

Effect of alcoholic extracts of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) on the development of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Efecto de extractos alcohólicos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

María de Lourdes Adirano-Anaya, Josué Mejía-Ortiz, Isidro Ovando-Medina, Víctor Albores-Flores, Miguel Salvador-Figueroa*, Instituto de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino s/n, Colonia Solidaridad 2000, CP. 30798, Tapachula, Chiapas. *Autor para correspondencia: miguel.salvador@unach.mx.

Recibido: 16 de Mayo, 2018.

Aceptado: 17 de Julio, 2018.

Adirano-Anaya ML, Mejía-Ortiz J, Ovando-Medina I, Albores-Flores V y Salvador-Figueroa M. 2018. Effect of alcoholic extracts of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) on the development of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1805-2

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 17, 2018.

Resumen. La Sigatoka Negra es la enfermedad más destructiva del área foliar de plátanos y bananos. La incrementada resistencia del patógeno, y la contaminación provocada por los fungicidas químicos, han guiado a la búsqueda de alternativas para su control. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la combinación de los extractos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en

Abstract. Black Sigatoka is the most destructive disease of the leaves of bananas. The increased resistance of the pathogen and the contamination caused by chemical fungicides have guided the search for control alternatives. The objective of the work was to determine the effect of the combination of extracts of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) in the development of *Mycosphaerella fijiensis*. The phytopathogen was grown in potato-dextrose-agar (PDA) media added with different concentrations of extracts. A factorial design of two factors at four levels was established. At higher concentration of garlic extract, less capacity to inhibit *M. fijiensis* colony. In contrast, the clove extract showed greater inhibition capacity at the higher concentration. The greatest inhibition of the growth, 39.6%, was with the mixture of 150 mg of garlic extract·ml⁻¹ and 36 mg of clove extract·ml⁻¹.

el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*. Después de aislar a *M. fijiensis*, fue cultivado en medios agar-dextrosa-papa (ADP) adicionados con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de las plantas mencionadas. Los tratamientos utilizados fueron el resultado de establecer un diseño factorial de dos variables a cuatro niveles. Los resultados mostraron que, a mayor concentración de ajo, menor capacidad de inhibir el desarrollo de la colonia de *M. fijiensis*. Contrariamente el extracto de clavo mostró mayor capacidad de inhibición a mayor concentración. Sin embargo, la mayor inhibición del desarrollo de la colonia del fitopatógeno, 39.6%, fue observada en ADP adicionada con la mezcla de 150 mg de extracto de ajo·ml⁻¹ y 36 mg de extracto de clavo·ml⁻¹. Se discute el posible mecanismo de acción de los extractos.

Palabras clave: fitopatógeno, banano, extracto, plantas, aromáticas.

La Sigatoka Negra (SN) es una enfermedad de las hojas de bananos y plátanos producida por *Mycosphaerella fijiensis* Morlet. Esta enfermedad fue inicialmente observada en las islas Fiji y actualmente se encuentra en todas las áreas productoras de banano y plátano del mundo (Etebu y Young-Harry, 2011). En las partes enfermas de las hojas (oscurecidas) se impide el proceso de fotosíntesis y, si no hay control de la enfermedad, eventualmente la hoja muere. Limitados por fotosíntatos, los frutos maduran prematuramente y la producción disminuye (Ewané *et al.*, 2013). El control de SN es comúnmente realizado mediante la aplicación de fungicidas químicos. En América, la frecuencia anual de aplicación de los fungicidas químicos varía de 35 a 45 veces (Ploetz, 2000). Sin embargo, el aumento de la resistencia de *M. fijiensis*, los efectos residuales, el espectro de acción y la fitotoxicidad de los fungicidas químicos han orientado a

Key words: phytopathogen, banana, extract, plants, aromatic.

Black Sigatoka (BS) is a foliar disease of bananas and plantains caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. The disease was first detected in the Fiji Islands but is currently present in all banana and plantain production areas worldwide (Etebu and Young-Harry, 2011). When areas of leaves become infected, they darken, which obstructs photosynthesis, and, if the disease is not controlled, the leaves will eventually die. When limited by photosynthates, bananas and plantains ripen prematurely and production diminishes (Ewané *et al.*, 2013). Chemical fungicides are usually applied to control BS. In the Americas, the annual frequency of chemical fungicide applications ranges from 35 to 45 times (Ploetz, 2000). However, the increased resistance of *M. fijiensis* to chemical fungicides, as well as their residual effects, range of action and phytotoxicity, have made it necessary to find alternative methods for controlling BS (Bastos and Albuquerque, 2004).

Plants are the organisms that have been most extensively studied in order to counteract the harmful effects of phytopathogenic fungi. For this reason, a wide range of plants (Castillo *et al.*, 2012) and plant products (Malik *et al.*, 2016) have been reported to have fungicidal activity. Herbs and spices (aromatic plants) are the plants that have been studied the most. Both essential oils and extracts obtained from those plants using different solvents and processes have shown an antifungal effect against phytopathogens of the following genera: *Colletotrichum* (Sundaramoorthy *et al.*, 2014; Radwan *et al.*, 2014; Garcia, 2011), *Aspergillus* (Tijjani *et al.*, 2014; Askun *et al.*, 2008), *Phoma* (Touba *et al.*, 2012), *Fusarium* (Taskeen-Un-Nisa *et al.*, 2011), *Penicillium* (Daniel *et al.*, 2015; Ikeura *et al.*, 2011), *Botrytis* (Daniel *et al.*,

la búsqueda de métodos alternos de control de SN (Bastos y Albuquerque, 2004).

Las plantas son los organismos que con mayor énfasis se han estudiado para contrarrestar la acción deletérea de los hongos fitopatógenos. Por lo anterior, una amplia gama de plantas (Castillo *et al.*, 2012), y productos de plantas (Malik *et al.*, 2016) han sido reportadas por poseer actividad fungicida. Las hierbas y las especias (plantas aromáticas) son las plantas que con mayor énfasis se han estudiado. De dichas plantas, tanto los aceites esenciales como los extractos obtenidos con diferentes disolventes y procesos, han mostrado efecto antifúngico contra fitopatógenos de los géneros: *Colletotrichum* (Sundaramoorthy *et al.*, 2014; Radwan *et al.*, 2014; Garcia, 2011), *Aspergillus* (Tijjani *et al.*, 2014; Askun *et al.*, 2008), *Phoma* (Touba *et al.*, 2012), *Fusarium* (Taskeen-Un-Nisa *et al.*, 2011), *Penicillium* (Daniel *et al.*, 2015; Ikeura *et al.*, 2011), *Botrytis* (Daniel *et al.*, 2015; Sesan *et al.*, 2015) y *Alternaria* (Nashwa y Abo-Elyousr, 2012). La actividad antifúngica expresada por los aceites esenciales y los extractos ha sido reportada tanto en el crecimiento del micelio como en la germinación de esporas; (Hernández *et al.*, 2007) y puede ser biocida o bioestático (Landero *et al.*, 2013).

Para el caso de *M. fijiensis*, Gutiérrez-Jiménez *et al.* (2017) reportaron que el aceite esencial de clavo (50 a 5000 ppm en medio ADP) inhibió el crecimiento radial de la colonia entre 3.5% a 10.5%. Así mismo Sharanamma (2012) reportó que la adición de 5%, 10% y 15% de extracto de ajo (*Allium sativum*) ($1 \text{ g}_{\text{ajo}} \cdot \text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) al medio ADP inhibieron 14.8%, 18.5 % y 23.0%, respectivamente, el crecimiento de la colonia. Por su parte De Hora (2009) reportó inhibición de la germinación de las esporas de dicho fitopatógeno entre 92% y 86% en promedio, en medio ADP adicionado con 10% o 30% de aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) o eucalipto (*Eucalypto globulus*), para el primer valor, y tomillo (*Thymus vulgaris*) para el segundo.

2015; Sesan *et al.*, 2015) and *Alternaria* (Nashwa and Abo-Elyousr, 2012). Essential oils and extracts have been reported to have antifungal activity both on mycelial growth and spore germination (Hernández *et al.*, 2007); and [the activity] can be biocidal or biostatic (Landero *et al.*, 2013).

As for *M. fijiensis*, Gutiérrez-Jiménez *et al.* (2017) reported that essential clove oil (50 to 5000 ppm in agar-dextrose-potato (ADP) medium) inhibited the colony's radial growth by 3.5% to 10.5%. Sharanamma (2012) reported that adding 5%, 10% and 15% of garlic extract (*Allium sativum*) ($1 \text{ g}_{\text{garlic}} \cdot \text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) to the ADP medium inhibited the colony's growth by 14.8%, 18.5% and 23.0%, respectively. De Hora (2009) reported that the pathogen's spore germination was inhibited between 92% and 86% on average when it was grown in ADP to which 10% or 30% of essential clove (*Syzygium aromaticum*) oil or essential eucalyptus oil (*Eucalypto globulus*) were added, for the first value, and thyme (*Thymus vulgaris*) for the second.

Based on the information above, we would assume that a combination of extracts and/or essential oils of aromatic plants could be an alternative for reducing *M. fijiensis* development. However, since using a combination of two or more extracts and/or essential oils for this purpose has been underexplored, the objective of the present research was to determine the effect of a combination of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) extracts on *Mycosphaerella fijiensis* development.

MATERIALS AND METHODS

Mycosphaerella fijiensis isolates

Mycosphaerella fijiensis was isolated from banana leaves with BS symptoms, following the procedure described by Conde-Ferráez *et al.*

La información previa orienta a pensar que el empleo combinado de extractos y/o aceites esenciales de plantas aromáticas pueden ser una alternativa para disminuir el desarrollo de *M. fijiensis*, sin embargo, el empleo combinado de dos o más extractos y/o aceites esenciales con dicho fin ha sido poco explorado, por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la combinación de los extractos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis*

El aislamiento de *M. fijiensis* se realizó a partir de hojas de banano con síntomas de SN siguiendo el procedimiento descrito por Conde-Ferrández *et al.* (2008). Las hojas se lavaron con agua y detergente y posteriormente sometidas al proceso de asepsia (inmersión en hipoclorito de sodio al 5%, por 5 min, inmersión en etanol al 70%, por 5 min y enjuagadas con agua esterilizada). Las hojas fueron colocadas en bolsas de plástico, que contenían torundas de algodón saturado con agua destilada estéril e incubadas durante 48 h a 26 °C, en ausencia de luz. Al concluir el periodo de incubación, un círculo de 20 cm de diámetro de las hojas enfermas fue adherido a papel filtro esterilizado, y humedecido con agua estéril, teniendo precaución de que el envés estuviera hacia el papel. El arreglo anterior fue colocado en la tapa de la placa de Petri de forma tal que el haz de la hoja quedo frente al medio de cultivo (ADP) contenido en la base de dicha placa. La placa de Petri fue incubada a 27 °C por 12 horas. Concluido el tiempo de incubación, y bajo campana de flujo laminar, las ascosporas hialinas, de *M. fijiensis* fueron localizadas con el apoyo de un microscopio estereoscópico.

(2008). The leaves were washed with water and detergent, and then subjected to aseptic processing (they were immersed in 5% sodium hypochlorite for 5 min, in 70% ethanol for 5 min, and then rinsed with sterilized water). The leaves were placed in plastic bags containing cotton swabs saturated with sterile distilled water, and incubated at 26 °C for 48 h in darkness. Once the incubation period ended, circles 20 cm in diameter from infected leaves were stuck to filter paper sterilized and moistened with sterile water, taking care to ensure that the leaves' underside faced the paper. This array was placed on the lid of a Petri dish in such a way that the leaf surface faced the culture medium (ADP) at the base of the Petri dish. The Petri dish was incubated at 27 °C for 12 h. Once the period of incubation ended, *M. fijiensis* hyaline ascospores were spotted under a laminar flow hood using an stereoscopic microscope.

Morphological ascospore identification and characterization of the *M. fijiensis* colony

To morphologically identify *M. fijiensis* ascospores, we followed the procedure suggested by Pérez (2002). The ascospores were hyaline and spherical with a slightly constricted septum. To characterize the *M. fijiensis* colony, the ascospores were grown in ADP medium, following the procedure of Sepúlveda (2015) and Manzo-Sánchez *et al.* (2001). The colony's morphology was quasi-circular, white above and black below, and presented exudates.

Preparing garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) extracts.

The garlic extract was obtained in a Soxhlet extractor applying the reflux technique. For extraction, 45 g of fresh garlic were macerated in a porcelain mortar and placed on filter paper to form

Identificación morfológica de ascosporas y caracterización de la colonia de *M. fijiensis*.

La identificación morfológica de las ascosporas de *M. fijiensis* fue realizada siguiendo el procedimiento sugerido por Pérez (2002). Las ascosporas fueron hialinas, globosas con una leve constricción en el septo. Para la caracterización de la colonia de *M. fijiensis*, las ascosporas fueron cultivadas en medio ADP en concordancia con lo reportado por Sepúlveda (2015) y Manzo-Sánchez *et al.* (2001). La morfología de la colonia fue cuasi-circular, de color blanco en la parte superior y color negro en la inferior, con presencia de exudados.

Elaboración de extractos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*).

El extracto de ajo se obtuvo por reflujo en un equipo Soxhlet. Para lo anterior 45 g de ajo fresco, macerados en un mortero de porcelana, fueron colocados sobre papel filtro, y con ello se formó el “dedal” que se colocó en el equipo Soxhlet. Para el reflujo fue utilizado etanol al 60% (200 ml). Una vez alcanzada la temperatura de ebullición del etanol al 60%, el reflujo fue realizado por seis ciclos. Para obtener el extracto de clavo, 100 g del aromático, previamente molidos a partículas <2mm, fueron suspendidos en un litro de etanol al 96%. La mezcla fue almacenada, en obscuridad, por 28 días, con agitación manual cada 3 días. Los extractos fueron concentrados por evaporación a presión reducida, y 37 °C, en un rota-evaporador (Buchi R300), hasta sequedad. Los sólidos obtenidos fueron conservados a 6 °C, en frasco ámbar, hasta su empleo. Para el uso de los extractos, a la concentración requerida, los sólidos fueron disueltos en etanol absoluto.

a “thimble-shaped” structure that was placed in the Soxhlet. For the reflux procedure, 60% ethanol (200 ml) was used. When the boiling point of 60% ethanol was reached, the reflux was repeated for six cycles. To obtain the clove extract, 100 g of cloves previously ground to <2mm particles were suspended in one liter of 96% ethanol. The mixture was kept in darkness for 28 days, and shaken manually every three days. The extracts were concentrated by low-pressure evaporation at 37 °C in a Rotavapor (Buchi R300) until dry. The solids obtained were kept in amber jars at 6 °C until they were used. To use the extracts at the required concentration, the solids were diluted in absolute ethanol.

Treatment design.

A two-factor (garlic and clove extracts) 4² factorial design was used at four levels (extract concentration), which resulted in 16 treatments (Table 1).

Determining *M. fijiensis* growth inhibition and colony growth rate.

Mycosphaerella fijiensis growth inhibition was calculated after analyzing the area gained by the colony. For this purpose, Petri dishes (15 cm in diameter) were filled with ADP, to which the required amount of garlic and/or clove extract for each treatment was added. A disk ≈3 mm in diameter containing mycelium from the *M. fijiensis* colony, which had been previously grown in ADP culture medium, was placed in each Petri dish (four dishes per treatment). The fungus was cultured at 30 °C. Every seven days, and for a 28-day period, and the colony’s diameter was measured with a

Diseño de tratamientos

Se estableció un diseño factorial 4², de dos factores (extracto de ajo y extracto de clavo) a cuatro niveles (concentración del extracto), lo que resultó en 16 tratamientos (Cuadro 1).

Determinación de la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* y velocidad de desarrollo de la colonia.

La inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* se calculó después de analizar la ganancia en área de la colonia. Para ello se prepararon placas de Petri (15 cm de diámetro) con ADP adicionado con la cantidad de extracto de ajo y/o clavo correspondiente al tratamiento. En cada placa de Petri, cuatro por tratamiento, se colocó un disco de ≈3 mm de diámetro de micelio de la colonia de *M. fijiensis* crecida previamente en ADP. El cultivo del hongo se realizó a 30 °C. Cada 7 días, y por un periodo de 28 días, se midió el diámetro de la colonia con un calibrador digital (Mitutoyo, Digimatic, resolución 0.01 mm). Con el diámetro de colonia, el área de crecimiento fue calculada empleando la fórmula del círculo [$A \text{ (mm}^2) = \pi r^2$] y el cálculo de la inhibición (%) del tratamiento se realizó mediante la fórmula:

Inhibición (%) = $[(A_{ETI} - A_{ETN}) (A_{ETI})^{-1}] (100)$, donde

A_{ETI} = Área de crecimiento efectivo del tratamiento control (mm²) = $A_{T1n} - A_{T10}$

A_{ETN} = Área de crecimiento efectivo del tratamiento

N (mm²) = $A_{TNn} - A_{TN0}$

A_{T1n} = área de crecimiento del tratamiento control a cualquier tiempo (mm²)

A_{T10} = área de crecimiento del tratamiento control a t = 0 (mm²)

A_{TN0} = área de crecimiento de cualquier tratamiento a cualquier tiempo (mm²)

Cuadro 1. Diseño de tratamientos utilizado para determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de *M. fijiensis* de los extractos alcohólicos de clavo y ajo.

Table 1. Treatments used to determine the capacity of alcoholic clove and garlic extracts to inhibit the growth of *M. fijiensis*.

Tratamiento	Extracto de ajo (μg·ml ⁻¹)	Extracto de clavo (μg·ml ⁻¹)
1	0	0
2	0	12
3	0	24
4	0	36
5	150	0
6	150	12
7	150	24
8	150	36
9	300	0
10	300	12
11	300	24
12	300	36
13	450	0
14	450	12
15	450	24
16	450	36

digital calibrator (Mitutoyo, Digimatic, at 0.01 mm resolution). Having obtained the diameter of the colony, the growth area was calculated by applying the circle formula [$A \text{ (mm}^2) = \pi r^2$]; to calculate the treatment's inhibition (%), we used the following formula:

Inhibition (%) = $[(A_{ETI} - A_{ETN}) (A_{ETI})^{-1}] (100)$, where

A_{ETI} = Effective growth area of the control treatment

(mm²) = $A_{T1n} - A_{T10}$

A_{ETN} = Effective growth area of the N treatment

(mm²) = $A_{TNn} - A_{TN0}$

A_{T1n} = Growth area of the control treatment at any time (mm²)

A_{T10} = Growth area of the control treatment at t = 0 (mm²)

A_{TN0} = Growth area of any treatment at any time (mm²)

A_{TN0} = Growth area of any treatment at t = 0 (mm²).

A_{T_0} = área de crecimiento de cualquier tratamiento a $t = 0$ (mm^2).

La velocidad de crecimiento de la colonia ($\mu = \text{semana}^{-1}$) fue calculada como la pendiente de la relación lineal entre la transformación del valor nominal de A_{ETN} a Ln y el tiempo (semanas).

Análisis estadístico

Los valores de área de la colonia fueron sometidos al análisis de varianza, y donde existió diferencia se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$), utilizando el programa InfoStat Profesional versión 2011.

RESULTADOS

En el Cuadro 2 se muestran los valores del área de crecimiento de las colonias de *M. fijiensis* en los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo. Se puede observar que el inóculo fue de tamaño similar (semana 0) y que el crecimiento de la colonia durante la primera semana también fue similar. A partir de la segunda semana, y hasta la semana final, el área de la colonia fue diferencial. Al concluir el trabajo (semana 4), el área de las colonias de todos los tratamientos que tuvieron extracto de ajo y/o de clavo fue estadísticamente menor al del tratamiento sin extractos (Tratamiento 1). Así mismo, el área de la colonia del Tratamiento 1 fue 1.6 veces mayor respecto a la de los tratamientos 9 y 10. El análisis de la varianza de los valores del área de crecimiento de *M. fijiensis* mostró que las diferencias entre ellos fueron significativas, tanto para el extracto de clavo y el extracto de ajo, como para la combinación de ambos (Cuadro 3).

Desde la perspectiva del efecto individual de los extractos, en la Figura 1 se muestra que conforme fue aumentada la concentración del extracto de ajo, mayor fue el área promedio de crecimiento

The rate at which the colony grew ($\mu = \text{week}^{-1}$) was calculated as the slope of the linear ratio between the conversion of the nominal value of A_{ETN} to Ln and the time (weeks).

Statistical analysis.

The values of the colony area were subjected to an analysis of variance, and where differences were found, we used the Tukey's test ($\alpha < 0.05$). The analysis and tests were conducted with the InfoStat program Profesional version 2011.

RESULTS

Table 2 shows the values of the growth area of *M. fijiensis* colonies in the different treatments and sampling times. These results show that the inoculum was of similar size (week 0), and that the growth of the colony during the first week was similar too. As of the second week and up to the final week, the area of the colony was different. When the present research was concluded (week 4), the area of the colonies in all the treatments in which garlic and/or clove were used was statistically smaller than the area in the treatment with no extracts (Treatment 1). Also, the area of the colony in Treatment 1 was 1.6 times larger than the area in treatments 9 and 10. The analysis of variance for the values of *M. fijiensis* growth area showed that there were significant differences between them, for clove and garlic extracts individually, and when they were combined (Table 3).

Regarding the individual effect of the extracts, Figure 1 shows that as the garlic extract concentration increased, the average growth area of the colony increased (less inhibition). In contrast, the higher the concentration of clove extract, the greater the inhibition. In both cases, the differences were significant (Tukey $\alpha < 0.05$; DMS = 3.57).

Cuadro 2. Área de la colonia de las colonias de *M. fijiensis* crecida por cuatro semanas en medio ADP adicionado de extracto de ajo y/o clavo.

Table 2. Area of *M. fijiensis* colony after four weeks of growth in ADP medium to which garlic and/or clove extract were added.

Tratamiento	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
1	7.23 R	26.89 P	100.88 LM	193.98 CDE	264.73 A
2	6.52 R	29.38 P	97.52 MN	150.94 GHIJK	201.95 BCD
3	8.45 QR	28.26 P	97.09 MN	160.40 FGH	210.77 B
4	7.36 R	27.65 P	85.36 MN	137.74 K	194.97 BCDE
5	7.42 R	28.32 P	88.76 MN	151.82 GHIJK	194.39 BCDE
6	7.76 R	31.06 P	100.49 LM	163.20 FG	200.00 BCDE
7	7.23 R	24.36 PQ	82.05 N	142.66 IJK	168.83 F
8	8.04 QR	30.67 P	52.38 Q	88.07 MN	163.61 FG
9	7.15 R	27.03 P	92.01 MN	145.49 HIJK	185.31 E
10	6.91 R	34.95 P	90.39 MN	155.77 FGHIJ	207.61 BC
11	6.75 R	25.22 P	87.79 MN	155.31 FGHIJ	200.79 BCDE
12	7.31 R	34.26 P	92.44 MN	141.89 JK	203.32 BCD
13	7.24 R	30.87 P	115.01 L	163.47 FG	204.14 BCD
14	6.84 R	22.12 PQR	85.02 MN	148.97 GHIJK	210.16 BC
15	6.59 R	25.30 P	90.93 MN	159.60 FGH	192.00 DE
16	6.93 R	25.17 P	86.14 MN	159.00 FGHI	191.87 DE

Letras diferentes significan valores significativos [Tukey $\alpha < 0.05$; diferencia mínima significativa (DMS) = 16.05; error estándar = 5.91]. La composición del medio de cultivo del tratamiento fue ADP adicionado de extracto de ajo y/o clavo, en concordancia con el diseño estadístico / Different letters indicate significant values [Tukey $\alpha < 0.05$; significant minimum difference (DMS) = 16.05; standard error = 5.91]. The composition of the culture medium for the treatment was ADP to which garlic and/or clove extract was added, in accordance with the statistical design.

de la colonia (menor inhibición); situación contraria con el extracto de clavo ya que, en este, a mayor concentración menor área promedio de crecimiento (mayor inhibición). En ambos casos, las diferencias fueron significativas (Tukey $\alpha < 0.05$; DMS = 3.57).

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de inhibición de la colonia después de cuatro semanas de crecimiento en los medios de cultivo de los diferentes tratamientos. Todos los tratamientos mostraron capacidad de inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis* (rango de 21.0% hasta 39.6%). El mayor porcentaje de inhibición fue observado en el medio de cultivo que contenía la menor cantidad de extracto de ajo y la mayor cantidad de extracto de clavo (Tratamiento 8).

La transformación de los datos de área de la colonia (mm^2) al Ln para cada semana de cultivo

Figure 2 shows the percentage of colony inhibition after four weeks growing in the culture media of the different treatments. All treatments proved to be able to inhibit the development of the *M. fijiensis* colony (ranging from 21.0% to 39.6%). The highest inhibition percentage was observed in

Cuadro 3. Análisis de la varianza de los valores de área de colonia de *M. fijiensis* crecida en medio ADP adicionado con extracto de ajo y/o clavo.

Table 3. Analysis of variance of the values of the area of an *M. fijiensis* colony grown in ADP medium to which garlic and/or clove extract was added.

Fuente de variación	gl	F	Valor de P
Ajo	3	22.89	<0.0001
Clavo	3	23.71	<0.0001
Ajo * Clavo	9	10.5	<0.0001
Error	260		

mostró comportamientos similares para todos los tratamientos. En la Figura 3 se muestran los tratamientos extremos es decir el que tuvo las áreas más grandes, Tratamiento 1, y el que tuvo las áreas más pequeñas, Tratamiento 8. Los valores de la recta de regresión para todos los tratamientos se muestran en el Cuadro 4. Como se observa en el citado cuadro, la pendiente de la recta (m), o velocidad de crecimiento de la colonia (semana⁻¹), en todos los tratamientos, estuvieron en el rango de 0.7081 semana⁻¹ hasta 0.9177 semana⁻¹. De ese modo la velocidad de crecimiento de las colonias del Tratamiento 10 fue 23% más lenta respecto a las del Tratamiento 1. Por su parte la ordenada al origen tuvo un valor promedio de 2.3589 ± 0.07675 y, con la excepción del Tratamiento 13, todos los coeficientes de determinación fueron mayores a 0.9.

DISCUSIÓN

Al igual que muchos hongos fitopatógenos, *M. fijiensis* fue sensible a los componentes de los extractos etanólicos del ajo y clavo. El tipo de compuesto, y/o su concentración, flavonoides, fenoles,

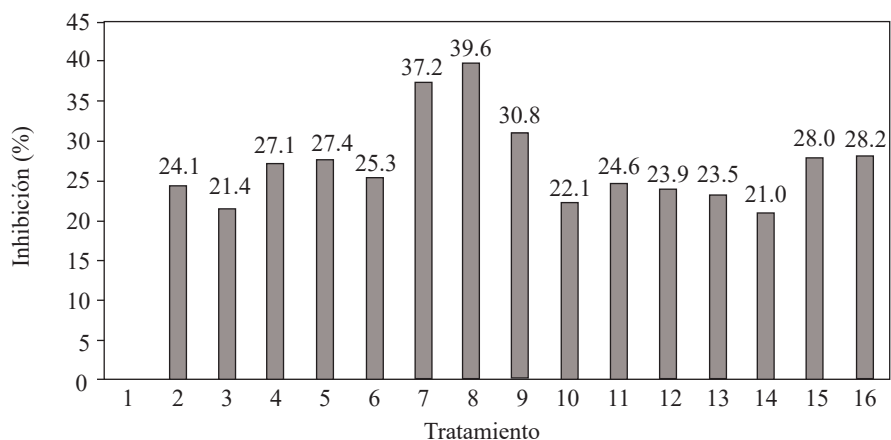


Figura 2. Inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis* (porcentaje de área), después de cuatro semanas de cultivo, en los diferentes tratamientos planteados en el Cuadro 1.

Figure 2. Growth inhibition of the *M. fijiensis* colony (% area) after four weeks of cultivation in the different treatments shown in Table 1.

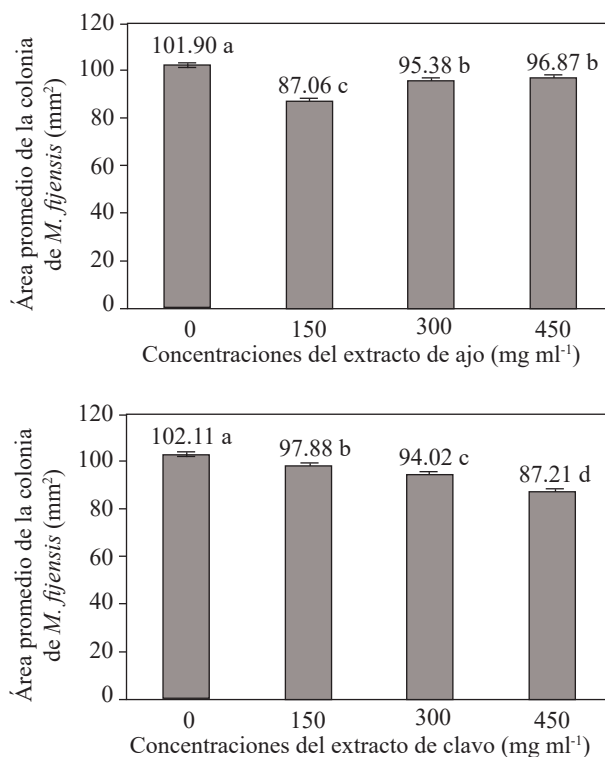


Figura 1. Área promedio de crecimiento de la colonia de *M. fijiensis* en medio de cultivo ADP adicionado con diferentes concentraciones de ajo (arriba) y clavo (abajo).

Figure 1. Average growth area of the *M. fijiensis* colony in ADP culture medium to which different concentrations of garlic (above) and clove (below) were added.

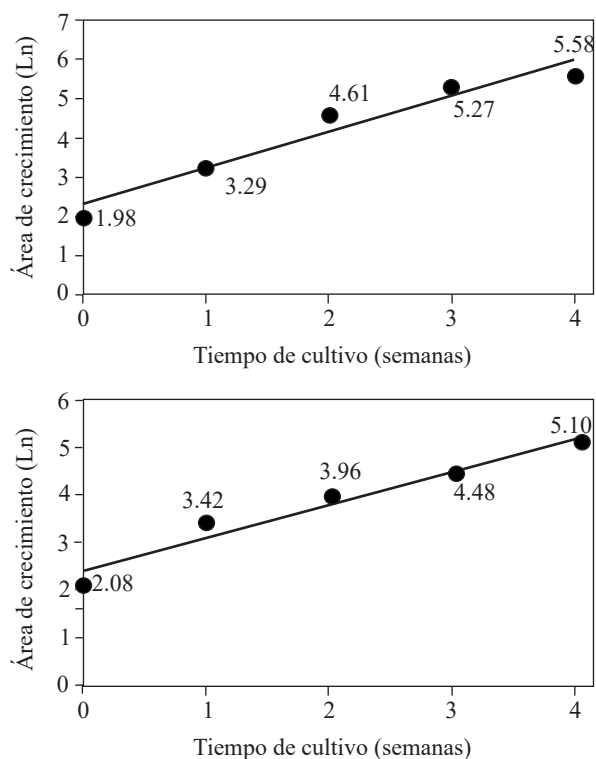


Figura 3. Correlación entre el Ln del área de la colonia de *M. fijiensis* del tratamiento sin extractos de ajo y/o clavo (Tratamiento 1, arriba) y del tratamiento con 150 µg extracto de ajo·ml⁻¹ y 36 µg extracto de clavo·ml⁻¹ (Tratamiento 8; abajo) y el tiempo de cultivo (semanas).

Figure 3. Correlation between the Ln of the *M. fijiensis* colony in the treatment without garlic and/or clove extracts (Treatment 1, above) and the treatment in which 150 µg of garlic extract ml⁻¹ and 36 µg of clove extract ml⁻¹ were used (Treatment 8; below), and growing time (weeks).

terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas, polipéptidos entre otros, pueden ser los responsables de dicha acción (Hernández *et al.*, 2007). La oxidación de diversos compuestos provocada por los fenoles, la acción lipofílica de los aceites esenciales, el intercalado de los alcaloides en el ADN, la formación de canales iónicos en la envoltura celular mediados por lectinas y la inhibición competitiva de polisacáridos receptores por adhesión de polipéptidos son algunos de los mecanismos que pudieran

Cuadro 4. Valores de la pendiente (m), o velocidad de crecimiento (semana⁻¹), ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación (r²) derivados de linealizar los datos de Ln del área de la colonia (mm²) y la semana de cultivo.

Table 4. Slope values (m) or growth rate (week⁻¹), intercept (b) and determination coefficient (r²) after linearizing Ln data from the colony area (mm²) and the cultivation week.

Tratamiento	m	B	r ²
1	0.92	2.31	0.94
2	0.85	2.33	0.91
3	0.82	2.46	0.93
4	0.82	2.36	0.93
5	0.82	2.38	0.92
6	0.82	2.47	0.91
7	0.81	2.32	0.92
8	0.71	2.39	0.95
9	0.82	2.36	0.91
10	0.83	2.42	0.91
11	0.86	2.27	0.93
12	0.81	2.45	0.91
13	0.83	2.44	0.89
14	0.88	2.21	0.94
15	0.86	2.27	0.92
16	0.85	2.29	0.9243

a culture medium containing the smallest amount of garlic extract and the greatest amount of clove extract (Treatment 8).

When data from the area of the colony (mm²) were converted to Ln for each week of culture, a similar performance was observed in all treatments. Figure 3 shows the extreme treatments, that is, the treatment with the largest areas (Treatment 1) and the one with the smallest areas (Treatment 8). The values of the regression line for all the treatments are shown in Table 4. As can be seen in the table, the slope of the line (m) or colony growth rate (week⁻¹) for all the treatments ranged from 0.7081 week⁻¹ to 0.9177 week⁻¹. Therefore, the colony growth rate of Treatment 10 was 23% slower compared to the growth rate of Treatment 1. As for the intercept, it had an average value of 2.3589 ±0.07675 and,

explicar la actividad fungicida (Cowan, 1999; Nonsee *et al.*, 2011; Rahnama *et al.*, 2012).

La mayor sensibilidad de *M. fijiensis* a la acción antifúngica del clavo (Figuras 1) puede también atribuirse a la composición y/o a la concentración de los compuestos que éste contiene. En este sentido, el aceite esencial de clavo, miscible en etanol, contiene entre otros, eugenol, acetato de eugenilo, cariofileno y a-humuleno (Costa *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012). Por su parte el ajo es rico en alicina, dialildisulfuro y dialiltrisulfuro (Campa-Siqueiros *et al.*, 2017; Chong *et al.*, 2015).

Inicialmente se esperaba que, al aumentar la concentración de los extractos de clavo y ajo, la actividad antifúngica fuera mayor. Aunque esto se cumplió para el extracto de clavo, para el extracto de ajo el comportamiento fue inverso (Figura 1), lo que corroboró los resultados reportados por Landero *et al.* (2013). Lo anterior pudiera ser explicado como un modelo de inhibición competitiva de alguna enzima donde al incrementar la concentración de extracto de ajo uno de sus componentes ocupa el lugar de aquel que tiene la actividad antifúngica. Es así que, al diluir el extracto, menor concentración, el componente competidor del antifúngico no es capaz de ocupar todos los “sitios activos” por lo que la inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis* fue menor. Los resultados de la posterior etapa (Datos no mostrados), apoyan lo propuesto previamente ya que al disminuir hasta 100 mg·ml⁻¹ la concentración del extracto de ajo la actividad antifúngica fue incrementada. En el futuro habrá que definir cuál(es) es (son) el (los) componente(s) competitivo(s) y cuál(es) es (son) el (los) sitio(s) de acción.

Por su parte el comportamiento de la actividad antifúngica del extracto de clavo (Figura 1) fue típico de moléculas que al aumentar la concentración aumentan la actividad. Sin embargo, tiene un valor máximo lo que puede ser indicativo, nuevamente,

except for Treatment 13, all the determination coefficients were higher than 0.9.

DISCUSSION

Like many phytopathogenic fungi, *M. fijiensis* was sensitive to the components of ethanolic garlic and clove extracts. The type of compound and/or its concentration, or flavonoids, phenols, terpenes, essential oils, alkaloids, lectins, polypeptides, among others, could be responsible for this action (Hernández *et al.*, 2007). Oxidation of various compounds caused by phenols, lipophilic action of essential oils, insertion of alkaloids into the DNA, formation of ionic channels in the cell envelope mediated by lectins and competitive inhibition of receptor polysaccharides by polypeptide adherence, are some of the mechanisms that may explain the fungicidal activity (Cowan, 1999; Nonsee *et al.*, 2011; Rahnama *et al.*, 2012).

The higher sensitivity of *M. fijiensis* to the antifungal action of clove (Figure 1) may also be due to the composition and/or concentration of the compounds it contains. In this regard, essential clove oil, which is miscible in ethanol, contains, among other compounds, eugenol, eugenyl acetate, caryophyllene and a-humulene (Costa *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012). Garlic is rich in alicin, diallyldisulfide and diallyltrisulfide (Campa-Siqueiros *et al.*, 2017; Chong *et al.*, 2015).

In the beginning, the expectation was that increased concentrations of clove and garlic extracts would increase the level of antifungal activity. This did happen when clove extract was used alone, but exactly the opposite happened when garlic extract was used (Figure 1), a fact that corroborated the results reported by Landero *et al.* (2013). This might be explained as being a model of competitive inhibition of some enzyme, where

de que el transporte del componente fungicida es activo y que el sistema transportador tiene una concentración limitada en la envoltura celular de *M. fijiensis*.

El hecho de no encontrar diferencias significativas en el área de crecimiento de las colonias de *M. fijiensis* durante las dos primeras semanas de tratamiento (Cuadro 2) puede ser indicativo de que a) el sitio de acción del antifúngico es intracelular por lo que primero deberá internalizarse a través de algún mecanismo de transporte, posiblemente activo y b) que el componente activo sea un compuesto derivado del procesamiento metabólico de algún componente de los extractos. En ambos casos el transporte a través de la envoltura celular parece ser la etapa limitante ya que, una vez alcanzada la concentración crítica del antifúngico, su impacto se expresa en reducir la velocidad de crecimiento (Figura 3).

El valor máximo de inhibición, expresada en la mezcla de los extractos de clavo y ajo en el Tratamiento 8 (Figura 2) muestra una posible sinergia entre los componentes de ambos extractos ya que en los Tratamientos con solo ajo (Tratamientos 5, 9 y 13) o clavo (Tratamientos 2, 3 y 4), en sus distintas concentraciones, la actividad inhibitoria promedio fue de 27.2% y 24.2% respectivamente. De tal situación se puede desprender que los componentes de ambos extractos actúan de forma independiente, lo que habrá de demostrar posteriormente.

Independientemente de lo anterior, la inhibición máxima del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis*, ejercida por la mezcla ajo-clavo (Tratamiento 8), encontrada en este trabajo fue cuatro veces mayor a lo reportado por Gutiérrez-Jiménez *et al.* (2017) quienes utilizaron placas de Petri con ADP adicionadas con 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm de aceite esencial de clavo y fue de 2.7 a 1.8 veces mayor a lo reportado por Sharanamma (2012) quien utilizó placas de Petri con ADP adicionado con 5%, 10% y 15% de extracto acuoso de ajo ($1 \text{ g}_{\text{ajo}} \cdot \text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$).

as the garlic extract concentration increases, one of its components takes the place of the one that has antifungal activity. Therefore, when the extract is diluted (lower concentration), the competitive component of the antifungal is not able to occupy all the “active sites;” as a result, the inhibition of the development of the *M. fijiensis* colony was lower. The results of the final phase (data not shown) support what we previously proposed, because when the garlic extract concentration was reduced to $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, the antifungal activity increased. In the future, it will be necessary to determine which competitive component (or components) is/are involved and where the action takes place (site(s)).

As for the antifungal activity of the clove extract (Figure 1), it was typical of molecules whose activity increases as their concentration increases. However, it had a maximum value (Figure 4), and, again, this may suggest that it contains an active fungicidal component and that the carrier system has a limited concentration in the *M. fijiensis* cell envelope.

The fact that no significant differences in the area of *M. fijiensis* growth were found during the first two weeks of treatment (Table 2) may indicate that a) the action site of the antifungal treatment is intracellular, which means that first it has to be introduced through a transportation mechanism, possibly an active one, and b) the active component is a compound derived from the metabolic process of one of the extract components. In both cases, transportation through the cell envelope seems to be the limiting stage because, once the critical concentration of the antifungal is reached, its impact is expressed as a reduction of growth rate (Figure 3).

The maximum inhibition value expressed when using a mixture of clove and garlic extracts in Treatment 8 (Figure 2) shows a potential synergy between the components of both extracts, since in

Por otro lado, la inhibición máxima está dentro del rango reportado para extractos de ajo empleados en el control de diversos hongos fitopatógenos como, por ejemplo, *Colletotrichum* sp (García, 2011; Landero *et al.*, 2013; Sundaramoorthy *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2007), *Rhizoctonia* sp. (Chávez y Aquino, 2012), *Fusarium* sp. (Taskeen-Un-Nisa *et al.*, 2011; Chávez y Aquino, 2012), *Sclerotium* sp. (Chávez y Aquino, 2012), *Botrytis* sp (Daniel *et al.*, 2015; Sesan *et al.*, 2015), *Alternaria* sp (Nashwa y Abo-Elyousr, 2012), *Aspergillus* (Tijjani *et al.*, 2014), *Penicillium* (Ikeura *et al.*, 2011) o para extractos de clavo: *Colletotrichum* sp (Radwan *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Conforme en el medio de cultivo ADP se incrementa la concentración de extracto alcohólico de ajo menor es la inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis*.

A mayor concentración de extracto alcohólico de clavo en el medio ADP la inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis* fue mayor.

La mezcla de los extractos alcohólicos de ajo y clavo tienen un efecto sinérgico positivo para inhibir el desarrollo de la colonia de *M. fijiensis*.

En el medio de cultivo ADP adicionado con 150 mg·ml⁻¹ de extracto alcohólico de ajo y 36 mg·ml⁻¹ de extracto alcohólico de clavo, se redujo en 39.6% el desarrollo de la colonia de *M. fijiensis*, lo que puede ser una alternativa para el control, en campo, de dicho fitopatógeno.

LITERATURA CITADA

Askun T, Tumen G, Satil G and Kilic T. 2008. Effects of some *Lamiaceae* species methanol extracts on potential mycotoxin producer fungi. *Pharmaceutical Biology* 46:688-694. <https://doi.org/10.1080/13880200802215792>.

the treatments containing only garlic (Treatments 5, 9 and 13) or only clove (Treatments 2, 3 and 4) at different concentrations, the average inhibition activity was 27.2% and 24.2%, respectively. Based on the above, it could be assumed that the components of both extracts act independently, a fact that remains to be proven.

Regardless of the above, the maximum inhibition of *M. fijiensis* population growth caused by the garlic and clove mixture (Treatment 8) obtained in the present study was four times higher than the inhibition reported by Gutiérrez-Jiménez *et al.* (2017), who used Petri dishes containing ADP to which 50, 100, 500, 1000 and 5000 ppm of essential clove oil were added, and 2.7 to 1.8 times higher than the inhibition reported by Sharanamma (2012), who used Petri dishes containing ADP to which 5%, 10% and 15% of aqueous garlic extract ($1 \text{ g}_{\text{garlic}} \cdot \text{ml}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) was added.

On the other hand, the maximum inhibition is within the range reported for garlic extracts used for controlling diverse phytopathogenic fungi, such as *Colletotrichum* sp. (García, 2011; Landero *et al.*, 2013; Sundaramoorthy *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2007), *Rhizoctonia* sp. (Chávez and Aquino, 2012), *Fusarium* sp. (Taskeen-Un-Nisa *et al.*, 2011; Chávez and Aquino, 2012), *Sclerotium* sp. (Chávez and Aquino, 2012), *Botrytis* sp (Daniel *et al.*, 2015; Sesan *et al.*, 2015), *Alternaria* sp. (Nashwa and Abo-Elyousr, 2012), *Aspergillus* (Tijjani *et al.*, 2014), and *Penicillium* (Ikeura *et al.*, 2011), or for clove extracts: *Colletotrichum* sp. (Radwan *et al.*, 2014).

CONCLUSIONS

As the concentration of alcoholic garlic extract in the ADP medium increases, the inhibition of *M. fijiensis* colony growth decreases.

- Bastos CN y Albuquerque PSB. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira* 29:555-557. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000500016>
- Campa-Siqueiros P, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez- Téllez MA y Vargas-Arispuro I. 2017. Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:493-508. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1707-1>
- Castillo F, Hernández D, Gallegos G, Rodríguez R and Aguilar CN. 2012. Antifungal properties of bioactive compounds from plants. Pp:81-106. In: Dhanasekaran D, Thajuddin N and Panneerselvam A (ed). *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. InTech Rijeka, Croatia. 258p. Disponible en línea: <https://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/antifungal-properties-of-bioactive-compounds-from-plants>
- Chávez AR y Aquino AS. 2012. Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. con extractos vegetales. *Investigación Agraria* 14:17-23. Disponible en línea: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_text&pid=S2305-06832012000100003
- Chong K, Zamora MP, Tilakawardane DA, Buckley NE, Rego JA and Liu Y. 2015. Investigation of allicin stability in aqueous garlic extract by high performance liquid chromatography method. *Journal of Scientific Research and Reports* 4:590-598. DOI: 10.9734/JSRR/2015/14301
- Conde-Ferrández L, Grijalva-Arango R, Raigoza-Flores NE and James-Kay AC. 2008. A simple method to obtain single conidium isolates directly from banana (*Musa sp.*) leaves infected with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:76-78. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61226112>
- Costa ART, Amaral MRZ, Martins PM, Paula JAM, Fiuzza TS, Tresvenzol LMF, Paula JR y Bara MTF. 2011. Ação de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L) Merr. y L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *The Brazilian Journal of Medicinal Plants* 13:240-245. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000200018>
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 10:564-582. Disponible en línea: <http://cmr.asm.org/content/12/4/564>
- Cruz MES, Schwan-Estrada KRF, Clemente E, Itako AT, Stangarlin JR and Cruz MJS. 2013. Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit. *The Brazilian Journal of Medicinal Plants* 15:727-733. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000500013>
- Daniel CK, Lennox CL and Vries FA. 2015. In-vitro effects of garlic extracts on pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba*. *South African Journal of Science* 111:1-8. <https://doi.org/10.17159/sajs.2015/20140240>
- De Hora BR. 2009. Ação de óleos essenciais no controle de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananeiras (*Musa sp.*). Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, Brasil. 68p. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/11449/88138>

As the concentration of alcoholic clove extract in the ADP medium increased, the level of inhibition of *M. fijiensis* colony growth also increased.

The mixture of alcoholic garlic and clove extracts has a positive synergistic effect that inhibits *M. fijiensis* colony growth.

In the ADP medium to which 150 mg·ml⁻¹ of alcoholic garlic extract and 36 mg·ml⁻¹ of alcoholic clove extract were added, *M. fijiensis* growth colony was reduced by 39.6%, so this could be an alternative for controlling the pathogen in the field.

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

- Etebu E and Young-Harry W. 2011. Control of Black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research* 6:508-514. Disponible en línea: [http://www.academicjournals.org/article/article1380878095\\_Etebu%20and%20Young-Harry.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380878095_Etebu%20and%20Young-Harry.pdf)
- Ewané CA, Chillet M, Castelan F, Brostaux Y, Lassois L, Essoh J, Hubert O, Chilin-Chales Y, Lepoivre P and De Lapeyre L. 2013. Impact of the extension of black leaf streak disease on banana susceptibility to post-harvest diseases. *Fruits* 68:351-365. Disponible en línea: <https://www.pubhort.org/fruits/2013/05/fruits130081.htm>
- García L. 2011. A comparative study on the antifungal effects of tamarind (*Tamarindus indica*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on banana anthracnose. *Journal of Nature Studies* 10:96-107. Disponible en línea: <http://www.pssnonline.org/wp-content/uploads/2012/05/96-107-Garcia.pdf>
- Gutiérrez-Jiménez E, Pedroza-Sandoval A, Martínez-Bolaños L, Samaniego-Gaxiola JA and García-González F. 2017. Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 141-150. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1707-4>
- Hernández AN, Bautista S y Velázquez MG. 2007. Prospec-tiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:119-123. <http://www.redalyc.org/pdf/610/61030202.pdf>
- Ikeura H, Somsak N, Kobayashi F, Kanlayanarat S and Hayata Y. 2011. Application of selected plant extracts to inhibit growth of *Penicillium expansum* on apple fruits. *Plant Pathology Journal* 10:79-84. DOI: 10.3923/ppj.2011.79.84
- Landero N, Nieto D, Téliz D, Alatorre R, Orozco M y Ortiz CF. 2013. Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum*

- gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 4:47-62. Disponible en línea: <http://oaji.net/articles/2017/4924-1495453202.pdf>
- Malik AA, Ahmed N, Babita, Chauhan H and Gupta P. 2016. Plant extracts in post harvest disease management of fruits and vegetables: A review. Journal of Food Processing and Technology 7:592-597. DOI: 10.4172/2157-7110.1000592
- Manzo-Sánchez G, Orozco-Santos M y Guzmán-González S. 2001. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 19:66-71. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507.8>
- Moura J, Sarmento FQ, de Oliveira F, Pereira J, Nogueira V y de Oliveira E. 2012. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Especies Medicinales y Aromáticas 11:208-217. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85622739002.pdf>
- Nashwa SMA and Abo-Elyousr KAM. 2012. Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. Plant Protection Science 48:74-79. <https://doi.org/10.17221/14/2011-PPS>
- Nonsee K, Supitchaya C and Thawien W. 2011. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb.) oil. International Food Research Journal 18:1531-1541. Disponible en línea: [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(04\)%202011/\(46\)IFRJ-2011-043.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(04)%202011/(46)IFRJ-2011-043.pdf)
- Pérez L. 2002. Morfología de las especies de *Mycosphaerella* asociadas a manchas de las hojas en *Musa spp.* Fitosanidad 6:3-9. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118291001.pdf>
- Ploetz R. 2000. Black sigatoka. Pesticide Outlook 1:19-23. DOI: 10.1039/B006308H
- Radwan MM, Tabanca N, Wedge DE, Tarawneh AH and Cutler SJ. 2014. Antifungal compounds from turmeric and nutmeg with activity against plant pathogens. Fitoterapia 99:341-346. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.08.021>
- Rahnama M, Najimi M and Ali S. 2012. Antibacterial effects of *Myristica fragans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Roci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*. Comparative Clinical Pathology 21:1313-1316. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00580-011-1287-3>
- Sepúlveda L. 2016. Caracterización fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su relación con la sensibilidad a fungicidas en Colombia. Revista Mexicana de Fitopatología 34:1-21. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507.8>
- Sesan TE, Enache E, Iacomi BM, Oprea M, Oancea F and Iacomi C. 2015. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus 14:29-43. DOI: 10.24326/asphc.2017.6.15
- Sharanamma AR. 2012. Studies of sigatoka leaf spot of banana caused by *Cercospora musae*. Zimm. [MSc. Dissertation.]. University of Agricultural Sciences. Dharwad. India. Disponible en línea: <http://krishikosh.egranth.ac.in/bitstream/1/86799/1/th10491.pdf>
- Sundaramoorthy S, Usharani S and George AP. 2014. Antifungal activity of plant products for the management of fruit rot infection in chillies. Plant Pathology Journal 13:87-99. DOI: 10.3923/ppj.2014.87.99
- Taskeen-Un-Nisa, Wani AH, Bhat MY, Pala SA and Mir RA. 2011. *In vitro* inhibitory effect of fungicides and botanicals on mycelial growth and spore germination of *Fusarium oxysporum*. Journal of Biopesticides 4:53-56. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/408b/76e3145fbd6f407129a9c3f56b3359bbe4f.pdf>
- Tijjani A, Adebitan SA, Gurama AU, Haruna SG and Safiya T. 2014. Effect of some selected plant extracts on *Aspergillus flavus*, a causal agent of fruit disease of tomato (*Solanum lycopersicum*) in Bauchi State. International Journal of Biosciences 4:244-252. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/4.12.244-252>
- Touba EP, Zakaria M and Tahereh E. 2012. Antifungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) *in vitro*. Microbial Pathogenesis 52:125-129. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.11.001>