

# ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM HIERBA SANTA (*Piper auritum*) AND JARILLA (*Baccharis glutinosa*) AGAINST *Fusarium* spp.

## ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE HIERBA SANTA (*Piper auritum*) Y JARILLA (*Baccharis glutinosa*) CONTRA *Fusarium* spp.

César Chacón<sup>1</sup>, Johana Miranda-Granados<sup>1</sup>, Nancy Ruiz-Lau<sup>2\*</sup>, Selene Lagunas-Rivera<sup>2</sup>, Víctor M. Ruíz-Valdiviezo<sup>1</sup>, Federico A. Gutiérrez-Miceli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez 29050, Chiapas, México. (ingecesarfigueroa10@hotmail.com), (jmirandagranados@gmail.com), (bioqvic@hotmail.com), (fgmiceli@gmail.com). <sup>2</sup>CONACYT-Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez 29050, Chiapas, México. (nruizla@conacyt.mx), (slagunari@conacyt.mx).

### ABSTRACT

Diseases caused by *Fusarium* in *Agave* are increasing and causing economic losses. Then, it is necessary to seek alternatives in pathogenic prevention and control to reduce the use of chemical fungicides, thus promoting a type of disease control which is friendly to the environment. The oils and leaf extracts of some plants are efficient in controlling pests and diseases. *Piper auritum* ("hierba santa") contains essential oils, which fulfill ecological functions such as attracting pollinators and causing allelopathic effects. *Baccharis glutinosa* ("jarilla") is also used in the treatment of various infectious diseases. Different extracts from plants have biological activity against microorganisms that affect important crops. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of essential oil and extracts from two plants with traditional use in the state of Chiapas on the phytopathogenic (*Fusarium* spp.) fungi of *Agave* spp. Extracts from *P. auritum* and *B. glutinosa* were tested against phytopathogenic fungi, in a complete randomized experimental design. ANOVA was performed with six treatments and three replicates per treatment, used on three species of *Fusarium*. The essential oil from leaves of *Piper auritum* had the greatest (96 h) significant inhibition effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (75.32%), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (86.57%) and *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (63.36%). Thus, *P. auritum* showed a clear fungistatic effect.

**Key words:** *Piper auritum*, *Baccharis glutinosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, agave, extracts.

### RESUMEN

Las enfermedades causadas por *Fusarium* en *Agave* aumentan, lo cual significa importantes pérdidas económicas. Es necesario entonces buscar alternativas en la prevención y control de patógenos para reducir el uso de fungicidas químicos, y así promover un tipo de control de enfermedades que sea amigable con el ambiente. Los aceites y extractos de hojas de algunas plantas son eficientes en el control de plagas y enfermedades. *Piper auritum* ("hierba santa") contiene aceites esenciales que cumplen funciones ecológicas, como las de atraer polinizadores y causar efectos alelopáticos. *Baccharis glutinosa* ("jarilla") también se usa en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Hay diferentes extractos de plantas que tienen una actividad biológica contra microorganismos que afectan cultivos importantes. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos de dos plantas con uso tradicional en el estado de Chiapas sobre los hongos fitopatógenos (*Fusarium* spp.) de *Agave* spp. Los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa* se probaron contra los hongos fitopatógenos, como parte de un diseño experimental completamente aleatorizado. Un ANOVA se realizó con seis tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, utilizados en tres especies de *Fusarium*. El aceite esencial extraído de las hojas de *Piper auritum* tuvo el mayor efecto inhibidor significativo (96 h) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (75.32%), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (86.57%) y *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (63,36%). Por lo tanto, *P. auritum* mostró un claro efecto fungistático.

**Palabras clave:** *Piper auritum*, *Baccharis glutinosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, agave, extractos.

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: November, 2018. Approved: August, 2019.

Published as NOTE in *Agrociencia* 54: 531-538. 2020.

## INTRODUCTION

In Mexico, the cultivation of *Agave* spp. has various uses, especially in the alcoholic beverage industry and as a source of natural fibers (Bezazi *et al.*, 2014). In Comitán, Chiapas, Mexico, a typical alcoholic beverage called “Comiteco” is produced from *Agave americana* distillation. *Agave* spp. is then an important plant resource with clear economic benefits in that region, but it is affected by diseases caused by fungi, mainly *Fusarium* (Ramírez *et al.*, 2017). *Fusarium oxysporum* is one of the most important soil-borne pathogens, which causes wilt diseases in several crops. This pathogen has the ability to persist for very long periods in soil without a host (Sharma *et al.*, 2016). As a consequence, the use of chemical fungicides has increased in order to control the fungi, but it causes damage to the soil and environment. Therefore, it is necessary to search for bioactive compounds with antifungal properties to control and prevent fungi damage on *Agave* spp.

Oils and leaf extracts of some plants are efficient for controlling pests and diseases (Silva *et al.*, 2014), as the genus *Piper*, which contains essential oils. The essential oil of *Piper auritum* Kunth tested against three isolates of *Fusarium* spp. (F2 and F5 of *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend Snyder & Hansen and F3 of *Fusarium redolens* Wollenweber) inhibited their growth (Duarte *et al.*, 2013a). Also, the hexane extract of *P. auritum* tested against *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae* showed relative control against those three pathogens (Pineda *et al.*, 2012). *Baccharis glutinosa* Pers. is a plant used in traditional medicine by the native people of northwest Mexico (Rosas-Burgos *et al.*, 2011). The crude methanolic extract of *B. glutinosa* used against three phytopathogenic fungi showed inhibition of their radial growth after 336 h (Rosas-Burgos *et al.*, 2009).

Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the antifungal activity of essential oil and extracts from *P. auritum* and *B. glutinosa* against the genus *Fusarium*. And the hypothesis was that at least one of these plant species may control fungi growth effectively.

## INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de *Agave* spp. tiene varios usos, en especial en la industria de bebidas alcohólicas y como fuente de fibras naturales (Bezazi *et al.*, 2014). En Comitán, Chiapas, México, se produce una bebida alcohólica típica llamada “Comiteco”, a partir de la destilación de *Agave americana*. *Agave* spp. es entonces un importante recurso vegetal con claros beneficios económicos en esa región, pero también es afectado por enfermedades causadas por hongos, principalmente *Fusarium* (Ramírez *et al.*, 2017). *Fusarium oxysporum* es uno de los patógenos transmitidos por el suelo más importante, que causa enfermedades de marchitez en varios cultivos. Este patógeno puede permanecer en el suelo durante períodos muy largos, sin un huésped (Sharma *et al.*, 2016). Como consecuencia, el uso de fungicidas químicos ha incrementado los intentos por controlar hongos, pero causa daños al suelo y al ambiente. Por lo tanto, es necesario buscar compuestos bioactivos con propiedades antifúngicas para controlar y prevenir el daño por hongos en *Agave* spp.

Los aceites y extractos de hojas de algunas plantas son efectivos en el control de plagas y enfermedades (Silva *et al.*, 2014), como el género *Piper*, que contiene aceites esenciales. El aceite esencial de *Piper auritum* Kunth probado contra tres aislados de *Fusarium* spp. (F2 y F5 de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend Snyder & Hansen, y F3 de *Fusarium redolens* Wollenweber) inhibió su crecimiento (Duarte *et al.*, 2013a). Además, el extracto hexánico de *P. auritum* probado contra *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*, tuvo un control relativo sobre esos tres patógenos (Pineda *et al.*, 2012). *Baccharis glutinosa* Pers. es una planta utilizada en medicina tradicional por los nativos del noroeste de México (Rosas-Burgos *et al.*, 2011). El extracto metanólico crudo de *B. glutinosa* utilizado contra tres hongos fitopatógenos mostró inhibición de su crecimiento radial después de 336 h de ensayo (Rosas-Burgos *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa* sobre hongos del género *Fusarium*. La hipótesis fue que al menos una de estas especies vegetales puede controlar el crecimiento de hongos de manera efectiva.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant collection and extract preparation

*Piper auritum* was collected in Villaflores, Chiapas (16° 14' 00" N 93° 16' 09" O; 560 msnm) and *B. glutinosa* in San Cristóbal de las Casas, Chiapas (16° 44' 12" N 92° 38' 18" O; 2200 msm). All the plant materials were dried for 25 d in the shade. Essential oil was extracted from fresh leaves by hydro-distillation method (Li *et al.*, 2014). For the ethereal extract, the powder of the dried leaves was macerated with ethyl ether for 35 d. The crude extract was filtered through sterile gauze and concentrated to dryness. The Soxhlet extract, from leaves of *P. auritum*, was extracted with ethyl ether for 4 h, also the ethanolic extracts of leaves and roots were put through a reflux system for other 4 h. Afterwards, the solvent was evaporated to dryness. The essential oil and extracts were stored in amber flasks at 4 °C until use. The efficiency of the essential oil and extracts was calculated using the formula (Mesa *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Extraction} = \frac{\text{Extract weight}}{\text{Weight plant material}} \times 100$$

In the bioassays each extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and prepared at a concentration of 200 mg mL<sup>-1</sup> (Al akeel *et al.*, 2017), while the essential oil was used pure.

### Fungi culture

The species of *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (FoC-ITTG), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (FoT-ITTG) and *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (FsC-ITTG) were propagated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA) incubated at 28 ± 2 °C for seven days. Whatman No. 1 6 mm diameter filter paper discs were placed to promote mycelial growth on paper (Miranda-Granados *et al.*, 2018). Fungi strains used were provided by the Microbiology Laboratory of the Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) and they are part of the microbiota collection in that laboratory.

### Antifungal activity of plant extracts

In the first bioassay, testing the biocontrol effect by direct contact of the extracted fractions on the microorganisms, Whatman No. 1 paper discs were impregnated with 10 µL of the corresponding extract. Afterwards, discs with the fungi species were placed on the disks with the extract. In a second bioassay, it was assessed the effect of the vapors of the extract that showed satisfactory results previously. A paper disc with essential oil

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de plantas y preparación de extractos

*Piper auritum* se recolectó en Villaflores, Chiapas (16° 14' 00" N 93° 16' 09" O; 560 msnm) y *B. glutinosa* en San Cristóbal de las Casas, Chiapas (16° 44' 12" N 92° 38' 18" O; 2200 msnm). Todo el material vegetal se secó durante 25 d a la sombra. El aceite esencial se extrajo de las hojas frescas con el método de hidrodestilación (Li *et al.*, 2014). Para el extracto etéreo, el polvo de las hojas secas se maceró con éter etílico durante 35 d. El extracto crudo se filtró a través de una gasa estéril y se concentró hasta sequedad. El extracto Soxhlet, de hojas de *P. auritum*, se extrajo con éter etílico durante 4 h, además los extractos etanólicos de hojas y raíces se obtuvieron por un sistema de reflujo durante otras 4 h. Después, el disolvente se evaporó hasta sequedad. El aceite esencial y los extractos se almacenaron en frascos ámbar a 4 °C hasta su uso. La eficiencia del aceite esencial y los extractos se calculó con la siguiente fórmula (Mesa *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Extraction} = \frac{\text{Extract weight}}{\text{Weight plant material}} \times 100$$

En los bioensayos, cada uno de los extractos se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se preparó a una concentración de 200 mg mL<sup>-1</sup> (Al akeel *et al.*, 2017), mientras que el aceite esencial se usó puro.

### Cultivo de hongos

Las especies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *comiteca* (FoC-ITTG), *Fusarium oxysporum* f. sp. *tequilana* (FoT-ITTG) y *Fusarium solani* f. sp. *comiteca* (FsC-ITTG) se propagaron en placas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA) incubadas a 28 ± 2 °C durante siete días. Discos de papel filtro Whatman No. 1 de 6 mm de diámetro se colocaron para promover el crecimiento del micelio en el papel (Miranda-Granados *et al.*, 2018). El Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) proporcionó las cepas de hongos utilizadas y son parte de la colección microbiana de ese laboratorio.

### Actividad antifúngica de extractos de plantas

En el primer bioensayo, al probar el efecto de biocontrol por contacto directo de las fracciones extraídas sobre los microorganismos, los discos de papel Whatman No. 1 se impregnaron con 10 µL del extracto correspondiente. Después, los discos con las especies fúngicas se colocaron sobre los discos con el extracto. En un segundo bioensayo se evaluó el efecto de los vapores del

was placed in the center of Petri dishes and at 5 mm distance, four discs were planted with the microorganism. Growth was measured every 24 h, sterile distilled water (H<sub>2</sub>O) was a positive control and a solvent test was also performed using a filter paper disc treated with sterile DMSO. The inhibition percentage of radial growth (PIRG) was calculated using the Abbot formula:  $PIRG (\%) = [(RC - RT) / RC] \times 100$ , where, RC is the radius of the control and RT the radius of the treatment (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

### Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design of six treatments with three replicates each was used to analyze plant compounds effect on the three fungi species, and the response variable was PIRG (percentage of inhibition of radial growth). One-way ANOVA was performed, and means were compared with Tukey multiple comparison test ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Plants extraction yield

The yields obtained for the bioextracts of *P. auritum* were 0.308% of fresh weight (FW) for essential oil. For ethereal extract and Soxhlet extract, the yields were 3.47% of dry weight (DW) and 1.56% (FW), respectively (Table 1). The density of the essential oil was 1.09 g mL<sup>-1</sup>, while the viscosity values were 1.57 mPa (dynamic) and 1.44 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (kinematics). Pineda *et al.* (2012) indicated that the essential oil of *P. auritum* leaves have a performance of 0.12% (FW). Also, the hexane extract obtained by maceration showed efficiency of 0.19% (DW) (Delgado *et al.*, 2012) and 0.24% by percolation (FW) (Sánchez *et al.*, 2011). Thus, in our study

extracto que previamente tuvo resultados satisfactorios. Un disco de papel con aceite esencial se colocó en el centro de las placas Petri y, a una distancia de 5 mm, se colocaron cuatro discos con el microorganismo. El crecimiento se midió cada 24 h, agua destilada estéril (H<sub>2</sub>O) se usó como control positivo y también se realizó una prueba con disolvente usando un disco de papel filtro tratado con DMSO estéril. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) se calculó con la fórmula de Abbot:  $PIRG (\%) = [(RC - RT) / RC] \times 100$ , donde RC es el radio del control y RT el radio del tratamiento (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y seis tratamientos con tres repeticiones cada uno para analizar el efecto de los compuestos vegetales en las tres especies fúngicas, y la variable de respuesta fue PIRG (porcentaje de inhibición del crecimiento radial). Un ANOVA de una vía se realizó, y las medias se compararon con la prueba Tukey de comparación múltiple ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimiento de los extractos vegetales

Los rendimientos obtenidos para los bioextractos de *P. auritum* fueron 0.308% del peso fresco (FW) para el aceite esencial. Para el extracto etéreo y Soxhlet, los rendimientos fueron 3.47% del peso seco (DW) y 1.56% del peso fresco (FW), respectivamente (Cuadro 1). La densidad del aceite esencial fue 1.09 g mL<sup>-1</sup>, mientras que los valores de viscosidad fueron 1.57 mPa (dinámica) y 1.44 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (cinemática). Pineda *et al.* (2012) indicaron que el aceite esencial de las hojas de *P. auritum* tiene un rendimiento de 0.12% (FW). Además, el extracto hexá-

**Table 1. Extraction yields of *P. auritum* and *B. glutinosa*.**

**Cuadro 1. Rendimientos de los extractos de *P. auritum* y *B. glutinosa*.**

Bioextract	Efficiency
Essential oil of <i>P. auritum</i>	0.308% (w/w FW) <sup>†</sup>
Ethereal extract of <i>P. auritum</i> leaves	3.47% (DW) <sup>‡</sup> ; 0.59% (FW)
Soxhlet Extract of <i>P. auritum</i> leaves	9.14% (DW); 1.56% (FW)
Ethanol extract of <i>B. glutinosa</i> leaves	25.61% (DW)
Ethanol extract of <i>B. glutinosa</i> root	9.23% (DW)

<sup>†</sup>FW: fresh weight, <sup>‡</sup>DW: dry weight (leaf humidity: 82.9%) ♦ <sup>†</sup>FW: peso fresco, <sup>‡</sup>DW: peso seco (humedad de la hoja: 82.9%).

the efficiency of essential oil and extracts are higher than those reports. This difference may be due to the solvent and the extraction technique used in our experiment. Crude methanolic extracts obtained by maceration from *B. glutinosa* had yields of 26% (DW) (Rosas-Burgos *et al.*, 2009), which is similar to the yield in our study (25.61% (DW)).

**Antifungal activity of plant extracts**

The greatest antifungal activity of the Soxhlet extract of *Piper auritum* leaves was observed on *FoC* and *FsC* (57.50%) and for the ethereal extract was on *FoT* (62.75%) at 24 h. However, at 96 h these results of inhibition decreased. The ethanolic extracts of *B. glutinosa* obtained by reflux showed a statistically significant difference only at 96 h in *FoC*. Nevertheless, in *FoT* and *FsC* those extracts had the same effect on each fungus (Table 2).

The essential oil obtained from leaves of *P. auritum* showed the best inhibition results with values of 100% at 24 h and 63-86.57% at 96 h for the three fungi (Figure 1); inhibitory effect was evaluated by volatility (Table 3). The results obtained were: *FoC*, 72%; *FoT*, 89.71% and *FsC*, 56.60% at 24h. However, the inhibitory effect decreased considerably over time.

nico obtenido por maceración mostró una eficiencia de 0.19% (DW) (Delgado *et al.*, 2012) y 0.24% por percolación (FW) (Sánchez *et al.*, 2011). Por lo tanto, en nuestro estudio, la eficiencia del aceite esencial y los extractos es más elevada que lo reportado en esos estudios. Esta diferencia puede deberse al disolvente y la técnica de extracción utilizada en nuestro experimento. El extracto metanólico crudo obtenidos por maceración de *B. glutinosa* tuvo un rendimiento de 26% (DW) (Rosas-Burgos *et al.*, 2009), que es similar al rendimiento obtenido en nuestro estudio (25.61% (DW)).

**Actividad antifúngica de extractos de plantas**

La mayor actividad antifúngica del extracto Soxhlet de hojas de *Piper auritum* se observó en *FoC* y *FsC* (57.50%) y para el extracto etéreo en *FoT* (62.75%) a las 24 h. Sin embargo, a las 96 h estos resultados de inhibición disminuyeron. Los extractos etanólicos de *B. glutinosa* obtenidos por reflujo mostraron una diferencia estadísticamente significativa solo a las 96 h en *FoC*. Sin embargo, en *FoT* y *FsC* esos extractos tuvieron el mismo efecto en cada hongo (Cuadro 2).

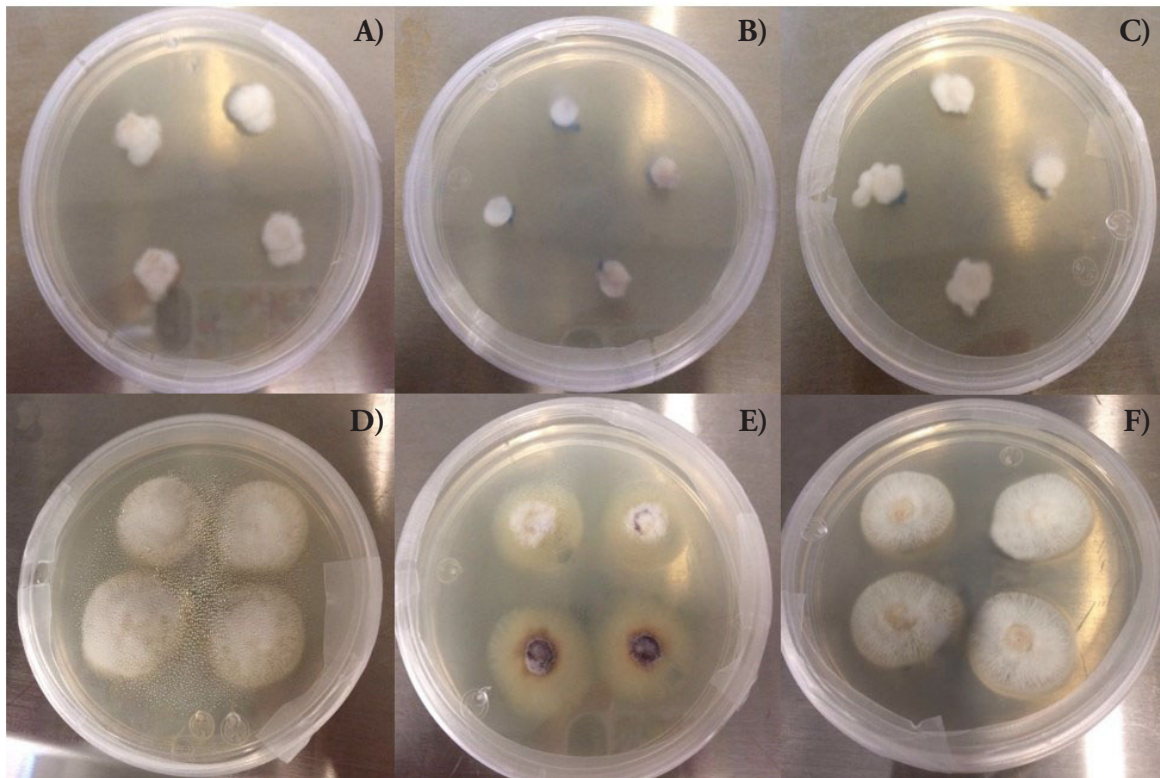
El aceite esencial obtenido de hojas de *P. auritum* mostró los mejores resultados de inhibición con valores de 100% a las 24 h y 63-86.57% a las 96 h

**Table 2. Percent inhibition by direct contact of ethanolic extracts (200 mg mL<sup>-1</sup>) of *B. glutinosa* and essential oil of *P. auritum* on phytopathogenic *Fusarium* species.**

**Cuadro 2. Porcentaje de inhibición por contacto directo de extractos etanólicos (200 mg mL<sup>-1</sup>) de *B. glutinosa* y aceite esencial de *P. auritum* en especies fitopatógenas de *Fusarium*.**

Treatment	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>comiteca</i>				<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tequilana</i>				<i>F. solani</i> f. sp. <i>comiteca</i>			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
C (+) <sup>†</sup>	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
EEM-HS <sup>‡</sup>	42.50 b	32.07 b	14.39 b	15.06 bc	62.75 c	14.81 b	12.80 ab	18.41 bc	42.50 b	19.35 b	21.88 cd	18.32 c
AE-HS <sup>§</sup>	100 c	100 d	87.02 d	75.32 d	100 d	100 d	97.23 d	86.57 d	100 c	97.42 d	84.38 e	63.36 d
EESx-HS <sup>‡</sup>	57.50 b	43.48 c	38.60 c	15.58 bc	23.53 b	36.51 c	33.56 c	11.19 b	57.50 b	38.71 c	24.65 d	5.60 ab
EER-HJ <sup>¶</sup>	37.50 b	36.96 bc	23.86 b	25.97 c	56.86 c	33.33 c	24.57 bc	23.88 c	35.00 b	9.68 ab	12.85 b	13.49 bc
EER-RJ <sup>**</sup>	40.00 b	28.26 b	13.68 b	11.17 ab	50.00 c	11.64 ab	11.76 ab	19.90 bc	35.00 b	16.13 b	14.58 bc	14.25 bc

Data reported in PIRG; <sup>†</sup>C (+): sterile distilled water, <sup>‡</sup>EEM-HS: ethereal extract of *P. auritum* leaves obtained by maceration, <sup>§</sup>AE-HS: *P. auritum* essential oil, <sup>‡</sup>EESx-HS: ethereal extract of *P. auritum* leaves obtained by Soxhlet technique, <sup>¶</sup>EER-HJ: ethanolic extract of *B. glutinosa* leaves, <sup>\*\*</sup>EER-RJ: ethanolic extract of *B. glutinosa* root. Different letters in a row indicate statistical difference (Tukey, p≤0.05)   
 ♦ Datos reportados en PIRG; <sup>†</sup>C (+): agua destilada estéril, <sup>‡</sup>EEM-HS: extracto etéreo de hojas de *P. auritum* obtenido por maceración, <sup>§</sup>AE-HS: aceite esencial de *P. auritum*, <sup>‡</sup>EESx-HS: extracto etéreo de hojas de *P. auritum* obtenido por técnica Soxhlet, <sup>¶</sup>EER-HJ: extracto etanólico de hojas de *B. glutinosa*, <sup>\*\*</sup>EER-RJ: extracto etanólico de raíz de *B. glutinosa*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (Tukey, p≤0.05).



**Figure 1.** Effect of *P. auritum* essential oil by direct contact on *Fusarium* spp at 72 h. Essential oil treatment on *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (A), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (B) and *F. solani* f. sp. *comiteca* (C). Control treatment (sterile distilled water) on *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (D), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (E) and *F. solani* f. sp. *comiteca* (F).

**Figure 1.** Efecto del aceite esencial de *P. auritum* por contacto directo sobre *Fusarium* spp a las 72 h. Tratamiento de aceite esencial en *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (A), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (B) y *F. solani* f. sp. *comiteca* (C). Tratamiento control (agua destilada estéril) en *F. oxysporum* f. sp. *comiteca* (D), *F. oxysporum* f. sp. *tequilana* (E) y *F. solani* f. sp. *comiteca* (F).

Our results suggest that the antifungal effect of the essential oil of *P. auritum* is more efficient than the extracts and in the bioassay by direct contact, and the effect decreased slightly at 96 h but not in volatility. Duarte *et al.* (2014) mentioned that the oils of *P. auritum* and *P. aduncum* showed a high

para los tres hongos (Figura 1); el efecto inhibitorio mediante la volatilidad también se evaluó (Cuadro 3). Los resultados obtenidos fueron: *FoC*, 72%; *FoT*, 89.71% y *FsC*, 56.60% a las 24h. Sin embargo, el efecto inhibitorio disminuyó de manera considerable con el tiempo.

**Table 3.** Inhibition percent by volatility of essential oil of *P. auritum* on phytopathogenic *Fusarium* species.

**Cuadro 3.** Porcentaje de inhibición por volatilidad de aceite esencial de *P. auritum* en especies fitopatógenas de *Fusarium*.

Treatment	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>comiteca</i>			<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tequilana</i>			<i>F. solani</i> f. sp. <i>comiteca</i>		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
C (+) <sup>†</sup>	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AE-HS <sup>‡</sup>	72.00 b	37.01 b	17.09 b	89.71 b	45.93 b	28.23 b	56.60 b	33.09 b	19.25 b

Data reported in PIRG; <sup>†</sup>C (+): sterile distilled water, <sup>‡</sup>AE-HS: *P. auritum* essential oil. Different letters in a row indicate statistical difference (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) ♦ Datos reportados en PIRG; <sup>†</sup>C (+): agua destilada esterilizada, <sup>‡</sup>AE-HS: aceite esencial de *P. auritum*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

antifungal activity four days after inoculation on *Curvularia lunata*, *Sarocladium oryzae* and *Bipolaris oryzae*.

Piper essential oils and extracts have a high metabolic diversity and were reported with antifungal properties (Da Silva *et al.*, 2014). The effect caused by these substances extracted from plants on phytopathogenic fungi is due to mechanisms of direct fungitoxic action (Silva *et al.*, 2014). The biological activity is attributed to secondary metabolites from alkaloids, terpenes, iridoids, lactones, flavonoids, naphthoquinones and anthroquinones, coumarins, phenylpropanoids and other phenolic resins (Céspedes *et al.*, 2015).

The volatile effect of the essential oil of *P. auritum* could be associated to oil evaporation, which leads to a higher concentration of vapors during the initial evaluation period as well as changes in the time and the quantitative composition of the bioactive compounds in the vapor phase of the oils. Whilst the mode of action of the essential oil could be associated with affectations in the synthesis of the cellular wall of the hyphae (Duarte *et al.*, 2013b).

The antifungal activity of the essential oil is possibly related to the presence of terpene substances and it may be due to their ability to destroy cellular integrity, inhibit respiration and ion transport processes, thus increasing membrane permeability. The essential oils are complex mixtures which biological activity may be due to their major components or to synergistic effects among them. It is then possible to identify compounds which might serve as source for the development of molecules with antifungal activity (Tangarife-Castaño *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONS

The techniques used in this study showed higher yields of the essential oil and extracts of *Piper auritum* and *Baccharis glutinosa* extracts. These findings suggest that the inhibitory effect presented by the studied extracts and essential oils in plants of *P. auritum* and *B. glutinosa* are fungistatic on *FoC*, *FoT* and *F5C*. Besides, it was the essential oil of *P. auritum* that showed the greatest activity on the three phytopathogenic fungi evaluated.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el efecto antifúngico del aceite esencial de *P. auritum* es más eficiente que los extractos; sin embargo, el efecto disminuyó ligeramente a las 96 h en el bioensayo por contacto directo, pero no en el de volatilidad. Duarte *et al.* (2014) mencionaron que los aceites de *P. auritum* y *P. aduncum* mostraron una elevada actividad antifúngica cuatro días después de la inoculación en *Curvularia lunata*, *Sarocladium oryzae* y *Bipolaris oryzae*.

Los aceites esenciales y extractos de Piper tienen una alta diversidad metabólica, como también propiedades antifúngicas (Da Silva *et al.*, 2014). El efecto causado por estas sustancias extraídas de las plantas sobre hongos fitopatógenos se debe a mecanismos de acción fungitóxica directa (Silva *et al.*, 2014). La actividad biológica se atribuye a metabolitos secundarios del tipo alcaloides, terpenos, iridoides, lactonas, flavonoides, naftoquinonas y antroquinonas, cumarinas, fenilpropanoides y otras resinas fenólicas (Céspedes *et al.*, 2015).

El efecto volátil del aceite esencial de *P. auritum* podría estar relacionado con la evaporación del aceite, lo que conduce a una mayor concentración de vapores durante el período de evaluación inicial, así como a cambios en el tiempo y la composición cuantitativa de los compuestos bioactivos en la fase de vapor de los aceites. A su vez, el modo de acción del aceite esencial podría estar asociado con afectaciones en la síntesis de la pared celular de las hifas (Duarte *et al.*, 2013b).

La actividad antifúngica del aceite esencial está probablemente relacionada con la presencia de sustancias terpénicas y puede deberse a su capacidad para destruir la integridad celular, inhibir la respiración y los procesos de transporte de iones, y así aumenta la permeabilidad de la membrana. Los aceites esenciales son mezclas complejas cuya actividad biológica puede deberse a sus componentes principales o a efectos sinérgicos entre ellos. Es posible, entonces, identificar compuestos que podrían servir como fuente para el desarrollo de moléculas con actividad antifúngica (Tangarife-Castaño *et al.*, 2014).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-Mexico [grant numbers 594550 and 597369]. César Chacón and Johana Miranda-Granados are also acknowledged for performing bioassays.

## LITERATURE CITED

- Al Akeel R., A. Mateen, K. Janardhan, and V. Gupta. 2017. Analysis of anti-bacterial and antioxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts. Saudi J. Biol. Sci. 24: 11–14.
- Bezazi A., A. Belaadi, M. Bourchak, F. Scarpa, and K. Boba. 2014. Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterization of *Agave americana* L. natural fibres. Composites Part B: Eng. 66: 194-203.
- Céspedes C., J. Alarcon, P. Aqueveque, T. Lobo, J. Becerra, C. Balbontin, J. Avila, I. Kubo, and D. Seigler. 2015. New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. Environ. Res. 142: 549–562.
- Da Silva J. K. R., J. R. A. Silva, S. B. Nascimento, S. F. M. da Luz, E. N. Meireles, C. N. Alves, A. R. Ramos, and J. G. S. Maia. 2014. Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. Molecules. 19: 17926-17942.
- Delgado B. E., M. del R. García-Mateos, M. del C Ybarra-Moncada, C. Luna-Morales, and M. T. Martínez-Damián, 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. Rev. Chapingo Serie Hort. 18: 55-69.
- Duarte Y., O. Pino, and B. Martínez. 2013a. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp. Rev. Protección Veg. 28: 232-235.
- Duarte Y., O. Pino and B. Martínez. 2014. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz. Rev. Protección Veg. 29: 62-65.
- Duarte Y., O. Pino, D. Infante, Y. Sánchez, M. del C. Travieso, and B. Martínez. 2013b. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev. Protección Veg. 28: 54-59.
- Li R., J. Yang, Y. Wang, Q. Sun, and H. Hu. 2014. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the stem and leaf essential oils from *Piper flaviflorum* from Xishuangbanna, SW China. Nat. Prod. Commun. 9: 1011-1014.
- Mesa V. A. M., J. F. Toro S, F. Cardona N and S. Blair T. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat. 11: 154-162.
- Miranda-Granados J., C. Chacón, N. Ruiz-Lau, M. E. Vargas-Díaz, L. G. Zepeda, P. Alvarez-Gutiérrez, R. Meza-Gordillo, and S. Lagunas-Rivera. 2018. Alternative use of extracts of chipilín leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as antimicrobial. Sustainability. 10: 1-7.

## CONCLUSIONES

Las técnicas utilizadas en este estudio revelaron rendimientos mayores del aceite esencial y los extractos de *Piper auritum* y *Baccharis glutinosa*. Estos hallazgos sugieren que el efecto inhibitorio presentado por los extractos estudiados y los aceites esenciales en plantas de *P. auritum* y *B. glutinosa* son fungistáticos en *FoC*, *FoT* y *FsC*. Además, el aceite esencial de *P. auritum* fue el que presentó la mayor actividad en los tres hongos fitopatógenos evaluados.

—Fin de la versión en Español—

-----\*

- Pineda R., S. Vizcaíno, C. García, J. Gil, and D. Durango. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper boltonii* C. Dc. against phytopathogenic fungi. Chil. J. Agr. Res. 72: 507-515.
- Ramírez-Ramírez M. J., N. A. Mancilla-Margalli, L. Meza-Álvarez, R. Turincio-Tádeo, D. Guzmán-de Peña, and M. E. Avila-Miranda. 2017. Epidemiology of *Fusarium* Agave Wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protect. Sci. 53: 144-152.
- Rosas-Burgos E., M. Cortez-Rocha, F. Cinco-Moroyoqui, R. Robles-Zepeda, J. López-Cervantes, D. Sánchez-Machado, and F. Lares-Villa. 2009. Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 2257-2261.
- Rosas-Burgos E., M. Cortez-Rocha, M. Plascencia-Jatomea, F. Cinco-Moroyoqui, R. Robles-Zepeda, J. López-Cervantes, D. Sánchez-Machado, and F. Lares-Villa. 2011. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B1 and aflatoxin B1 production. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 1025-1033.
- Sánchez Y., O. Pino, F. J. Lazo, Y. Abreu, E. Naranjo, and A. Iglesia. 2011. Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu *Pipereae* frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. Rev. Protección Veg. 26: 45-51.
- Sharma A., S. Rajendran, A. Srivastava, S. Sharma, and B. Kundu. 2016. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. J. Biosci. Bioeng. 123: 308-313.
- Silva J., P. Souza, F. Monteiro, M. Freitas, M. Silva Júnior, and L. Belan. 2014. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. Rev. Bras. Pl. Med. 16: 539-544.
- Tangarife-Castaño V., J. B. Correa-Royero, V. C. Roa-Linares, N. Pino-Benitez, L. A. Betancur-Galvis, D. C. Durán, E. E. Stashenko, and A. C. Mesa-Arango. 2014. Antidermatophyte, anti-*Fusarium* and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. J. Essent. Oil Res. 26: 221-227.