

# ***In vitro* antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima***

## **Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima***

**María Dolores Muy-Rangel, Jesús Rosario Osuna-Valle, Raymundo Saúl García-Estrada**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, unidad Culiacán, Carretera Eldorado Km 5.5, Colonia Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México; **Cesar San Martín-Hernández, Eber Addí Quintana-Obregón\***, CONACYT-CIAD, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán, Carretera a Eldorado Km 5.5, Colonia Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP 80110 México. \*Autor para correspondencia: eber.quintana@ciad.mx.

**Recibido:** 12 de Agosto, 2017.

**Aceptado:** 06 de Octubre, 2017.

Muy-Rangel MD, Osuna-Valle JR, García-Estrada RS, San Martín-Hernández C, Quintana-Obregón EA. 2017. *In vitro* antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1) 162-171.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1708-3

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 06, 2017.

**Resumen.** Los problemas ambientales generados por el control químico de hongos fitopatógenos, requiere de la búsqueda de alternativas amigables con el medio ambiente para su control, como el aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) para el control de *Alternaria tenuissima*. El objetivo del estudio fue caracterizar los volátiles del aceite esencial de ajo por cromatografía de gases acoplado a masas y evaluar el crecimiento radial y biomasa *in vitro* de *A. tenuissima* en presencia del aceite esencial. Se identificaron el dialil disulfuro y dialil sulfuro

**Abstract.** Due to the environmental problems generated by the chemical control of phytopathogenic fungi, it is necessary to look for alternatives for their control. The essential oil of garlic may be a viable alternative for the control of *A. tenuissima*. In this study, the volatile compounds of garlic essential oil were analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Radial growth *in vitro* and biomass of *A. tenuissima* in presence of the garlic essential oil. Diallyl disulphide and diallyl sulphide were identified in 23.64 and 20.33%, respectively, among other compounds in a smaller proportion. At a concentration of 1000 ppm, the radial growth and biomass production were inhibited 100 and 86.20%, respectively, it compared with control PDA-Tween® 80 without oil. The medium and minimum inhibitory concentrations obtained for *A. tenuissima* were 229 and 1, 023 ppm, respectively. The spore germination of the fungus was inhibited 88.89% with medium minimum concentration and 94.17% with minimum inhibitory concentration. Garlic essential oil showed antifungal capacity

en un 23.64 y 20.33%, respectivamente, entre otros compuestos en menor proporción. Con la concentración de 1,000 ppm se inhibió el crecimiento radial y producción de biomasa en 100 y 86.20%, respectivamente, comparado con el testigo PDA-Tween® 80 sin aceite. Las concentraciones media y mínima inhibitorias obtenidas para *A. tenuissima* fueron 229 y 1,023 ppm, respectivamente. Se inhibió la germinación de esporas del hongo en 88.89 y 94.17% con las concentraciones media y mínima inhibitorias, respectivamente. El aceite esencial de ajo mostró capacidad antifúngica contra *A. tenuissima* inhibiendo la germinación de esporas, crecimiento radial y la producción de biomasa.

**Palabras clave:** control, germinación de esporas, biomasa fúngica.

*Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wilshire es un hongo que causa pérdidas en la producción de cultivos como en manzano (*Malus x domestica* Borkh.), peral (*Pyrus communis* L.), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), entre otros, agudizándose el problema por la producción de toxinas (Jones y Aldwinckle, 2002; Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Agamy *et al.*, 2013). *Alternaria* es un género ampliamente distribuido en zonas agrícolas y cuenta con especies saprofitas, endofíticas y fitopatógenas. Asimismo, como producto de su actividad, se han identificado alrededor de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas y algunos pueden afectar la salud humana relacionándose en casos de alergias y cáncer de esófago (Pavón-Moreno *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, para prevenir y controlar la invasión de los hongos fitopatógenos en la agricultura se han utilizado fungicidas sintéticos (Campbell y López-Ortiz, 2014). Los más utilizados contra *Alternaria* son el azoxystrobin, difenoconazol,

against *A. tenuissima*, inhibiting spore germination, radial growth and biomass production.

**Key words:** control, spore germination, fungal biomass.

*Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wilshire is a fungus that causes losses in the production of crops such as apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear trees (*Pyrus communis* L.), broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), and others. The problem becomes more important due to the production of toxins (Jones and Aldwinckle, 2002; Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Agamy *et al.*, 2013). *Alternaria* is a widely distributed genus in agricultural areas and it has saprophytic, endophytic, and phytopathogenic species. Likewise, as a product of its activity, about 70 secondary metabolites have been identified, all toxic to plants, and some may affect human health, relating to cases of allergies and esophagus cancer (Pavón-Moreno *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2015).

Traditionally, to prevent and control of the invasion of phytopathogenic fungi in agriculture, synthetic fungicides have been used (Campbell and López-Ortiz, 2014). The most widely used against *Alternaria* are azoxystrobin, difenoconazole, mancozeb, tebuconazole, and others (Malandrakis *et al.*, 2015; Savitha and Ajithkumar, 2016). However, these fungicides have adverse effects on the environment and human health. It is therefore necessary to search for environmentally friendly alternatives for the control of phytopathogenic fungi (Blair *et al.*, 2015).

Some compounds from botanical sources have the potential to be used for the control of plant pathogens in crops of agricultural interest. Considering that about 374,000 plant species have been described, there is a wide window of

mancozeb, tebuconazole, entre otros (Malandrakis *et al.*, 2015; Savitha y Ajithkumar, 2016). Sin embargo, estos fungicidas causan efectos adversos al ambiente y a la salud humana. Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas amigables con el entorno para el control de hongos fitopatógenos (Blair *et al.*, 2015).

Algunos compuestos de fuentes botánicas tienen potencial de ser usados para el control de fitopatógenos en cultivos de interés agrícola. Considerando que se han descrito alrededor de 374,000 especies de plantas, existe un amplio campo de oportunidad para el desarrollo de antifúngicos a partir de extractos de estas plantas (Cowan, 1999; Christenhusz y Byng, 2016). Entre los compuestos de las plantas con capacidad antifúngica destacan los aceites esenciales (Isman *et al.*, 2011). Algunos de los cuales han mostrado capacidad antifúngica tales como los extractos a base de té de limón (*Cymbopogon citratus* (D.S.) Stapf.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), canela (*Cinnamomum verum* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.), entre otros (Calo *et al.*, 2015). El ajo (*Allium sativum* L.) contiene aceite esencial compuesto por aromáticos como el dialil disulfuro, dialil trisulfuro y otros compuestos azufrados con actividad antimicrobiana con potencial para ser utilizados en el control de hongos (Casella *et al.*, 2013; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012). El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo contra de *A. tenuissima*.

El estudio se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC unidad Culiacán. La cepa de *A. tenuissima* fue proporcionada por el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, previamente identificada por Quintana-Obregón *et al.* (2013), se reactivó y creció en medio papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad por siete días. Posteriormente, suspensiones de esporas con una solución de

oportunidad para el desarrollo de antifungal substances from the extracts of these plants (Cowan, 1999; Christenhusz and Byng, 2016). Among the compounds of plants with antifungal capabilities, a few that stand out are essential oils (Isman *et al.*, 2011), some of which have proven antifungal capabilities, such as those based on lemon (*Cymbopogon citratus* (D.S.) Stapf.), eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), cinnamon (*Cinnamomum verum* L.), clove teas (*Syzygium aromaticum* L.), and others (Calo *et al.*, 2015). Garlic (*Allium sativum* L.) contains an essential oil composed of aromatics such as diallyl disulfide, diallyl trisulfate and other sulfurous compounds with antimicrobial activity with a potential to be used in fungal control (Casella *et al.*, 2013; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012). The aim of this study was to evaluate the antifungal activity *in vitro* of garlic essential oil against *A. tenuissima*.

The study was conducted in the laboratories of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (Food and Development Research Center), Culiacán unit. The *A. tenuissima* strain was provided by the Department of Food Research and Postgraduate Studies of the University of Sonora, previously identified by Quintana-Obregón *et al.* (2013). It was reactivated and grown in a potato-dextrose-agar (PDA) medium at 25 °C with light periods of 12 h light-darkness for seven days. Later, spore suspensions were prepared with a Tween<sup>®</sup> 20 at 0.1% (v/v), and finally, the concentration was determined using a hematology camera, BRAND<sup>®</sup> Germany).

The garlic essential oil used was of an analytical grade (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> lot MKBB8390V). Oil volatiles were identified using a GC-7890B (Agilent Technology<sup>®</sup>, USA) gas chromatographer linked to an Agilent 240 (CG-MS) selective mass detector with an electric ionization system of 70 eV. The capillary column used was DB-5 (50 m\*0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies<sup>®</sup>,

Tween® 20 al 0.1% (v/v) fueron preparadas y finalmente se determinó la concentración mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer, BRAND® Alemania).

El aceite esencial de ajo utilizado fue grado analítico (Sigma-Aldrich® lote MKBB8390V). La identificación de volátiles del aceite se realizó mediante un cromatógrafo de gases GC-7890B (Agilent Technology®, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 240 (CG-MS) con un sistema de ionización eléctrico de 70 eV. La columna capilar utilizada fue DB-5 (50 m\*0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies®, Pennsylvania, EUA) y se acondicionó a 60 °C por 10 min. La temperatura se incrementó (20 °C/min) hasta 180 °C por 2 min y finalmente (4 °C/min) hasta 250 °C por 4.5 min. Gas acarreador helio fue utilizado a un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 220 y 280 °C, respectivamente. Los constituyentes se identificaron por comparación de índices de retención lineales con base a una mezcla de n-alcános y tiempos de retención de los espectros obtenidos con la base de datos NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

**Crecimiento Radial.** El PDA con Tween® 80 (1% v/v) se esterilizó por 15 min a 15 psi, se enfrió a 45 °C y se mezcló con aceite esencial de ajo a diferentes concentraciones (0, 10, 100, 500, 1,000 y 10,000 ppm). Adicionalmente, se preparó PDA sin Tween® 80 bajo las mismas condiciones, pero sin mezclarlo con aceite esencial de ajo, cada mezcla se depositó a razón de 15 mL en cajas de Petri de 50 mm de diámetro. Posteriormente, con una pipeta Pasteur de vidrio esterilizada se realizó una perforación de 6 mm en el centro del medio de cultivo solidificado y se inoculó con 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) de *A. tenuissima*. Finalmente, los cultivos se incubaron a 25 °C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad y se midió

Pennsylvania, USA) and it was conditioned at 60 °C for 10 min. The temperature was raised (20 °C/min) up to 180 °C for 2 min and finally (4 °C/min) up to 250 °C for 4.5 min. Helium carrier gas was used at a flow of 2 mL min<sup>-1</sup>. The temperatures of the ionization chamber and of the line of transfer were 220 and 280 °C, respectively. The constituents were identified by comparing linear retention indices based on a mixture of n-alkanes and times of retention of the spectra obtained using database NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

**Radial Growth.** The PDA with Tween® 80 (1% v/v) was sterilized for 15 min at 15 psi, then cooled at 45 °C and mixed with garlic essential oil at different concentrations (0, 10, 100, 500, 1,000 and 10,000 ppm). In addition, PDA was prepared without Tween® 80 under the same conditions, and without mixing it with garlic essential oil, each mixture was placed, 15 mL at a time, in Petri dishes with diameter of 50 mm. Later, using a sterilized glass Pasteur pipette, a 6 mm perforation was made in the center of the solidified culture medium and it was inoculated with 25 µL of the *A. tenuissima* spore solution (10<sup>5</sup> spores). Finally, the cultures were incubated at 25 °C with photoperiods of 12 h light-darkness and the radius of the fungal colony was measured every 24 h until it covered 95% of the control (PDA without Tween® 80) taken as a reference. The minimum inhibiting (CMI) and average inhibiting (CI<sub>50</sub>) conditions were determined at 120 h post-inoculation of the fungus with a Probit analysis with the statistical program NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, USA).

**Production of Biomass.** The Petri dishes with oil concentrations described above were inoculated with 25 µL of the *A. tenuissima* spore suspension (10<sup>5</sup> spores) in the central section, spreading them by surface diffusion and kept in the same

el radio de la colonia fúngica cada 24 h hasta que cubrió el 95% del testigo (PDA sin Tween® 80) tomado como referencia. Las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) se determinaron a las 120 h post-inoculación del hongo mediante análisis Probit con el programa estadístico NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, EUA).

**Producción de biomasa.** Las cajas de Petri con las concentraciones de aceite previamente descritas se inocularon con 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) de *A. tenuissima* en la parte central distribuyéndolas por medio de la técnica de difusión en superficie y se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. A las 120 h se cuantificó el peso seco de las colonias que crecieron en el medio de cultivo para lo cual el micelio se separó de la caja de Petri y se transfirió a un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada, se esterilizó y se separó el micelio con papel filtro Whatman® # 2. El papel filtro junto con el micelio se secó en una estufa de convección de aire a 105 °C por 2 h y se enfrió en un desecador. El peso seco se expresó en mg caja<sup>-1</sup> (Larralde-Corona *et al.*, 1997; López-Insunza *et al.*, 1997).

**Germinación de esporas.** Se evaluó el efecto de la CI<sub>50</sub> y CMI del aceite esencial obtenidas por análisis Probit contra las esporas de *A. tenuissima*. Para ello, se distribuyeron 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) sobre la superficie del medio de cultivo en la caja de Petri en testigos y tratamientos con aceite esencial. Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C con fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad hasta un tiempo máximo de 24 h. Se tomaron muestras aleatorias cada 4 h y se contó el número de esporas germinadas y no germinadas de un total de 200 esporas bajo un microscopio óptico. Se consideró como una espора germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue de al menos el 50% de la longitud de la espора sin germinar (Dantigny *et al.*, 2006).

conditions as described above. After 120 h, the dry weight was taken of the cultures that grew in the culture medium, and for this, the mycelium was separated from the Petri dish and transferred to a precipitate beaker with 50 mL of distilled water; it was sterilized and the mycelium was separated with Whatman® # 2 filter paper. The filter paper, along with the mycelium, was dried in an air convection oven at 105 °C for 2 h and collected in a desiccator. The dry weight was expressed in mg dish<sup>-1</sup> (Larralde-Corona *et al.*, 1997; López-Insunza *et al.*, 1997).

**Spore Germination.** An evaluation was carried out on the effect of the CI<sub>50</sub> and CMI of the essential oil obtained with a Probit analysis against the *A. tenuissima* spores. For this, 25 µL of the spore suspension (10<sup>5</sup> spores) were distributed on the surface of the culture medium in the Petri dish in controls and treatments with essential oils. The Petri dishes were incubated at 25 °C with a photoperiod of 12 h light-darkness for up to 24 h. Random samples of each were taken every 4 h and the number of germinated and not germinated spores were counted, out of a total 200 spores, under a light microscope. The spore was considered germinated when the length of the germinative tube was at least 50% as long as the not germinated spore (Dantigny *et al.*, 2006).

**Experimental Design and Statistical Analysis.** A randomized design was used in the experiment, in which the treatments were: PDA, PDA-Tween® 80 (controls) and concentrations of garlic essential oils in PDA-Tween® 80 (10, 100, 250, 500 and 1,000 ppm). The seven treatments were evaluated against *A. tenuissima*, where the experimental unit was a Petri dish. The response variables were radial growth and production of biomass. CI<sub>50</sub> and CMI were evaluated in the spore germination stage. All experiments were carried out three times. Data were analyzed using the statistical program JMP version 5.0 (SAS, 2002) for the analysis of variance

Diseño experimental y análisis estadístico. En el experimento se utilizó un diseño completamente al azar donde los tratamientos fueron: PDA, PDA-Tween® 80 (testigos) y concentraciones de aceite esencial de ajo en PDA-Tween® 80 (10, 100, 250, 500 y 1,000 ppm). Los siete tratamientos se evaluaron contra *A. tenuissima* donde la unidad experimental fue una caja de Petri. Las variables respuesta fueron crecimiento radial y producción de biomasa. Las  $CI_{50}$  y CMI se evaluaron en la etapa de germinación de esporas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico JMP versión 5.0 (SAS, 2002) para el análisis de varianza (ANVA) y las medias de los tratamientos se separaron por la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En el Cuadro 1 se muestran los principales componentes volátiles tentativos del extracto de ajo obtenidos por CG-MS con proporciones relativas  $\geq 1\%$ . Predominan compuestos con azufre en su estructura, entre los que destacan el dialil sulfuro y dialil disulfuro, los cuales son derivados de la actividad de la enzima alinasa al ser liberada por rompimiento del tejido durante la extracción de aceite (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012).

(ANOVA) and the averages of the treatments were separated using a Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

Table 1 shows the tentative main volatile components of the garlic extracts obtained by CG-MS with relative proportions  $\geq 1\%$ . There is a predominance of compounds with sulfur in their structures, some of the most important of which are diallyl sulfate and diallyl disulfate, which derive from the activity of the enzyme allinase when released by rupture from the tissue during the oil extraction (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012).

The radial growth of *A. tenuissima* in the treatment with PDA medium only covered 95% of the Petri dish after 120 h, reaching a radius of 22 mm. There were no significant differences in the radial growth in treatments PDA and PDA-Tween® 80 after 120 h. The essential oil achieved a significant reduction of the radial growth of *A. tenuissima* with concentrations equal to or greater than 250 ppm, achieving, at 1,000 ppm, an inhibition of 100% in regard to the control PDA-Tween® 80 (Table 2).

In the production of biomass, medium PDA-Tween® 80 with 10 ppm of essential oil showed a significant increase in regard to the PDA alone. However, when increasing the concentration of

**Cuadro 1. Principales compuestos del aceite esencial de ajo identificados por reconocimiento estructural mediante CG-MS<sup>x</sup>.**

**Table 1. Main components of essential garlic oil identified by structural recognition using CG-MS<sup>x</sup>.**

Tiempo de Retención (min)	Identificación	Cantidad Relativa (%)
6.867	Dialil sulfuro	20.33
8.885	1,3-Ditiano	6.1
11.205	Ciclopentano, 1-acetil-1,2-epoxi	2.51
12.144	[1,3] Ditiano-2-ona	1.15
13.784	Dialil disulfuro	23.64
14.038	2-etileden [1,3] ditiano	3.54
14.6893	Hidroxiperóxido, 1,4-dioxan-2-il	6.89
15.314	3-Vinil-1, 2-dithiaciclohex-4-ene	2.02
19.526	Ciclopenteno, 3-metil-3-(trimethylsilyl) acetil-	1.94

<sup>x</sup> Con proporciones relativas  $\geq 1\%$ . / <sup>x</sup> With relative proportions  $\geq 1\%$ .

El crecimiento radial de *A. tenuissima* en el tratamiento con medio PDA solo cubrió el 95% de la caja de Petri a las 120 h alcanzando un radio de 22 mm. Entre los tratamientos PDA y PDA-Tween® 80 no hubo diferencias significativas en su crecimiento radial a las 120 h. El aceite esencial logró una disminución significativa del crecimiento radial de *A. tenuissima* con concentraciones iguales o superiores a 250 ppm logrando a 1,000 ppm una inhibición del 100% con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2).

En la producción de biomasa, el medio PDA-Tween® 80 con 10 ppm de aceite esencial mostró un incremento significativo con respecto al PDA solo. Sin embargo, al incrementar la concentración de aceite esencial a 500 y 1,000 ppm hubo diferencias significativas con respecto a los testigos, evidenciándose inhibición sobre el crecimiento de *A. tenuissima* a estas concentraciones, siendo la inhibición de producción de biomasa de 86.20% a 1,000 ppm de aceite con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2). El incremento en biomasa en medio de cultivo con Tween® 80 a 10 ppm pudo deberse a la interacción entre el Tween® 80 y el aceite esencial. Se ha reportado que el Tween® 80 puede incrementar la permeabilidad celular favoreciendo la

essential oil to 500 and 1,000 ppm, there were significant differences with the controls, presenting inhibition on the growth of *A. tenuissima* at these concentrations, with the inhibition of biomass production being of 86.20% at 1,000 ppm of oil in regard to the control PDA-Tween® 80 (Table 2). The increase in biomass in a culture medium with Tween® 80 at 10 ppm could be due to the interaction between Tween® 80 and the essential oil. Reportedly, Tween® 80 can increase cell permeability, favoring nutrient absorption; in *Aspergillus fumigatus* it has been suggested that the compound is used as a source of carbon (Inouye *et al.*, 2001; Taoka *et al.*, 2011). Since the concentration of Tween® 80 is greater than the essential oil (10 ppm) the surface of mycelial contact is competed for by Tween® 80, reducing the antifungal activity of the oil on its own (Inouye *et al.*, 2001). When increasing the concentration of essential oil (500 and 1,000 ppm) the oil-mycelium interaction increases, favoring its bioactivity, shown by the significant reduction of biomass at 500 and 1,000 ppm in regard to the PDA-Tween® 80 control (Table 2).

The  $CI_{50}$  and CMI of 229 ppm and 1,023 ppm, respectively, were obtained from the radial growth. The kinetics of the germination of *A. tenuissima*

**Cuadro 2. Efecto antifúngico de aceite esencial de ajo a diferentes concentraciones sobre la producción de biomasa de *Alternaria tenuissima* a las 120 h.**

**Table 2. Anti-fungal effect of essential garlic oil at different concentrations on the production of biomass of *Alternaria tenuissima* after 120 h.**

Aceite esencial de ajo (ppm)	Crecimiento radial (mm) ±DE	Biomasa (mg caja <sup>-1</sup> ) ±DE
0 (PDA)	22±0.0a <sup>x</sup>	161.13±11.60c <sup>x</sup>
0 (PDA-Tween® 80)	22±0.0a	522.60±83.01b
10	22±0.0a	692.35±16.47a
100	20±2.17a	148.10±19.74cd
250	9.67±0.76b	101.00±1.13cde
500	2.83±0.56c	68.03±1.86e
1000	0±0.0d	72.10±7.23de

<sup>x</sup>Letras distintas entre columnas indican diferencias estadísticas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Valores promedio de al menos tres replicas / <sup>x</sup>Different letters between columns indicate statistical differences according to the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Average values of at least three replicas.

absorción de nutrientes, en *Aspergillus fumigatus* se ha sugerido que el compuesto es utilizado como fuente de carbono (Inouye *et al.*, 2001; Taoka *et al.*, 2011). Al ser mayor la concentración de Tween® 80 con respecto al aceite esencial (10 ppm) la superficie de contacto del micelio es competida por el Tween® 80 disminuyendo la actividad antifúngica del aceite solo (Inouye *et al.*, 2001). Al incrementar la concentración de aceite esencial (500 y 1,000 ppm) la interacción de aceite-micelio se incrementa favoreciendo su bioactividad, evidenciado por la disminución significativa de biomasa a las 500 y 1,000 ppm con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2).

A partir del crecimiento radial se obtuvo la  $CI_{50}$  y CMI de 229 ppm y 1,023 ppm, respectivamente. La cinética de germinación de esporas de *A. tenuissima* expuestas a las  $CI_{50}$  y CMI de aceite esencial de ajo (Figura 1) mostró diferencias significativas con respecto a los medios testigo (PDA y PDA-Tween® 80) con inhibiciones de germinación de esporas del 88.89 y 94.17% para  $CI_{50}$  y CMI, respectivamente.

spores exposed to the  $CI_{50}$  and CMI of garlic essential oil (Figure 1) showed significant differences with those of the control averages (PDA and PDA-Tween® 80) with spore germination inhibitors of 88.89 and 94.17% for  $CI_{50}$  and CMI, respectively.

According to Inouye *et al.* (2001), the inhibiting capacity of the volatile compounds of essential oils stands out for having three stages of fungal development: spore germination, vegetative mycelia, and reproductive mycelia. This effect of garlic essential oil has been reported in growth stages of *Aspergillus versicolor* and *Penicillium funiculosum* (Kocić-Tanackov *et al.* 2012; Li *et al.*, 2014). When evaluating the CMI of the essential oil versus *A. tenuissima*, a fungistatic effect was observed. It is possible that garlic essential oil interacts with the cell membrane, and when its concentration is reduced in time by the volatility of its components, the interaction diminishes and the fungus normalizes its metabolism. Tian *et al.* (2012) found alterations in the cell membrane of *Aspergillus flavus*, particularly ergosterol,

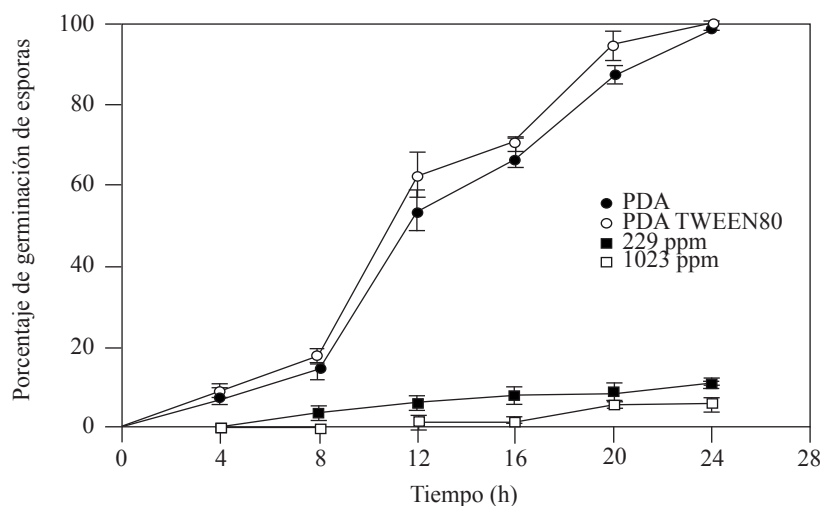


Figura 1. Cinética de germinación de esporas de *A. tenuissima* a 25 °C y fotoperiodos de 12 h en PDA, PDA-Tween® 80,  $CI_{50}$  y CMI de aceite esencial de ajo.

Figure 1. Kinetics of the germination of *A. tenuissima* spores at 25 °C and photoperiods of 12 h in PDA, PDA-Tween® 80,  $CI_{50}$  and CMI of essential garlic oil.



De acuerdo con Inouye *et al.* (2001) la capacidad inhibitoria de los compuestos volátiles de aceites esenciales se destaca por afectar tres etapas del desarrollo fúngico, la germinación de esporas, micelio vegetativo y micelio reproductor. Este efecto del aceite esencial de ajo ha sido reportado en etapas de crecimiento de *Aspergillus versicolor* y *Penicillium funiculosum* (Kocić-Tanackov *et al.* 2012; Li *et al.*, 2014). Al evaluar la CMI del aceite esencial contra *A. tenuissima* se observó un efecto fungistático. Es posible que el aceite esencial del ajo interactúe con la membrana celular y al disminuir su concentración a través del tiempo por la volatilidad de sus componentes la interacción disminuye y el hongo regulariza su metabolismo. Tian *et al.* (2012) encontraron alteraciones en la membrana celular de *Aspergillus flavus*, particularmente ergosterol al ser tratadas con eneldo (*Anethum graveolens*). El mecanismo de acción antimicrobiana de los compuestos azufrados se ha asociado la interacción con proteínas con grupos sulfhídricos de la célula y a los enlaces disulfuro que puedan formarse (El-Sayed *et al.*, 2017), es posible que la inhibición en *A. tenuissima* se deba a este tipo de interacciones químicas. No obstante, son necesarios estudios adicionales para elucidar mecanismos de interacción del aceite esencial de ajo sobre el crecimiento *in vitro* de *A. tenuissima*.

## CONCLUSIÓN

Los aceites esenciales de ajo contienen principalmente dialil sulfuro y dialil disulfuro, compuestos con capacidad antifúngica *in vitro* contra *A. tenuissima*. La  $CI_{50}$  de 229 ppm y CMI de 1,023 ppm pueden ser consideradas para evaluar su pertinencia en el control del hongo.

when treated with dill (*Anethum graveolens*). The antimicrobial action mechanism of sulfured compounds has been related the interaction with hydrogen sulfide groups of the cell and the disulfide bonds that may form (El-Sayed *et al.*, 2017); it is possible that the inhibition in *A. tenuissima* is due to this type of chemical interactions. However, additional studies are necessary to elucidate mechanisms of interaction of the garlic essential oil on the *in vitro* growth of *A. tenuissima*.

## CONCLUSIONS

Essential garlic oils contain mostly diallyl sulfide and diallyl disulfide, compounds with antifungal capacities *in vitro* against *A. tenuissima*. The  $CI_{50}$  of 229 ppm and CMI of 1,023 ppm can be considered to evaluate their pertinence in the control of the fungus.

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

## LITERATURA CITADA

- Agamy R, Alamri S, Moustafa MFM and Hashem M. 2013. Management of tomato leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* Wiltshire using salicylic acid and agrileen. International Journal of Agriculture and Biology 15: 266-272. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/profile/M\\_Hashem/publication/286315953\\_Management\\_of\\_Tomato\\_Leaf\\_Spot\\_Caused\\_by\\_Alternaria\\_tenuissima\\_Wiltshire\\_using\\_Salicylic\\_Acid\\_and\\_Agrileen/links/570e369408aec783ddd1ba7b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/M_Hashem/publication/286315953_Management_of_Tomato_Leaf_Spot_Caused_by_Alternaria_tenuissima_Wiltshire_using_Salicylic_Acid_and_Agrileen/links/570e369408aec783ddd1ba7b.pdf)
- Blair A, Ritz B, Wesseling C and Freeman LB. 2015. Pesticides and human health. Occupational and Environmental Medicine 72:81-82. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2014-102454>
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, and Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. Food Control 54: 111-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

- Campbell WB and López-Ortiz S. 2014. Sustainable Food Production Includes Human and Environmental Health, Issues in Agroecology –Present Status and Future Prospectus (vol.3). Springer Science and Business Media, New York London. 232p.
- Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F and Pistelli L. 2013. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytherapy Research* 27: 380-383. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4725>
- Christenhusz MJ and Byng JW. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261: 201-217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582. Disponible en línea: <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.long>
- Dantigny P, Bensoussan M, Vasseur V, Lebrihi A, Buchet C, Ismaili-Alaoui M. and Roussos S. 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108: 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>
- El-Sayed HS, Chizzola R, Ramadan AA, and Edris AE. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-micro emulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry* 221: 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.052>
- Fraire-Cordero ML, Nieto-Ángel D, Cárdenas-Soriano E, Gutiérrez-Alonso G, Bujanos-Muñiz R.L. y Vaquera-Huerta H. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 25-33. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003)
- Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K and Yamaguchi H. 2001. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology* 45: 201-208. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x>
- Isman MB, Miresmailli S and Machial C. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10: 197-204. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>
- Jones AL and Aldwinckle HS. 2002. Plagas y enfermedades del manzano y del peral. APS - Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 99 p.
- Kocić-Tanackov S, Dimić G, Lević J, Tanackov I, Tepić A, Vujičić B and Gvozdanović-Varga J. 2012. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *Journal of Food Science* 77: M278-M284. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02662.x>
- Larralde-Corona C, López-Insunza F, and Viniegra-González G. 1997. Morphometric evaluation of the specific growth in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology Bioengineering* 56: 287-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971105\)56:3<287::AID-BIT6>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971105)56:3<287::AID-BIT6>3.0.CO;2-F)
- Li WR, Shi QS, Liang Q, Huang XM and Chen YB. 2014. Antifungal effect and mechanism of garlic oil on *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8337-8346. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5919-9>
- López-Insunza F, Larralde-Corona CP, Viniegra-González G. 1997. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. *Chemical Engineering Science* 52: 2629-2639. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00078-X)
- Malandrakis A, Apostolidou ZA, Markoglou A, and Flouri F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology* 142: 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>
- Pavón-Moreno MÁ, González-Alonso I, Martín-de Santos R. y García-Lacarra T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1772-1781. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
- Quintana-Obregón EA, Plascencia-Jatomea M, Burgos-Hernández A, Figueroa-López P and Cortez-Rocha MO. 2013. Isolation and identification of fungi from leaves infected with false mildew on safflower crops in the Yaqui Valley, Mexico. *Revista Mexicana de Micología* 37:19-27. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a4.pdf>
- SAS. 2002. JMP Scripting Guide V.5. SAS Institute Inc. North Carolina, USA. 456p.
- Savitha AS, and Ajithkumar K. 2016. Evaluation of Newer Combination of Azoxystrobin and Tebuconazole for the Management of Purple Blotch of Onion. *Madrás Agricultural Journal* 103: 233-236. Disponible en línea: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=a17e817e-fded-4696-801c-92182ad395fb%40sessionmgr4008>
- Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S and Hayashi M. 2011. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 420-424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.010>
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y and Wang Y. 2012. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PloS One* 7: e30147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030147>
- Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ, de Vries M, Stielow JB, Thomma BPHJ and Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes?. *Studies in Mycology* 82: 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>