at 25 ± 2 °C for 7 d. Then a spore suspension was prepared by adding 10 mL of Tween 80 at 0.1 (v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA) to each plate. The spores were removed from the mycelium with a sterile glass rod. The suspension obtained was transferred to a sterile test tube and its concentration determined, which was adjusted in a Neubauer chamber to 1 × 10<sup>5</sup> spores mL<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) until its use in *in vitro* and *in vivo* tests.

**Cuadro 2. Aceites utilizados para los ensayos de inhibición sobre *Penicillium digitatum*.**  
**Table 2. Oils used for the inhibition tests on *Penicillium digitatum*.**

Nombre común	Nombre científico	Familia	Parte utilizada
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Hoja
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> J.Presl.	Lauraceae	Corteza y hoja
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Myrtaceae	Capullo, brote
Guanábana	<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Hoja
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Zingiberaceae	Raíces
Menta	<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Toda la planta
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Hoja y tallo
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Hoja
Salvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Hoja

### Preparación del inóculo

*Penicillium digitatum* se cultivó en placas de agar papa dextrosa a  $25 \pm 2$  °C por 7 d. Después se preparó una suspensión de esporas, agregando a cada placa 10 mL de Tween 80 al 0.1 (v/v) (Sigma Aldrich, San Luis MO, EE.UU.). Las esporas se desprendieron del micelio con una varilla de vidrio estéril. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo de ensayo estéril y se determinó su concentración, la cual se ajustó en una cámara de Neubauer a  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, Pittsburgh, EE.UU.) hasta su uso en las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

### Pruebas de actividad anti fúngica *in vitro*

Las pruebas *in vitro* con los aceites esenciales y extractos en contra de *P. digitatum* se dividieron en tres métodos.

El método I fue medir el halo de inhibición del patógeno en contra de los diferentes aceites.  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> de *P. digitatum* se inocularon en placas de agar papa dextrosa y se colocaron en la campana de flujo laminar por 1 h. Luego se inocularon 20 µL al 100% (v/v) de cada uno de los aceites o extractos en el centro de las placas Petri, con un testigo positivo (inoculado) y uno negativo (sin inocular). Las placas se incubaron 7 d a  $25 \pm 2$  °C. La actividad anti fúngica de los extractos o aceites, o ambos, se evaluó midiendo la zona de inhibición en milímetros y se convirtió aritméticamente a porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo respecto al aceite utilizado. Las pruebas se realizaron por triplicado en al menos tres ocasiones.

El método II fue visualizar el crecimiento (tamaño) del patógeno cuando el aceite o extracto se incorporó previamente en el medio. De cada uno de los extractos o aceites, o ambos, se inocularon 1000 µL y 500 µL al 100% (v/v) en placas de PDA (agar papa dextrosa) antes de que el medio solidificara, y luego se colocaron en la campana de flujo laminar durante 1 h. Luego se inocularon  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> de *P. digitatum*, con un testigo

### *In vitro* anti-fungal activity tests

The *in vitro* tests with the essential oils and extracts against *P. digitatum* were divided into three methods.

Method I was to measure the inhibition halo of the pathogen against the different oils.  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> spores of *P. digitatum* were inoculated into potato dextrose agar plates and placed in the laminar flow hood for 1 hour. Then 20 µL were inoculated at 100% (v/v) from each of the oils or extracts in the center of the Petri dishes, with one positive (inoculated) and one negative (uninoculated) control. The plates were incubated for 7 d at  $25 \pm 2$  °C. The anti-fungal activity of the extracts or oils, or both, was evaluated by measuring the inhibition area in millimeters and converted arithmetically to growth inhibition percentage of fungus relative to the oil used. The tests were carried out in triplicate on at least three occasions.

Method II was to visualize the growth (size) of the pathogen when the oil or extract was previously incorporated into the medium. From each of the extracts or oils, or both, 1000 µL and 500 µL were inoculated at 100% (v/v) into PDA (dextrose potato agar) plates before the medium solidified, and then placed in the laminar flow hood for 1 hour. Then  $1 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup> of *P. digitatum* were inoculated with one positive (inoculated) and one negative (uninoculated) control and incubated for 7 d at  $25 \pm 2$  °C. The anti-fungal activity of each of the extracts or oils, or a mix of both, was assessed by measuring the radial growth in millimeters. The tests were carried out in triplicate on at least three occasions.

Method III was to measure the pathogen inhibition halo against oils at different concentrations. In potato dextrose agar medium plates,  $1 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup> of *P. digitatum* were inoculated before the medium solidified and placed in the laminar flow hood for 1 hour. The oils or extracts were then inoculated in the center of the Petri dishes: 5 µL, 20 µL and 100 µL, all from 100% (v/v), one positive (inoculated) and one

positivo (inoculado) y uno negativo (sin inocular), y se incubó 7 d a  $25 \pm 2$  °C. La actividad anti fúngica de cada uno de los extractos o aceites, o ambos, se evaluó midiendo el crecimiento radial en milímetros. Las pruebas se realizaron por triplicado en al menos tres ocasiones.

El método III fue medir el halo de inhibición del patógeno en contra de aceites a distintas concentraciones. En placas de medio agar papa dextrosa se inocularon  $1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *P. digitatum* antes de que el medio solidificara y se colocaron en la campana de flujo laminar por 1 h. Luego se inocularon los aceites o extractos en el centro de las placas Petri: 5  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$ , todos a partir de 100% (v/v), se incluyó un testigo positivo (inoculado) y uno negativo (sin inocular) y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C por 7 d. La actividad anti fúngica de los extractos, o aceites, ambos, se evaluó midiendo el halo de inhibición en milímetros. Las pruebas se realizaron por triplicado en al menos tres ocasiones.

### Pruebas de actividad anti fúngica *in vivo*

Las pruebas *in vivo* trataron al hongo en su ambiente natural, solo con el uso de aceites, con resultados superiores al 90% de inhibición en los métodos *in vitro*. Las naranjas dulces se obtuvieron en la localidad de Adjuntas a través de un proveedor local dedicado al cultivo de esa naranja. Los frutos se seleccionaron de acuerdo con su apariencia (tamaño uniforme, maduros y sin heridas o daños al tejido) para minimizar la interferencia de infecciones naturales. Las naranjas se lavaron con agua corriente, se desinfectaron en NaClO al 10% por 2 min y se enjugaron 3 min con agua destilada. Las naranjas se secaron 1 h a temperatura ambiente. Luego se les realizó una incisión en la superficie del tejido de un tamaño aproximado de 2 cm  $\times$  1 cm en cada una y se infectó cada naranja con  $1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *P. digitatum*, se secaron 1 h a temperatura ambiente, se vertió 500  $\mu\text{L}$  de aceite en la incisión realizada, y se colocaron en un ambiente aislado a  $25 \pm 2$  °C. Para esta prueba se realizaron nueve repeticiones para cada aceite (clavo, corteza de canela, hoja de canela y orégano) y sus respectivos testigos negativos (Naranja sin inocular, Naranja + aceite esencial y Naranja + fungicida marca Liqui-Cop® Fresno, CA, EE.UU.) y positivos (Naranja+ *P. digitatum* y Naranja + fungicida Liqui-Cop® +*P. digitatum*). Las lecturas de los resultados se tomaron cada 7 d dos semanas.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores promedio. Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, previa transformación angular de los resultados para introducirlos en el programa estadístico. Al cumplir con el parámetro de normalidad se realizó un ANDEVA y una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para las medias. Los datos se analizaron con

negative (uninoculated) control was included and incubated at  $25 \pm 2$  °C for 7 d. The anti-fungal activity of the extracts, oils or a mix of both, was evaluated by measuring the inhibition halo in millimeters. The tests were carried out in triplicate on at least three occasions.

### *In vivo* anti-fungal activity tests

The *in vivo* tests treated the fungus in its natural environment, using only oils, with results above 90% inhibition in the *in vitro* methods. The sweet oranges were obtained in the town of Adjuntas through a local supplier dedicated to the cultivation of that type of orange. The fruits were selected according to their appearance (uniform size, ripe and without wounds or tissue damage) to minimize the interference of natural caused infections. The oranges were washed with running water, disinfected in 10% NaClO for 2 min and rinsed for 3 min with distilled water. The oranges were dried for 1 hour at room temperature. Then, an incision of approximately 2 cm  $\times$  1 cm was made in the surface of the tissue in each one and each orange was infected with  $1 \times 10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$  of *P. digitatum*, dried for 1 h at room temperature, 500  $\mu\text{L}$  of oil were poured in the incision made, and placed in an isolated room at  $25 \pm 2$  °C. For this test nine replicates were performed for each oil (clove, cinnamon bark, cinnamon leaf, and oregano) and their respective negative (Uninoculated Orange, Orange + Essential Oil, and Orange + Liqui-Cop® brand fungicide, CA, USA) and positive (Orange + *P. digitatum* and Orange + Liqui-Cop® brand fungicide +*P. digitatum*) controls. Results readings were taken every 7 d for two weeks.

### Statistical Analysis

The results were expressed as average values. In order to verify the normality of the data, the Kolmogorov-Smirnov test was performed before the results were angularly transformed and entered into the statistical program. When the normality parameter was met, an ANOVA and a Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) were performed for the means. The data were analyzed with the program IBM SPSS® v.19 Inc., New York, USA. The experiments were performed in triplicate and repeated at least three times.

## RESULTS AND DISCUSSION

The comparative analysis of the ITS1-ITS4 sequence of amplified DNA was 550 bp and showed maximum identity with ITS sequences of several *P. digitatum* isolates. The *P. digitatum* sequence obtained with the ITS1 primer showed 99% identity and 100% coverage with sequences

el programa IBM SPSS® v.19 Inc., Nueva York, EE.UU. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en tres ocasiones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis comparativo de la secuencia ITS1-ITS4 de ADN amplificado fue de 550 pb y mostró identidad máxima con secuencias ITS de varios aislamientos de *P. digitatum*. La secuencia de *P. digitatum* obtenida con el iniciador (primer) ITS1 mostró identidad del 99% y cobertura del 100% con secuencias correspondientes a *P. digitatum* (Gen Bank no. acceso KX394552.1, KY944995.1, KY859376.1, KY558584.1, KU375675.1). La secuencia del fragmento amplificado se depositó en la base de datos del NCBI con el número de acceso MF509814.1. La secuencia de *P. digitatum* obtenida con el iniciador ITS4 mostró identidad del 99% y cobertura del 100% con secuencias correspondientes a *P. digitatum* (Gen Bank no. acceso KY858376.1, AY924259.1, AB479307.1, AF455394.1, AU373910.1) (Figura 1).

corresponding to *P. digitatum* (Gen Bank access no. KX394552.1, KY944995.1, KY859376.1, KY558584.1, KU375675.1). The sequence of the amplified fragment was deposited in the NCBI database under access number MF509814.1. The *P. digitatum* sequence obtained with the ITS4 initiator showed 99% identity and 100% coverage with sequences corresponding to *P. digitatum* (Gen Bank access no. KY858376.1, AY924259.1, AB479307.1, AF455394.1, AU373910.1) (Figure 1).

In inhibition tests with Method I, only oils of basil, cinnamon leaf and bark, clove and oregano showed antifungal activity on *P. digitatum*, while oils of soursop, ginger, mint, rosemary and sage did not, as they allowed the growth of the pathogen in the whole test plate. The oil of oregano completely inhibited the growth of the fungus (Table 3). Regarding Method II, the oils of clove, cinnamon leaf and bark, and oregano at a concentration of 500 and 1000 µL incorporated into the medium, completely inhibited the growth of the pathogen, while the other oils showed varying mycelial inhibition values

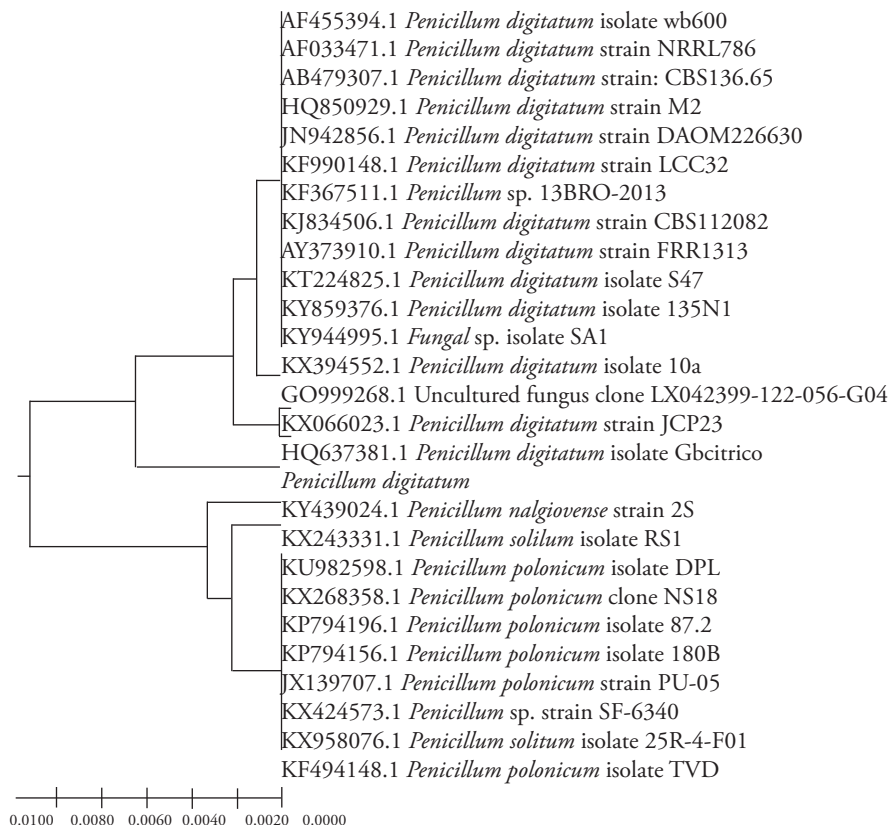


Figura 1. Relaciones evolutivas entre taxones para *Penicillium digitatum*.  
 Figure 1. Evolutionary relationships between taxa for *Penicillium digitatum*.

En las pruebas de inhibición con el método I solo los aceites de albahaca, hoja y corteza de canela, clavo y orégano mostraron actividad antifúngica sobre *P. digitatum*, mientras que los aceites de guanábana, jengibre, menta, romero y salvia no la mostraron, pues permitieron el crecimiento del patógeno en la totalidad de la placa de ensayo. El aceite de orégano inhibió por completo el crecimiento del hongo (Cuadro 3). Respecto al método II, en una concentración de 500 y 1000  $\mu\text{L}$  de aceite incorporado al medio, los aceites de clavo, hoja y corteza de canela, y orégano inhibieron por completo el crecimiento del patógeno, mientras que los demás aceites mostraron valores de inhibición micelial variables en una concentración de 1000  $\mu\text{L}$  de aceite. En la concentración de 500  $\mu\text{L}$ , el aceite de menta mostró un ligero efecto sobre el hongo, pero los aceites de albahaca, guanábana, jengibre, romero y salvia no mostraron ningún efecto y permitieron el crecimiento del hongo en toda la placa (Cuadro 4).

En el método III con 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los aceites de clavo, corteza de canela, hoja de canela y orégano, estos mostraron 90% de efecto inhibitorio; mientras que en las concentraciones de 5 y 20  $\mu\text{L}$  el efecto inhibitorio se mantuvo en un intervalo de 49.68 a 66.59%. El aceite de orégano fue el único que mostró un 90% de inhibición del crecimiento micelial de *P. digitatum* en las tres concentraciones (Cuadro 4).

Los resultados *in vivo* mostraron diferencias respecto a los métodos *in vitro*, ya que con el aceite de hoja de canela, el 11% de los frutos tratados presentó un leve crecimiento de *P. digitatum* en su superficie. Sin embargo, no se pudo medir debido a un crecimiento no uniforme. A los 14 d este crecimiento pudo medirse y alcanzó 3 cm en la superficie del fruto (Figura 2). Con el aceite de corteza de canela el 11% de los frutos tratados a los 7 d mostró un crecimiento promedio de 1 cm de *P. digitatum*, y el 60% tuvo un crecimiento promedio de 2.87 cm a los 14 d (Figura 3). Mientras que en el aceite de orégano solo el 11% de los frutos tratados a los 14 d mostró un crecimiento abundante, no uniforme, en la incisión y en la superficie del fruto (Figura 4). Respecto al aceite de clavo ninguno de los frutos mostró contaminación por *P. digitatum* a los 7 o 14 d (Figura 5).

En nuestro estudio se utilizaron diferentes métodos de inoculación *in vitro* así como pruebas *in vivo* para comprobar la efectividad de aceites esenciales

**Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* para cada uno de los aceites esenciales probados por medio de dos métodos de inoculación.**

**Table 3. Percentage of mycelial growth inhibition of *Penicillium digitatum* for each of the essential oils tested by two inoculation methods.**

Aceite	Método I	Método II	
		1000 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
Albahaca	77.15 d	33.22 c	0.0
Hoja de canela	61.71c	100 e	100
Corteza de canela	46.34 b	100 e	100
Clavo	51.24 b	100 e	100
Guanábana	0.0 a	17.05 a	0.0
Jengibre	0.0 a	18.55b	0.0
Menta	0.0 a	67.72 d	0.0
Orégano	100 e	100 e	100
Romero	0.0 a	14.96 a	0.0
Salvia	0.0 a	22.52 b	0.0

Valores medios con letra distinta indican diferencia estadística (Tukey  $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letters indicate statistical difference (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

at a concentration of 1000  $\mu\text{L}$  of oil. At the 500  $\mu\text{L}$  concentration, mint oil showed a slight effect on the fungus, but oils of basil, soursop, ginger, rosemary and sage showed no effect and allowed the fungus to grow throughout the plate (Table 4).

In Method III, with 100  $\mu\text{L}$  of each of the oils of clove, cinnamon bark, cinnamon leaf and oregano, they showed 90% inhibitory effect; while in the concentrations of 5 and 20  $\mu\text{L}$  the inhibitory effect

**Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* en tres concentraciones diferentes de aceites esenciales.**

**Table 4. Percentage of mycelial growth inhibition of *Penicillium digitatum* in three different concentrations of essential oils**

Aceite	Método III		
	5 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Clavo	61.98b	54.21 a	90
Corteza de canela	54.41a	51.25 a	90
Hoja de canela	66.59 b	49.68 a	90
Orégano	90 c	90 b	90

Valores medios con letra distinta indican diferencia estadística (Tukey  $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letters indicate statistical difference (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

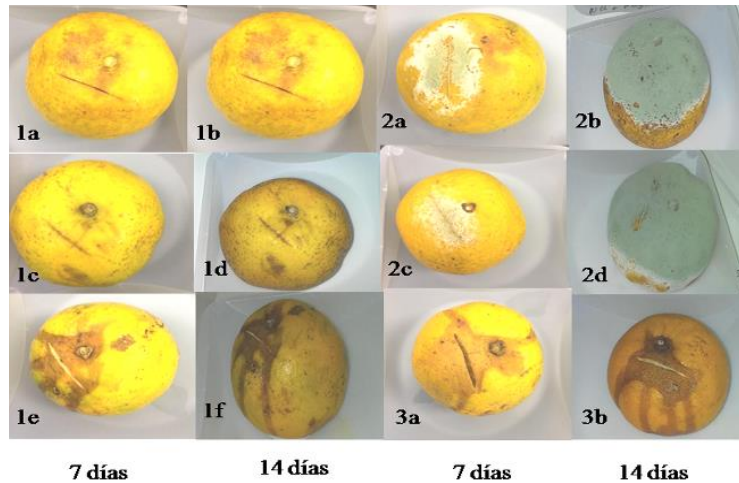


Figura 2. Pruebas *in vivo* con *Penicillium digitatum* y aceite de hoja de canela. Claves testigo negativo: (1.ab) Naranja sin inocular, (1.cd) Naranja + fungicida, (1.ef) Naranja+ aceite de hoja de canela. Claves testigo positivo: (2.ab) Naranja+ *P. digitatum*, (2.cd) Naranja+ fungicida+ *Penicillium digitatum*. Claves Tratamiento: (3.ab) Naranja + aceite de hoja de canela.

Figure 2. *In vivo* tests with *Penicillium digitatum* and cinnamon leaf oil. Negative control keys: (1.ab) Uninoculated Orange, (1.cd) Orange + fungicide, (1.ef) Orange + cinnamon leaf oil. Positive control keys: (2.ab) Orange+ *P. digitatum*, (2.cd) Orange+ fungicide+ *P. digitatum*. Treatment keys: (3.ab) Orange + cinnamon leaf oil.

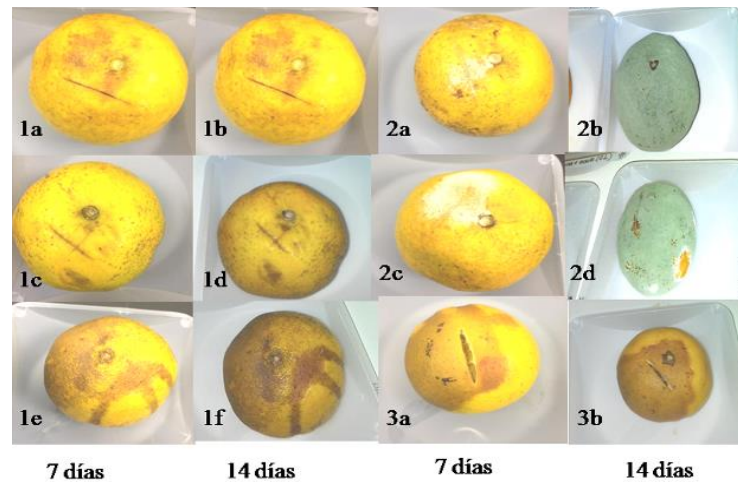


Figura 3. Pruebas *in vivo* con *Penicillium digitatum* y aceite de corteza de canela. Claves testigo negativo: (1.ab) Naranja sin inocular, (1.cd) Naranja + fungicida, (1.ef) Naranja+ aceite de corteza de canela. Claves testigo positivo: (2.ab) Naranja+ *Penicillium digitatum*, (2.cd) Naranja+ fungicida+ *Penicillium digitatum*. Claves tratamiento. (3.ab) Naranja + aceite de corteza de canela.

Figure 3. *In vivo* tests with *Penicillium digitatum* and cinnamon bark oil. Negative control keys: (1.ab) Uninoculated orange, (1.cd) Orange + fungicide, (1.ef) Orange + cinnamon bark oil. Positive control keys: (2.ab) Orange+ *P. digitatum*, (2.cd) Orange+ fungicide+ *P. digitatum*. Treatment keys. (3.ab) Orange + cinnamon bark oil.

de plantas sobre el desarrollo de *P. digitatum*. Los resultados de las pruebas *in vitro* mostraron que los aceites de clavo, hoja y corteza de canela y orégano mostraron efectividad contra *P. digitatum*, hasta llegar

remained in the range of 49.68 to 66.59%. Oregano oil was the only one that showed 90% inhibition of mycelial growth of *P. digitatum* in all three concentrations (Table 4).

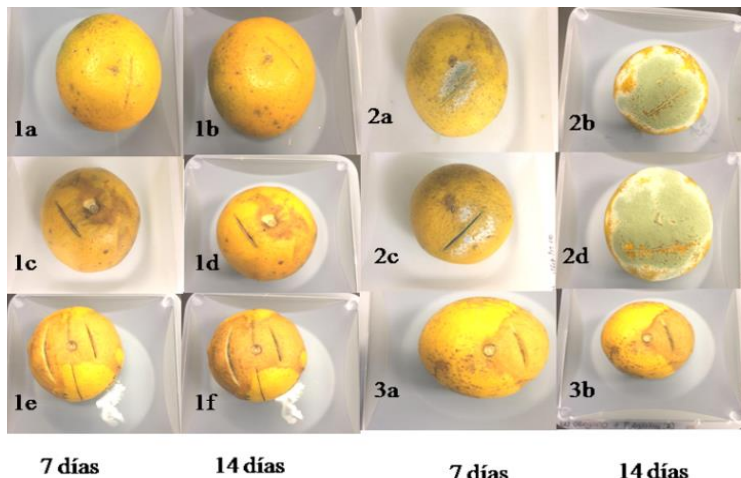


Figura 4. Pruebas *in vivo* con *Penicillium digitatum* y aceite de orégano. Claves testigo negativo: (1.ab) Naranja sin inocular, (1.cd) Naranja + fungicida, (1.ef) Naranja+ aceite de orégano. Claves testigo positivo: (2.ab) Naranja+ *Penicillium digitatum*, (2.cd) Naranja+ *Penicillium digitatum*. Claves tratamiento: (3.ab) Naranja + aceite de orégano.

Figure 4. *In vivo* tests with *Penicillium digitatum* and oregano oil. Negative control keys: (1.ab) Uninoculated orange, (1.cd) Orange + fungicide, (1.ef) Orange + oregano oil. Positive control keys: (2.ab) Orange+ *P. digitatum*, (2.cd) Orange+ fungicide+ *P. digitatum*. Treatment keys: (3.ab) Orange + oregano oil.

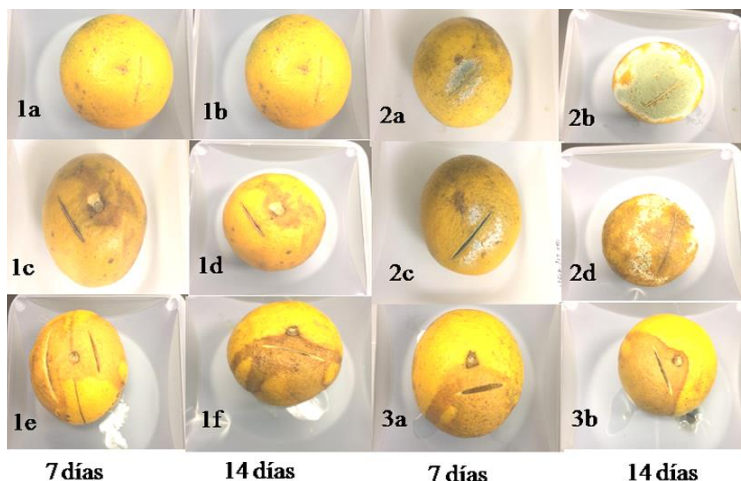


Figura 5. Ensayos *in vivo* con *P. digitatum* y aceite de clavo. Claves control negativo: (1.ab) Naranja sin inocular, (1.cd), Naranja + fungicida, (1.ef) Naranja+ aceite de clavo. Claves control positivo: (2.ab) Naranja+ *P. digitatum*, (2.cd) Naranja+ fungicida+ *P. digitatum*. Claves tratamiento: (3.ab) Naranja + aceite de clavo.

Figure 5. *In vivo* tests with *Penicillium digitatum* and clove oil. Negative control keys: (1.ab) Uninoculated orange, (1.cd), Orange + fungicide, (1.ef) Orange + clove oil. Positive control keys: (2.ab) Orange+ *P. digitatum*, (2.cd) Orange+ fungicide+ *P. digitatum*. Treatment keys: (3.ab) Orange + clove oil.

a actuar como fungicidas, mientras que el aceite de menta mostró efectividad como fungistático. Estos resultados coinciden con los reportados por Khorram *et al.* (2018), quienes señalaron que, en pruebas *in vitro* con una cepa de *P. digitatum* en una concentración de 500  $\mu$ L de aceite esencial de canela, lograron inhibir el crecimiento micelial del hongo en

The *in vivo* results showed differences from the *in vitro* methods, since with the cinnamon leaf oil, 11% of the treated fruits showed a slight growth of *P. digitatum* on their surface. However, it could not be measured due to non-uniform growth. At 14 d, this growth could be measured and reached 3 cm on the fruit surface (Figure 2). With cinnamon bark oil

un 100%. Además, Yahyazadeh *et al.* (2008) mostraron la inhibición del crecimiento de *P. digitatum* en pruebas *in vitro* en concentraciones de 600  $\mu\text{L}$  de aceite esencial de clavo.

En el mundo se ha probado la eficacia de diferentes aceites esenciales sobre *P. digitatum*, con métodos *in vitro* e *in vivo*, los cuales difieren notablemente entre ellos en la metodología específica para realizarlos. En nuestro estudio es importante enfatizar las diferencias entre los diversos métodos utilizados. Por ejemplo en los métodos I y III, el compuesto se aplicó en el centro y, por lo tanto, hubo un gradiente en la concentración del compuesto de prueba desde el centro hasta el borde de la placa de Petri. Esto significa que el resultado dependió de la habilidad del compuesto de difundirse en el agar y de la solubilidad del compuesto en el agua (Rodov *et al.*, 2011).

Lo anterior podría explicar por qué hubo variaciones en la inhibición del crecimiento de *P. digitatum* en el método III, ya que en el aceite de orégano el porcentaje de inhibición se mantuvo constante en las tres concentraciones (5, 20 y 100  $\mu\text{L}$ ) a diferencia de los otros tres aceites (aceites de clavo, corteza de canela y hoja de canela), lo cual indicaría una mejor habilidad por el aceite de orégano para difundirse en el medio. Respecto al método II al estar previamente difundido cada uno de los aceites en el medio, el porcentaje de inhibición fue 100% en ambas concentraciones (500 y 1000  $\mu\text{L}$ ) para los aceites de canela, clavo y orégano, lo cual demuestra que el método de inoculación del compuesto sí afecta la actividad inhibitoria sobre *P. digitatum*.

De acuerdo con los análisis cromatográficos proporcionados por el fabricante, los aceites de clavo y hoja de canela tienen como activo principal al eugenol, mientras que la corteza de canela presenta al cinamaldehído como compuesto principal y el aceite de orégano al carvacrol. Ben-Arfa *et al.* (2006) informaron que el carvacrol tiene 3.52 como valor de log P (la medida del comportamiento de partición de los compuestos lipofílicos en octanol / agua y en su partición en las membranas microbianas citoplásmicas). El carvacrol resulta un compuesto antimicrobiano eficiente ya que los compuestos lipofílicos poseen una alta afinidad por las membranas celulares, y sus inserciones inducen cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana.

Todo ello significa que las interacciones entre los compuestos antimicrobianos y las membranas celulares afectan el ordenamiento de los lípidos y la

11% of the fruits treated at 7 d showed an average growth of 1 cm of *P. digitatum*, and 60% had an average growth of 2.87 cm at 14 d (Figure 3). While in oregano oil only 11% of the fruits treated at 14 d showed abundant, non-uniform growth at the incision and on the fruit surface (Figure 4). In clove oil none of the fruits showed contamination by *P. digitatum* at 7 or 14 days (Figure 5).

In our study we used different methods of *in vitro* inoculation as well as *in vivo* tests to test the effectiveness of plant essential oils on the development of *P. digitatum*. The results of the *in vitro* tests showed that oils of clove, cinnamon leaf and bark and oregano were effective against *P. digitatum*, even acting as fungicides, while mint oil was effective as a fungistatic. These results match those reported by Khorram *et al.* (2018), who indicated that they were able to inhibit mycelial growth of the fungus by 100% in *in vitro* tests with a strain of *P. digitatum* in a concentration of 500  $\mu\text{L}$  of cinnamon essential oil. In addition, Yahyazadeh *et al.* (2008) showed growth inhibition of *P. digitatum* in *in vitro* tests at concentrations of 600  $\mu\text{L}$  of clove essential oil.

The effectiveness of different essential oils on *P. digitatum* has been tested worldwide, with *in vitro* and *in vivo* methods, which differ significantly from each other in the specific methodology used to make them. In our study, it is important to emphasize the differences between the various methods used. For example, in Methods I and III, the compound was applied at the center and therefore there was a gradient in the concentration of the test compound from the center to the edge of the Petri dish. This means that the result depended on the ability of the compound to diffuse on agar and the solubility of the compound in water (Rodov *et al.*, 2011).

This could explain why there were variations in the growth inhibition of *P. digitatum* in Method III, since in oregano oil the percentage of inhibition remained constant at all three concentrations (5, 20, and 100  $\mu\text{L}$ ) unlike the other three oils (clove, cinnamon bark, and cinnamon leaf oils), which would indicate a better ability for oregano oil to diffuse into the medium. Regarding Method II, since each of the oils was previously diffused in the medium, the percentage of inhibition was 100% in both concentrations (500 and 1000  $\mu\text{L}$ ) for the cinnamon, clove and oregano oils. This fact shows that the method of inoculation of the compound does affect the inhibitory activity on *P. digitatum*.

estabilidad de la bicapa, y como resultado disminuye la integridad de la membrana y aumenta el flujo pasivo de protones a través de ella. Este efecto se ha informado en compuestos con un log P mayor que 3, como el carvacrol, mientras que el eugenol mostró un log P de 2.73, el cual lo hizo menos eficaz (Ben-Arfa *et al.*, 2006).

Los aceites de albahaca, guanábana, jengibre, menta, romero y salvia fueron los menos activos sobre *P. digitatum* entre los métodos evaluados. Para el aceite de romero y salvia se reporta al 1,8 - cineol y  $\alpha$ -tujona como componentes principales. El 1, 8-cineol, también conocido como eucaliptol, es un compuesto presente en las hojas de diversas especies de eucalipto, mientras que el  $\alpha$ -tujona es el componente principal de la salvia (Porte *et al.*, 2013). Ambos compuestos, eucaliptol y  $\alpha$ -tujona, no tienen actividad sobre *P. digitatum* (Yahyazadeh *et al.*, 2008) pero sí sobre *Alternaria* sp. (Cazar *et al.*, 2014) y *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Porte *et al.*, 2013).

Es difícil atribuir la actividad biológica de mezclas naturales y complejas, como los aceites esenciales y extractos acuosos, a un componente particular. Según Bakkali *et al.*, (2008), los componentes principales reflejan las características biofísicas y biológicas de los extractos. En el aceite de jengibre usado en este estudio el principal compuesto activo es el zingibereno, en la albahaca es el linalol, en la menta el mentol y para el aceite de guanábana no hay un perfil cromatográfico de sus compuestos activos. A la albahaca y la menta se les atribuyen propiedades bactericidas, fungicidas y antioxidantes (Lemos *et al.*, 2005; Yadegarinia *et al.*, 2006). El jengibre tiene como compuesto activo al zingibereno, un sesquiterpeno con actividad antimicrobiana sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Vásquez-Ribeiro *et al.*, 2001). Respecto a la guanábana hay pocos estudios sobre la actividad de su aceite esencial o sus componentes. Pero Meccia *et al.* (2015) documentaron la composición química del aceite esencial de hojas de guanábana e identificaron 38 compuestos, entre los cuales transcariofileno (21.3%), germacreno A (14.2%), germacreno D (8.8%) y  $\alpha$ -E-bergamoteno (7.9%) fueron mayoritarios, y el trans-cariofileno puro mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*.

Es importante mencionar que no se conoce un mecanismo específico de acción acerca de cómo

According to chromatographic analyses provided by the manufacturer, clove and cinnamon leaf oils have eugenol as their main active ingredient, while cinnamon bark has cinnamaldehyde as its main compound and oregano oil has carvacrol. Ben-Arfa *et al.* (2006) reported that carvacrol has a log P value of 3.52 (the measure of the partitioning behavior of lipophilic compounds in octanol/water and their partitioning in the microbial cytoplasmic membranes). Carvacrol is an efficient antimicrobial compound since lipophilic compounds have a high affinity for cell membranes, and their insertions induce changes in the physicochemical properties of the membrane.

All the above means that interactions between antimicrobial compounds and cell membranes affect lipid sorting and bilayer stability, and as a result, membrane integrity is decreased and passive proton flow through the membrane is increased. This effect has been reported for compounds with a log P greater than 3, such as carvacrol, while eugenol showed a log P of 2.73, which made it less effective (Ben-Arfa *et al.*, 2006).

Oils of basil, soursop, ginger, mint, rosemary and sage were the least active on *P. digitatum* among the methods evaluated. For rosemary and sage oil 1.8 - cineole and  $\alpha$ -tujone are reported as main components. 1,8-cineole, also known as eucalyptol, is a compound present in the leaves of several eucalyptus species, while  $\alpha$ -tujone is the main component of sage (Porte *et al.*, 2013). Both compounds, eucalyptol and  $\alpha$ -tujone, are not active on *P. digitatum* (Yahyazadeh *et al.*, 2008) but are active on *Alternaria* sp. (Cazar *et al.*, 2014) and *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Porte *et al.*, 2013).

It is difficult to attribute the biological activity of natural and complex mixtures, such as essential oils and aqueous extracts, to a particular component. According to Bakkali *et al.*, (2008), the main components reflect the biophysical and biological characteristics of the extracts. In the ginger oil used in this study the main active compound is zingiberene, in basil it is linalol, in mint it is menthol and for soursop oil there is no chromatographic profile of its active compounds. Basil and mint are attributed with bactericidal, fungicidal and antioxidant properties (Lemos *et al.*, 2005; Yadegarinia *et al.*, 2006). The active compound of ginger is zingiberene, a

funcionan los extractos y aceites esenciales en todos y cada uno los microorganismos sensibles (Khorram *et al.*, 2018), pero una posible explicación es el efecto de permeabilidad. Los aceites esenciales son lipofílicos y esta propiedad les permite pasar de una fase acuosa a la membrana de los hongos. Esta acción conduce a la expansión de la membrana, el aumento de la fluidez y la permeabilidad, el trastorno de las proteínas de la membrana, el control de la tasa de respiración, el cambio del transporte de iones en los hongos y la pérdida de contenido celular inducido (Khan *et al.*, 2010).

Respecto a las pruebas *in vivo* solo se seleccionaron los aceites que mostraron actividad *in vitro*, es decir, el aceite de clavo, orégano, hoja y corteza de canela y se realizó una comparación con un fungicida comercial LiquiCop®. En esta prueba se observaron algunas diferencias en la efectividad con respecto a las pruebas *in vitro*. Esto puede deberse en parte a la interacción huésped-patógeno y los mecanismos de defensa involucrados por el huésped, así como las estrategias del patógeno para evadirlos. Para *P. digitatum* se han descrito factores de virulencia como la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (Jurick *et al.*, 2010), la modulación del pH del huésped (Hadas *et al.*, 2007) y la inhibición de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Macarisin *et al.*, 2007). Hay pocas referencias respecto a las enzimas degradadoras de pared celular que posee *P. digitatum*, pero se han demostrado importantes diferencias en número y en características entre las isoenzimas de poligalacturonasas producidas cuando el patógeno crece en cultivo *in vitro*, comparado con el patógeno que infecta a su huésped (Yao *et al.*, 1996).

La modificación o adaptación del ambiente del huésped por el patógeno se considera un factor importante en relación con los mecanismos de patogenicidad de los hongos patógenos de poscosecha (Prusky y Yakoby, 2003; Akimitsu *et al.*, 2004). Un factor ambiental de mayor interés en las interacciones planta-patógeno es el pH del tejido de la planta huésped. La regulación del pH del tejido huésped durante el ataque del patógeno tiene como objetivo ajustar los valores de pH a los óptimos para la actividad de las enzimas de degradación celular del patógeno. Este mecanismo asegura una correcta expresión de los genes que codifican a las enzimas de degradación celular y que sus productos se secreten en las condiciones óptimas para su funcionamiento (Eshel *et al.*, 2002).

sesquiterpene with antimicrobial activity on *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* (Vásquez- Ribeiro *et al.*, 2001). Regarding soursop there are few studies on the activity of its essential oil or its components. But Meccia *et al.* (2015) documented the chemical composition of the essential oil of soursop leaves and identified 38 compounds, among which transcariofilene (21.3%), germacrene A (14.2%), germacrene D (8.8%) and  $\alpha$ -E-bergamotene (7.9%) were the majority, and pure trans-cariofilene showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*.

It is important to mention that no specific mechanism of action is known about how extracts and essential oils work on each and every sensitive microorganism (Khorram *et al.*, 2018), but one possible explanation is the permeability effect. Essential oils are lipophilic, and this property allows them to pass from an aqueous phase to the membrane of the fungi. This action leads to membrane expansion, increased fluidity and permeability, disruption of membrane proteins, control of respiration rate, change of ion transport in fungi, and loss of induced cell content (Khan *et al.*, 2010).

For the *in vivo* tests, only those oils that showed *in vitro* activity were selected, *i.e.* oils of clove, oregano, leaf and cinnamon bark, and a comparison was made with a commercial fungicide LiquiCop®. In this test, some differences in effectiveness were observed from the *in vitro* tests. This may be due in part to host-pathogen interaction and the defense mechanisms involved by the host, as well as the strategies of the pathogen to evade those defense mechanisms. Virulence factors such as production of cell wall degrading enzymes (Jurick *et al.*, 2010), modulation of host pH (Hadas *et al.*, 2007) and inhibition of production of ROS (reactive oxygen species) have been described for *P. digitatum* (Macarisin *et al.*, 2007). There are few references to cell wall degrading enzymes possessed by *P. digitatum*, but significant differences in numbers and characteristics have been demonstrated between polygalacturonase isoenzymes produced when the pathogen is grown in culture *in vitro*, compared to the pathogen that infects its host (Yao *et al.*, 1996).

The modification or adaptation of the host environment by the pathogen is considered an important factor in relation to the mechanisms of pathogenicity of post-harvest fungi (Prusky and

Este ajuste con el ambiente coincide con lo ya descrito porque, aunque haya diferentes genes que codifiquen para las enzimas de degradación de pared celular, solo algunas se activan durante la patogenicidad *in vivo* (Prusky *et al.*, 2001). La capacidad de modificar el pH puede darse tanto al aumentarlo como al disminuirlo. Hongos como *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum* acidifican el pH del fruto al secretar diferentes ácidos orgánicos como el ácido cítrico y gluconico (Prusky y Yakoby, 2003). Además, Prusky *et al.* (2004) y Macarasin *et al.* (2007) mostraron la implicación de determinados ácidos en la patogénesis de *P. digitatum* respecto a su capacidad para reducir la producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado como mecanismo de defensa de los limones.

En nuestro estudio, la mayoría de los aceites que mostraron efectividad alta *in vitro*, en las pruebas *in vivo* permitieron el crecimiento del hongo solo en 11% de los frutos tratados, excepto el aceite de clavo que no permitió el desarrollo del hongo en ninguno de los frutos tratados; hecho notable porque incluso el fungicida Liqui-Cop® permitió el desarrollo de *P. digitatum*. Este fungicida comercial se basa en un complejo de cobre y amonio y se seleccionó porque es el fungicida que usan los productores locales de la región citrícola de Puerto Rico de manera preventiva, aunque en la hoja técnica del producto no menciona que sea activo contra la podredumbre verde causada por *P. digitatum*; eso podría explicar que en la prueba *in vivo* haya permitido el desarrollo del hongo.

## CONCLUSIONES

Las pruebas *in vitro* realizadas en nuestro estudio mostraron la capacidad de los aceites de hoja y corteza de canela, clavo y orégano para inhibir el desarrollo micelial de *P. digitatum* con variaciones entre ellos debido al método de inoculación utilizado.

En las pruebas *in vivo* el más competente como inhibidor fue el aceite de clavo porque no permitió el desarrollo del hongo en ninguno de los frutos tratados.

Estos resultados muestran que la capacidad de inhibición de los aceites esenciales puede afectarse por el método de aplicación y por las condiciones intrínsecas del huésped.

Yakoby, 2003; Akimitsu *et al.*, 2004). A major environmental factor of interest in plant-pathogen interactions is the pH of the host plant tissue. Regulation of host tissue pH during the attack of the pathogen aims to adjust pH values to reach the optimal for the activity of the pathogen's cell-degradation enzymes. This mechanism ensures a proper expression of the genes encoding the cell-degradation enzymes and that their products are secreted under optimal conditions for their operation (Eshel *et al.*, 2002).

This adjustment with the environment is consistent with that already described because, although there are different genes which encode for cell wall degradation enzymes, only some are activated during pathogenicity *in vivo* (Prusky *et al.*, 2001). The ability to modify pH can occur both with increasing and decreasing pH. Fungi such as *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum* acidify the pH of the fruit by secreting different organic acids such as citric acid and gluconic acid (Prusky and Yakoby, 2003). In addition, Prusky *et al.* (2004) and Macarasin *et al.* (2007) showed the involvement of certain acids in the pathogenesis of *P. digitatum* regarding their ability to reduce the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated as a defense mechanism of lemons.

In our study, most of the oils that showed high effectiveness *in vitro*, allowed the growth of the fungus in only 11% of the treated fruits in the *in vivo* tests, except the clove oil which did not allow the development of the fungus in any of the treated fruits. A remarkable fact because even the fungicide Liqui-Cop® allowed the development of *P. digitatum*. This commercial fungicide is based on a copper-ammonium compound and was selected because it is the fungicide used by local growers in the citrus region of Puerto Rico in a preventive manner, although there is no mention that it is active against green rot caused by *P. digitatum* in the product's technical data sheet; this could explain why in the *in vivo* test it allowed the development of the fungus.

## CONCLUSIONS

*In vitro* tests performed in our study showed the capacity of oils from cinnamon leaf and bark, clove

## AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico (Proyectos 2013-2017), al Departamento de Agricultura de Puerto Rico (año 2014) y al Banco Santander (beca del año 2017), por el financiamiento de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Akimitsu, K., A. Isshiki, K. Ohtani, H. Yamamoto, D. Eshel, and D. Prusky. 2004. Sugars and pH: a clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 271-275.
- Badaluddin, N.A., S.N. Tan Jamaluddin, N.S. Ihsam, M.H. Sajili, and N.A. Mohamed. 2018. Molecular Identification of Isolated Fungi from Kelantan and Terengganu Using Internal Transcribed Spacer (ITS) Region. *J. Agrobiotech.* 9:230-239.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition. APS Press. St. Paul. 218 p.
- Ben Arfa A., S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard and P. Chalier. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 149-154.
- Daferera, D. J., B. N. Ziogas, and M. G. Polissiou. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2576-2581.
- Eshel, D., I. Miyara, T. Ailing, A. Dinooor, and D. Prusky. 2002. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* persimmon fruit. *Mol. Plant Microbe In.* 15: 774-779.
- Fogliata, M. G., G. J. Torres-Leal, and L. D. Ploper. 2000. Behaviour of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. against fungicides currently employed in citrus packinghouses and alternative fungicides in Tucumán Province, Argentina. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congress.* Orlando, Florida, USA. pp: 1006-1008.
- Gómez- Sánchez, A. I., y A. López-Malo. 2009. Potencial antimicrobiano de los aceites de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3-1: 33-45.
- Hadas, Y, I. Goldberg, O. Pines, and D. Prusky. 2007. Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. *Phytopathology.* 97: 384-390.
- Holmes, G. J., and J. W. Eckert. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology.* 89: 716-721.
- Ismail, M. and J. Zhang. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Manag.* 15:29-35.
- Jurick, W. M., I. Vico, V. L. Gaskins, W. M. Garrett, B. D. Whitaker, W. J. Janisiewicz, and W. S. Conway. 2010. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* during postharvest decay of 'Anjou' pear. *Phytopathology.* 100: 42-48.

and oregano to inhibit the mycelial development of *P. digitatum* with variations between them due to the inoculation method used.

In the *in vivo* tests the most competent inhibitor was clove oil, because it did not allow the development of the fungus on any of the treated fruits.

These results show that the inhibition capacity of essential oils can be affected by the method of application and by the intrinsic conditions of the host.

—End of the English version—

-----\*-----

- Khan A., A. Ahmad, F. Akhtar, S. Yousuf, I. Xess, L.A. Khan, and N. Manzoor. 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 161: 816-823.
- Khorram F., A. Ramezani, and M. J. Saharkhiz. 2018. *In vitro* activity of some essential oils against *Penicillium digitatum*. *Adv. Hort. Sci.* 32: 487-493.
- Lemos, A. J., X. S. Passos, O. F. L. Fernandes, J. R. Paula, P. H. Ferri, L. K. H. Souza, A. A. Lemos, and M. R. R. Silva. 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 100: 55-58.
- Liu Y., E. Heying, and S. Tanumihardjo. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 11: 530-545.
- Louhibi, S., L. Elghadraoui, and S. Amiri. 2016. Inhibitory effect of some spice essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest green rot in citrus. *Int. J. Sci. Res.* 5: 1122-1124.
- Macarisin, D., L. Cohen, A. Eick, G. Rafael, E. Belausov, M. Wisniewski, and S. Drobny. 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue infection of citrus fruit. *Phytopathology.* 97: 1491-1500.
- Marcet-Houben, M., A. R. Ballester, B. de la Fuente, E. Harries, J. F. Marcos, L. González-Candelas and T. Gabaldon. 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics.* 13: 646.
- Meccia, G., P. Vit, L. B. Rojas, J. Carmona, B. Santiago, and A. Usubillaga. 2015. Composición química del aceite esencial de hojas frescas de *Annona muricata* L. de Mérida, Venezuela. *Rev. Fac. Farm.* 57: 2-7
- Poppe, L., S. Vanhoutte, and M. Hofte. 2003. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 963-973.
- Porte, A., R. L. O. Godoy, and L. H. Maia-Porte. 2013. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Rev. Bras. Pl. Med.* 15: 438-441.

- Prusky, D., J. L. McEvoy, B. Leverentz, and W. S. Conway 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol. Plant Microbe In.* 14: 1105-1113.
- Prusky, D., and N. Yakoby. 2003. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol. Plant Pathol.* 4: 509-516.
- Prusky, D., J. L. McEvoy, R. Saffner, W. S. Conway, and R. Jones. 2004. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology.* 94: 44-51.
- Reader, U., and P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 17-20.
- Rodov V., B. Nafussi, and S. Ben-Yehoshua. 2011. Essential oil components as potential means to control *Penicillium digitatum* Pers. (Sacc.) and other postharvest pathogens of citrus fruit. *Fresh Produce* 5: 43-50.
- Tripathi, P., and N. Dubey. 2003. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 235-245.
- Vásquez-Ribeiro O., A. Alva, and J. Marreros-Valles. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Rev. Amaz. Investig. Aliment.* 1: 38 - 42.
- Visintin, G., I. Gieco, B. García, and L. Fállico. 2007. Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. *Cienc. Docencia Tecnol.* 34: 229-242.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York.* pp: 315-322.
- Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astanesh, and I. Rasooli. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry.* 67: 1249-55.
- Yahyazadeh, M., R. Omidbaigi, R. Zare, and H. Taheri. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1445-1450.
- Yao, C. L., W. S. Conway, and C. E. Sams. 1996. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. *Phytopathology.* 86: 1160-1166.

