

# ***Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions**

## **Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero**

Ofelda Peñuelas-Rubio, Maritza Arellano-Gil\*, Abel Alberto Verdugo-Fuentes, Luis Abraham Chaparro-Encinas, Sharon Elena Hernández-Rodríguez, José Luis Martínez-Carrillo, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 sur, Ciudad Obregón, Sonora, CP. 85000, México; Irasema del Carmen Vargas-Arispuro, Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., km 0.6 Carretera Hermosillo-La Victoria, Hermosillo, Sonora, CP. 83000 México. \*Autor para correspondencia: maritza.arellano@itson.edu.mx.

Recibido: 10 de Marzo, 2017.

Aceptado: 02 de Mayo, 2017.

Peñuelas-Rubio O, Arellano-Gil M, Verdugo-Fuentes AA, Chaparro-Encinas LA, Hernández-Rodríguez SE, Martínez-Carrillo JL, Vargas-Arispuro IC. 2017. *Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fito-patología* 35(3): 360-376.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-3

Primera publicación DOI: 09 de Junio, 2017.

First DOI publication: June 09, 2017.

**Resumen.** Se evaluó la capacidad antifúngica de extractos de *Larrea tridentata* en la inhibición de *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* bajo condiciones experimentales en invernadero. Una vez que la cepa de *Fusarium* se caracterizó, se determinó el crecimiento micelial *in vitro* y su efecto inhibitorio con los extractos de *L. tridentata* por el

**Abstract.** The antifungal ability of extracts of *Larrea tridentata* in the inhibition of *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* *in vitro* and *in vivo* was evaluated. Once the *Fusarium* strain was characterized, the methodology of poisoned culture medium was used to determine the inhibition of mycelial growth at various concentrations (0-2000 ppm) and solvents (dichloromethane, methanol, ethanol and water). In the *in vivo* assay, ten treatments were evaluated: 2000 and 3000 ppm for DCM and EtOH, 3000 and 6000 ppm for MeOH and H<sub>2</sub>O and two controls; one plant as experimental unit and ten replicates. Plant height, leaf number, chlorophyll, severity, as well as incidence and survival were determined in tomato plants inoculated with the fungus and different extracts of *L. tridentata*. The extracts with a higher percentage of inhibition and vegetative development are dichloromethane at 3000 ppm and methanol at 4000 ppm, both *in vitro* and *in vivo*. Extracts of *Larrea tridentata* can be

método del medio envenenado a diferentes concentraciones (0-2000 ppm) y disolventes (diclorometano, metanol, etanol y agua). En el ensayo *in vivo* se evaluaron diez tratamientos: 2000 y 3000 ppm para DCM y EtOH, 3000 y 6000 ppm para MeOH y H<sub>2</sub>O y dos testigos, considerando una planta como unidad experimental y diez repeticiones. Se evaluó la altura de la planta, número de hojas, clorofila, severidad, incidencia y sobrevivencia en plantas de tomate inoculadas con el hongo y tratadas con los diferentes extractos de *L. tridentata*. Los extractos con mayor porcentaje de inhibición y desarrollo vegetativo fueron: diclorometano a 3000 ppm y metanol a 4000 ppm, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los extractos de *L. tridentata* pueden considerarse dentro de un plan de manejo integrado para el control de la pudrición de la corona en tomate causada por *F. oxysporum radialis-lycopersici*.

**Palabras clave:** biofungicida; agricultura protegida; manejo integrado; gobernadora.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) se cultiva por excelencia en agricultura protegida en México, consolidando al país como el exportador número uno a Estados Unidos y Canadá (Atlas Agroalimentario, 2016). Entre los principales problemas que enfrenta el cultivo, se encuentra la aparición de enfermedades de origen fúngico, como la pudrición de la corona del tomate (PCT) cuyo agente causal es el hongo saprófito *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* (Forl). La PCT es una de las enfermedades más destructivas, ya que ocasiona pérdidas en el rendimiento de sistemas de producción de invernadero y campo abierto (Szczuchura *et al.*, 2013). Entre los daños que causan a las plantas destacan el retraso en el crecimiento, la pudrición radical y lesiones necróticas extensas en el cuello y base del tallo y por consiguiente la senescencia

considered as part of an integrated management plan for the control of crown rot in tomatoes caused by *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici*.

**Key words:** biofungicide, protected agriculture, integrated management, *Creosote bush*.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is grown par excellence in protected agriculture in Mexico, consolidating this country as the main exporter to the United States and Canada (Atlas Agroalimentario, 2016). Among the main problems faced by this crop is the appearance of fungal diseases, such as Tomato Crown Rot (TCR), the causal agent of which is the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* (Forl). TCR is one of the most destructive diseases, since it causes losses in the yields of greenhouse and field production systems (Szczuchura *et al.*, 2013). Some of the most important damages caused to plants include growth delay, root rotting, large necrotic wounds in the neck and base of the stem, and therefore senescence (McGovern, 2015). The presence of Forl has been reported in the states of Morelos (Domínguez, 2012) and Sinaloa, where its presence caused losses of up to 50 % in tomato harvests (Apodaca *et al.*, 2004). Conventional control strategies are based on the use of grafts, solarization, crop rotation, and mainly, on the use of synthetic chemical products, which produce well-known damages to human health, negative impacts on the environment and the considerable increase of production costs (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013). Given the negative implications of the improper use of chemical fungicides, the development of new forms of control is crucial to reduce the dependence on these products (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Some of the alternatives to chemical control in integrated pest and disease

(McGovern, 2015). La presencia de Forl ha sido reportada en los estados de Morelos (Domínguez, 2012) y Sinaloa, donde su presencia causó hasta un 50 % de reducción de la cosecha del tomate (Apo-daca *et al.*, 2004). Las estrategias convencionales de control están basadas en el uso de injertos, solarización, rotación de cultivos y principalmente en el uso de productos químicos sintéticos, de los cuales son conocidos los riesgos a la salud humana, el impacto negativo en el medio ambiente y el aumento considerable de los costos de producción (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013). Dadas las implicaciones negativas del uso inadecuado de fungicidas químicos, es primordial el desarrollo de nuevas formas de control para reducir la dependencia a dichos productos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Dentro de las alternativas al control químico en un manejo integrado de plagas y enfermedades, se encuentra el uso de extractos vegetales con propiedades fungicidas, como *Larrea tridentata*. Comúnmente conocida como “gobernadora” es el arbusto dominante del desierto Sonorense y una fuente notable de compuestos naturales con aproximadamente el 50% de las hojas (en peso seco) como materia extraíble (Arteaga *et al.*, 2005). Entre los compuestos fenólicos bioactivos más estudiados destaca el ácido nordihidroguaiarético (ANDG) (Martins *et al.*, 2013) antioxidante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidérmicas de las hojas y tallos. Dicho biocompuesto se encuentra presente en todas las especies del género, además, estudios interpopulacionales de *L. tridentata* realizados en el desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de ANDG encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año. Las flores, las hojas, los tallos verdes y algunos leñosos (<5 mm de diámetro) contienen ANDG, la concentración más alta se observó en las hojas con 38.3 mg g<sup>-1</sup> y tallos verdes con 32.5 mg g<sup>-1</sup> (Hyder, *et al.*, 2002; Lira-Saldivar, 2003). Por lo

management, are the use of plant extracts with fungicidal properties, such as *Larrea tridentata*. Commonly known as “gobernadora,” it is the predominant bush of the Sonoran desert and a prominent source of natural compounds with about 50 % of its leaves (in dry weight) as extractable matter (Arteaga *et al.*, 2005). Out of the most widely studied bioactive phenolic compounds, one worth highlighting is nordihydroguaiaric acid (NDGA) (Martins *et al.*, 2013), an antioxidant found in the resin of cells near the epidemic layers of leaves and stems. This biocompound is present in all the species of the genus; also, interpopulational studies on *L. tridentata* carried out in the Sonora desert revealed that the NDGA concentrations found in the resin of their leaves varied depending on the latitude and time of year. The flowers, leaves, green and some woody stems (<5 mm diameter) contain NDGA; the highest concentration was observed in leaves with 38.3 mg g<sup>-1</sup> and green stems with 32.5 mg g<sup>-1</sup> (Hyder, *et al.*, 2002; Lira-Saldivar, 2003). Therefore, knowing the content of NDGA in the *L. tridentata* extracts will provide information on its effect in the control of pathogenic fungi in plants. The antifungal properties of *L. tridentata* have been confirmed in different investigations for about 40 years using *in vitro* tests with about 17 important plant pathogenic fungi in the agricultural area (López *et al.*, 2005; Lira-Saldivar *et al.*, 2006); however, there are very few studies *in vitro* against Forl, and carrying out a test under these conditions would set the standards to test the standards *in vivo*, since, despite the promising results that have been published, the evidence of tests carried out in greenhouses or fields is insufficient. The aim of this study was to quantify the content of NDGA in de *L. tridentata* extracts to evaluate its effectiveness *in vitro* and in greenhouse conditions to establish its potential as a biofungicide in the control of Forl.

que, conocer el contenido de ANDG en los extractos de *L. tridentata* brindará información sobre su efecto en el control de hongos fitopatógenos. Las propiedades antifúngicas de *L. tridentata* han sido corroboradas con trabajos desde hace aproximadamente 40 años mediante ensayos *in vitro* con al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia en el área agrícola (López *et al.*, 2005; Lira-Saldivar *et al.*, 2006); sin embargo, son escasos los estudios *in vitro* contra Forl y realizar un ensayo bajo estas condiciones, marcaría la pauta para probar los extractos en condiciones *in vivo*, ya que a pesar de los resultados prometedores que se han publicado, la evidencia que se tiene de ensayos en invernadero o campo es insuficiente. El objetivo del presente estudio fue cuantificar el contenido de NDGA en extractos de *L. tridentata* para evaluar su efectividad *in vitro* y bajo condiciones de invernadero para establecer su potencial como biofungicida en el control de Forl.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el año de 2014 en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y el Centro Experimental de Transferencia y Tecnología 910 del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) en Ciudad Obregón, Sonora, así como en el laboratorio de Ecología Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) A.C. en Hermosillo, Sonora.

### Obtención de la cepa de Forl

La cepa de Forl, se aisló previamente de la rizósfera de plantas de tomate cultivadas en un invernadero comercial del Valle del Yaqui, Sonora. El hongo se caracterizó por comparación de sus características coloniales y morfológicas mediante

## MATERIALS AND METHODS

This investigation was carried out in the year 2014 in the Plant Biotechnology laboratory and in the Experimental Transfer and Technology Center 910 of the Sonora Institute of Technology (ITSON) in Ciudad Obregón, Sonora, as well as the Ecological Chemistry laboratory in the Food and Development Research Center (CIAD) A.C. Hermosillo, Sonora.

### Obtaining the Forl strain

The Forl strain was previously isolated from the rhizosphere of tomato plants grown in a commercial greenhouse in the Yaqui Valley, Sonora. The fungus was distinguished by comparing its colonial and morphological characteristics using specialized literature (Leslie and Summerell, 2016; Nelson *et al.*, 1983), which was identified molecularly with specific primers according to Hirano and Arie (2006) (data not published). A copy of the isolation is kept as Forl<sub>mx-19</sub> in the microorganism bank of the Ecological Chemistry Lab in the microorganism bank of the Ecological Chemistry Lab in the Research Center for Food and Development, Civil Association (CIAD A.C.), Hermosillo, Sonora.

### Obtaining *L. tridentata* extracts and content of nordihydroguaiaretic acid (NDGA).

Preparation of the extracts. Extracts were produced using four solvents: dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), and water (H<sub>2</sub>O) using young *L. tridentata* leaf and stem samples from the Sonora desert (Peñuelas *et al.*, 2015). For the DCM and MeOH extracts, 90 g of dry and crushed *L. tridentata* leaves were used to for separate extractions, with each solvent in a Soxhlet system at 39 and 64.7 °C, respectively, for

el uso de literatura especializada (Leslie and Summerell, 2016; Nelson *et al.*, 1983) el cual se identificó molecularmente con primers específicos según Hirano y Arie (2006) (datos no publicados). Una copia del aislado se encuentra resguardada como Forl<sub>mx</sub>-19 en el banco de microorganismos del laboratorio de Ecología Química del CIAD A.C. Hermosillo, Sonora.

### **Obtención de extractos de *L. tridentata* y contenido de ácido nordihidroguayarático (ANDG).**

Preparación de los extractos. Se elaboraron extractos con cuatro disolventes: diclorometano (DCM), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y agua (H<sub>2</sub>O) a partir de muestras de hojas y tallos jóvenes de *L. tridentata* del desierto Sonorense (Peñuelas *et al.*, 2015). Para los extractos de DCM y MeOH, se partió de 90 g de hojas secas y pulverizadas de *L. tridentata*, se extrajo por separado, con cada disolvente en sistema Soxhlet a 39 y 64.7 °C, respectivamente, durante 15 h de reflujo, seguida de una evaporación rotatoria. Para el extracto EtOH y acuoso, se maceró 1 kg de material fresco en 10 L de solución etanol:agua 7:3 (v/v) durante 8 días a temperatura ambiente (25 °C) y en la obscuridad. Transcurrido este tiempo, se filtró con gasa y posteriormente en papel (Whatman #5). El filtrado se sometió a evaporación rotatoria, la fase sólida se consideró como extracto EtOH y el sobrenadante se congeló a -45 °C y liofilizó para considerarse como extracto acuoso. Se cuantificó el contenido de ANDG en los cuatro extractos obtenidos, mediante cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC), en un sistema HPLC (Hewlett Packard series 1100, Alemania) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) en el Laboratorio de Ecología Química de CIAD A.C. Hermosillo, Sonora. Se siguió la metodología propuesta por Hyder *et al.* (2002) con el uso de una columna

15 h of reflux, followed by rotatory evaporation. For the EtOH and aqueous extracts, 1 kg of fresh material was softened in 10 L of an ethanol:water solution 7:3 (v/v) for 8 days at room temperature (25 °C) and in the dark. After time it was filtered using gauze and then paper (Whatman #5). The filtrate underwent rotatory evaporation; the solid phase is considered as EtOH extract, and the supernatant was frozen at -45 °C and freeze-dried to be considered as the aqueous extract. The NDGA content was quantified in the four extracts obtained using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), in a HPLC system (Hewlett Packard series 1100, Germany) connected to a diode arrangement detector (DAD) in the Ecological Chemistry Laboratory in CIAD A.C. Hermosillo, Sonora. We used the methodology proposed by Hyder *et al.* (2002) with an ODS C-18 hypersil column and as a mobile phase: A: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 % and B: 85 % acetonitrile-14 % H<sub>2</sub>O-1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in a 60/40 proportion, with Isocratic elution, and a flow of 1 mL min<sup>-1</sup>. The detection was carried out at a wavelength of 283 nm. For the quantification, a calibration curve was created with the NDGA standard (purity ≥ 90 %, Sigma Aldrich, United States). The volume of injection of the NDGA standard and the samples was 25 µL.; the data were analyzed using the software Chemstation (Hewlett Packard, Germany).

### **Determination of the percentage of inhibition of Forl by *L. tridentata* extracts.**

We used the poisoned medium method (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007), which consists in pouring the extracts in the agar dextrose potato (ADP) culture medium in sterile, 5 cm petri dishes; after the medium has solidified, a sample of the vigorous growth margin of the 12-day old strain was planted by poking the center. The period of incubation lasted 7 days at 28 °C.

hypersil ODS C-18 y como fase móvil: A: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 % y B: 85 % acetonitrilo-14 % H<sub>2</sub>O-1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en proporción 60/40, con elución isocrática, flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La detección se realizó a una longitud de onda de 283 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con el estándar de ANDG (pureza ≥ 90 %, Sigma Aldrich, Estados Unidos). El volumen de inyección del estándar de ANDG y las muestras fue de 25 µL., los datos se analizaron en el software Chemstation (Hewlett Packard, Alemania).

### Determinación del porcentaje de inhibición de Forl por efecto de la aplicación de extractos de *L. tridentata*

Se utilizó el método de medio envenenado (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007) que consiste en vertir los extractos al medio de cultivo papa dextrosa agar (ADP) en cajas petri estériles de 5 cm; posterior a la solidificación del medio, se sembró por picadura central una muestra del margen de crecimiento vigoroso de la cepa aislada de 12 días de edad. El periodo de incubación fue de 7 días a 28 °C.

Variables evaluadas. Se registró diariamente el crecimiento micelial a partir del tercer día de incubación, midiendo en mm en dos diámetros cruzados, el monitoreo se detuvo al alcanzar el testigo el 100 % de la caja. La inhibición se determinó con la fórmula del *porcentaje de inhibición*=(dc-dt/dt) x100, donde dc es el diámetro promedio del crecimiento micelial del control y dt es el diámetro del crecimiento micelial con los diferentes extractos (Lira-Saldivar *et al.* 2003).

Diseño experimental. Se empleó un análisis factorial 4x5, donde el factor A fueron los extractos y B las concentraciones (Cuadro 1). El diseño experimental fue completamente al azar y se empleó un ANOVA y comparación de medias por Tukey (p≤0.05) en el software Statgraphics 5.1.

### Variables evaluated

The mycelial growth was recorded every day starting on day 3 of incubation, measuring in mm the two crossed diameters; monitoring ceased when the control reached 100% of the Petri dish. The inhibition was determined using the formula of the *percentage of inhibition*=(dc-dt/dt)x100, where dc is the average diameter of the mycelial growth of the control, and dt is the diameter of the mycelial growth with the different extracts (Lira-Saldivar *et al.* 2003).

### Experimental design

A 4x5 factorial analysis was used, where A were the extracts, and B, the concentrations (Table1). The experimental design was completely random, and an ANOVA was used, along with a Tukey average comparison test (p≤0.05) in the software Statgraphics 5.1.

### Biotest *in vivo*.

This was carried out under greenhouse conditions in the Experimental Transfer and

**Cuadro 1. Diseño experimental de los bioensayos in vitro de los extractos de *L. tridentata*.**

**Table 1. Experimental design of the in vitro iotests of the *L. tridentata* extracts.**

Tratamientos	Concentraciones (ppm)			
	DCM <sup>v</sup>	MeOH <sup>w</sup>	EtOH <sup>x</sup>	H <sub>2</sub> O <sup>y</sup>
1 <sup>z</sup>	0	0	0	0
2	500	500	500	500
3	750	750	750	750
4	1000	1000	1000	1000
5	2000	2000	2000	2000

<sup>v</sup>diclorometano, <sup>w</sup>metanol, <sup>x</sup>etanol, <sup>y</sup>agua, <sup>z</sup>control negativo: ADP mezclado con acetona:agua / <sup>v</sup>dichloromethane <sup>w</sup>methanol, <sup>x</sup>ethanol, <sup>y</sup>water, negative control: ADP mixed with acetone:water

### Bioensayo *in vivo*

Se realizó en condiciones de invernadero en el Centro Experimental y Transferencia de Tecnología 910 (CETT-910) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) en el Valle del Yaqui, Sonora. Se emplearon 100 plántulas comerciales de tomate tipo cocktail var. F1 Prolyco2 con 35 días de crecimiento. El manejo agronómico del cultivo (fertilización, riegos y manejo cultural) se realizó de acuerdo a la Agenda Técnica Agrícola de Sonora (SAGARPA, 2015).

**Inoculación de Forl.** Se sembró por estría la cepa aislada de Forl, en botellas Roux con 250 ml de ADP adicionado con 3.5 ml de ácido tartárico al 10 %, previamente esterilizadas y gelificadas según la NOM-111-SSA1-1994 y Camacho *et al.* (2009). Se incubaron a 28 °C por 7 días hasta obtener desarrollo del micelio. Se colocaron sobre el agar, perlas de vidrio y tween 20 al 0.02 %, mediante movimientos suaves se recuperaron los conidios en un matraz estéril. Se realizó un conteo en la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  con agua destilada. En esta solución inoculante se sumergieron por 30 min las raíces de las plántulas, previamente heridas con bisturí en las raíces secundarias, posteriormente, se trasplantaron en macetas de 9 L que contenían suelo tipo franco arcilloso del Valle del Yaqui, Sonora.

**Aplicación de tratamientos.** Para lograr la adhesión de las diferentes concentraciones de los extractos evaluados, se utilizó el adherente agrícola Gardytec® (Técnica Mineral S.A. de C.V) a razón de 1 L  $\text{ha}^{-1}$ . Se reactivaron los extractos en acetona a razón de 100 ml  $\text{ml}^{-1}$  (extracto DCM y EtOH) y acetona:agua (extracto MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$ ), se agregó el adherente agrícola y se mezcló hasta obtener una suspensión. Cada 7 días después del trasplante, descubriendo la parte superior de la raíz se aplicó el extracto correspondiente alrededor de esta.

Technology Center 910 of the Sonora Institute of Technology (ITSON) in the Yaqui Valley, Sonora. One hundred commercial cocktail tomato seedlings var. F1 Prolyco2 with 35 days of growth were used. The agronomic management of the crop (fertilization, irrigation, and cultural handling) was carried out according to the Sonora Technical Agricultural Agenda (SAGARPA, 2015).

**Inoculation of Forl.** The streak plate method was previously used to culture the Forl strain in Roux bottles with 250 ml of ADP with 3.5 ml of tartaric acid at 10 %, previously sterilized and gellified according to NOM-111-SSA1-1994 and Camacho *et al.* (2009). They were incubated at 28 °C for 7 days until the mycelium developed. Glass and 20 al 0.02 % tween beads were placed on the agar; using soft movements, the conidia were moved to a sterilized beaker. They were counted in a Neubauer chamber, and adjusted to a concentration of  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  with distilled water. The roots of the plantlets were submerged for 30 min in this inoculant solution after having cut an incision into their secondary roots with a scalpel. They were then transplanted into 9 L pots containing clay loam soil from the Yaqui Valley, Sonora.

**Application of treatments.** To achieve the adhesion of the different concentrations of the extracts evaluated, the agricultural adherent® (Técnica Mineral S.A. de C.V) was used, at 1 L  $\text{ha}^{-1}$ . The extracts were reactivated in acetone at 100 ml  $\text{ml}^{-1}$  (extract DCM and EtOH) and acetone:water (extract MeOH and  $\text{H}_2\text{O}$ ), the agricultural adherent was added and mixed until a suspension was obtained. Every 7 days after transplanting, uncovering the top section of the root, the pertinent extract was applied to it.

### Variables evaluated

The following measurements were taken, 49 days after inoculation (dai): chlorophyll index with

## VARIABLES EVALUADAS

Se efectuaron las siguientes mediciones a los 49 días después de la inoculación (ddi): índice de clorofila con SPAD 502 de Minolta (entre las 11:00 y 14:00 h) en unidades clorofila (UC), altura de la planta con un flexómetro (desde la base del tallo hasta el ápice) y el número de hojas. Posterior a la aparición de la 5ª hoja verdadera se evaluó cada planta en una escala del 1 al 5 (Cuadro 2) según la intensidad de la enfermedad (Marlatt *et al.* 1996). Una vez clasificadas, se calculó el índice de severidad con la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943):  $Severidad = (\sum nv / 5N) \times 100$ , donde n= plantas por cada categoría; v= valor de cada categoría; N= plantas en unidad experimental. Los datos se normalizaron con logaritmo natural antes del ANOVA. La incidencia se calculó por el porcentaje de plantas que presentaron algún síntoma de infección de Forl. Se consideran sobrevivientes las plantas que al término del experimento permanecieron vivas.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un arreglo completamente al azar con 10 tratamientos y 10 repeticiones (Cuadro 3). Las concentraciones de los tratamientos se definieron de acuerdo a los resultados de la CMI previamente realizado. Se realizó un ANOVA y prueba de rangos múltiples con el software Statgraphics plus versión 5.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación del porcentaje de inhibición de Forl por efecto de la aplicación de extractos de *L. Tridentata*

En el Cuadro 4 se muestra la actividad de los extractos evaluados sobre el crecimiento micelial

### Cuadro 2. Escala para la evaluación de severidad de Forl en el cultivo de tomate.

Table 2. Scale to evaluate the severity of Forl in the tomato crop.

Clase	Intensidad de la enfermedad
1	No presenta síntomas
2	Clorosis leve, marchitamiento de la planta
3	Clorosis moderada y disminución del crecimiento de la planta
4	Clorosis severa, marchitez y disminución del crecimiento de la planta
5	Muerte de la planta

Marlatt *et al.* (1996)

Minolta SPAD 502 (between 11:00 and 14:00 h) in chlorophyll units (CU), plant height with measuring tape (from the base of the stem to the apex) and number of leaves. After the emergence of the 5th true leaf, each plant was evaluated on a scale of 1 to 5 (Table 2), depending on the intensity of the disease (Marlatt *et al.* 1996). Once classified, the severity index was calculated using the formula by Townsend and Heuberguer (1943):  $Severity = (\sum nv / 5N) \times 100$ , where n= plants per each category; v= value of each category; N= plants in experimental units. The data were normalized with a natural logarithm before. The incidence was calculated by the percentage of plants that showed some symptom of Forl infection. Plants were considered survivors if they remained alive after the completion of the experiment.

## EXPERIMENTAL DESIGN

A totally random design was applied with 10 treatments and 10 repetitions (Table 3). The concentrations of the treatments were defined according to the results of the CMI performed previously. An ANOVA was carried out, as well as a multiple range test using the software Statgraphics plus version 5.1.



**Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el bioensayo *in vivo*.**  
**Table 3. Treatments applied in the *in vivo* biotest.**

Tratamiento	Concentración	Tratamiento	Concentración
1	Testigo sin aplicación	6	EtOH 3000 ppm
2	<sup>u</sup> Tecto 60 2 L/Ha	7	<sup>x</sup> MeOH 3000 ppm
3	<sup>v</sup> DCM 2000 ppm	8	MeOH 6000 ppm
4	DCM 3000 ppm	9	<sup>y</sup> H <sub>2</sub> O 3000 ppm
5	<sup>w</sup> EtOH 2000 ppm	10	H <sub>2</sub> O 6000 ppm

<sup>u</sup>fungicida comercial, <sup>v</sup>diclorometano, <sup>w</sup>etanol, <sup>x</sup>metanol, <sup>y</sup>agua / <sup>u</sup>commercial fungicide, <sup>v</sup>dichloromethane, <sup>w</sup>ethanol, <sup>x</sup>methanol, <sup>y</sup>water.

de Forl. El extracto de *L. tridentata* con DCM presentó inhibición de 98 % a 750 ppm, 94 % el MeOH a 2000 ppm y 97 % el EtOH a 500 ppm, lo que significa que los compuestos extraídos con EtOH tuvieron mayor poder fungicida sobre Forl *in vitro*. Estos resultados sirvieron de base para determinar las dosis para los tratamientos *in vivo*, considerando la concentración de cada extracto ( $p \leq 0.05$ ) que inhibió completamente el crecimiento micelial del hongo. Se decidió aumentar la concentración a 3000 y 6000 ppm del extracto H<sub>2</sub>O, por presentar poco efecto sobre la inhibición del crecimiento de Forl.

La máxima inhibición del extracto hidroalcohólico de *L. tridentata* se ha reportado en 7000 y 5000 ppm para *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp., respectivamente (Moreno-Limón *et al.*, 2011). El efecto antifúngico de *L. tridentata* se atribuye a los compuestos fenólicos, debido a que extractos polifenólicos inhibieron al máximo con 0.7 ppm en *Pythium* sp., *Colletotrichum truncatum*, *C. cocco-des*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. sambucinum* y *Rhizoctonia solani* (Osorio *et al.*, 2010).

Entre los compuestos fenólicos de *L. tridentata* destaca el ANDG, compuesto que se extrae de la resina en hojas y tallos (Lira *et al.*, 2003). La cantidad que se extrajo de éste compuesto está directamente relacionado al grado de polaridad del

## RESULTS AND DISCUSSION

### Determination of the percentage of Forl inhibition by the effect of applying *L. Tridentata* extracts.

Table 4 shows the activity of the extracts on the mycelial growth of Forl. The *L. tridentata* extract with DCM displayed an inhibition of 98 % at 750 ppm; 94 % for MeOH at 2000 ppm, and 97 % for EtOH at 500 ppm, which indicates that the compounds extracted with EtOH had a greater fungicidal power over Forl *in vitro*. These results

**Cuadro 4. Efecto de los extractos de *L. tridentata* sobre el crecimiento micelial de Forl.**

**Table 4.** Effect of the *L. tridentata* extracts on the mycelial growth of Forl.

Concentración (ppm)	Extractos (% inhibición)			
	<sup>v</sup> DCM	<sup>w</sup> MeOH	<sup>x</sup> EtOH	<sup>y</sup> H <sub>2</sub> O
0	0 c	0 c	0 b	0 c
500	89 b	84 b	97 a	25 b
750	98 a	85 ab	100 a	25 b
1000	100 a	85 ab	100 a	29 ab
2000	100 a	94 a	100 a	41 a

<sup>v</sup>diclorometano, <sup>w</sup>metanol, <sup>x</sup>etanol, <sup>y</sup>agua / <sup>v</sup>dichloromethane, <sup>w</sup>methanol, <sup>x</sup>ethanol, <sup>y</sup>water.

Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ ) / Different letters represent significant differences between treatments (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

disolvente (Moreno-Limón *et al.*, 2011). De éste modo, en el presente ensayo se cuantificaron 68, 64, 6.07 y 2.8 mg g<sup>-1</sup> de ANDG en los extractos de DCM, EtOH, MeOH y H<sub>2</sub>O, respectivamente, correlacionando las concentraciones cuantificadas en los extractos con el efecto sobre el crecimiento micelial que se presenta en el Cuadro 4.

Es sumamente complejo estandarizar una recomendación para el uso de extractos en el control de microorganismos fitopatógenos, ya que además del triángulo básico hospedero-patógeno-clima, influyen gran cantidad de factores como: disolvente y condiciones de extracción, latitud y altitud de la zona de muestreo de *L. tridentata* (Lira-Saldivar *et al.*, 2003), variabilidad en razas y patogenicidad entre las formas especiales de *F. oxysporum* Fol y Forl; más aún, *in vivo* debe considerarse el efecto de la biodiversidad de organismos en el suelo y ambiente.

### Bioensayo *in vivo*

**Índice de clorofila.** El contenido de clorofila en las hojas se muestra en el Cuadro 5. Todos los extractos presentaron niveles superiores ( $p < 0.05$ ) en comparación con el testigo absoluto y el fungicida comercial. Destacan los tratamientos con H<sub>2</sub>O 6000, DCM 3000 y MeOH 4000 ppm con 49, 48 y 45 unidades de clorofila, respectivamente, los cuales son valores superiores a los reportados para plantas de tomate sanas (35 y 37 UC) (Mercado-Luna *et al.*, 2010). Los demás tratamientos presentaron valores dentro de este rango, a excepción del testigo y el control positivo donde se observó el daño causado por Forl.

Las UC proveen una medida indirecta y cuantitativa de la cantidad de N en la planta, además del efecto de variables climáticas (Rincón-Castillo y Ligarreto, 2010; Vázquez *et al.*, 2012). Las plantas tratadas con extractos de *L. tridentata* mantuvieron un estado general de bienestar, aun cuando fueron infectadas con Forl.

were used as a basis to determine the doses for the treatments *in vivo*, considering the concentration of each extract ( $p \leq 0.05$ ) the completely inhibited the mycelial growth of the fungus. The concentration was increased to 3000 y 6000ppm of the extract H<sub>2</sub>O, since it presented little effect on the growth inhibition of Forl.

The highest inhibition of the hydroalcoholic extract of *L. tridentata* has been reported at 7000 ppm for *Aspergillus flavus* and 5000 ppm for *Penicillium sp.* (Moreno-Limón *et al.*, 2011). The antifungal effect of *L. tridentata* is attributed to phenolic compounds, because polyphenolic extracts inhibited to the maximum with 0.7 ppm in *Pythium sp.*, *Colletotrichum truncatum*, *C. coccodes*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. Sambucinum* and *Rhizoctonia solani* (Osorio *et al.*, 2010).

Among the phenolic compounds of *L. tridentata*, NDGA stands out since it is extracted from the resin in leaves and stems (Lira *et al.*, 2003). The amount of this compound extracted is directly related to the degree of polarity of the solvent (Moreno-Limón *et al.*, 2011). In this way, this study quantified 68, 64, 6.07, and 2.8 mg g<sup>-1</sup> of NDGA in the extracts of DCM, EtOH, MeOH, and H<sub>2</sub>O, respectively, correlating the concentrations quantified in the extracts with the effect on the mycelial growth shown in Table 4.

Giving a standard recommendation for the use of extracts in the control of phytopathogenic microorganisms, since there is not only the influence of the basic triangle host-pathogen-weather, but also of factors such as solvents and conditions of extraction, latitude and altitude of the area of sampling of *L. tridentata* (Lira-Saldivar *et al.*, 2003), variability in breeds and pathogenicity among the special forms of *F. oxysporum* Fol and Forl; furthermore, *in vivo* one must consider the effect of the biodiversity of organisms in the soil and the surroundings.

**Cuadro 5. Desarrollo vegetativo de plantas de tomate inoculadas con Forl y tratadas con extractos de *L. tridentata* a los 49 ddi.**  
**Table 5. Vegetative development of tomato plants inoculated with Forl and treated with *L. tridentata* extracts at 49 dai.**

Tratamientos	Concentraciones	Clorofila (UC)	Altura de planta (cm)	Número de hojas
1	Testigo sin aplicación	29.5 a	18.0 a	2.0 a
2	<sup>u</sup> Tecto 60 2 L/Ha	35.5 abc	68.5 b	11.2 b
3	<sup>v</sup> DCM 2000 ppm	40.5 abc	78.6 bcd	14.0 bc
4	DCM 3000 ppm	43.7 c	97.0 cd	16.8 c
5	<sup>w</sup> EtOH 2000 ppm	36.9 bc	75.0 bc	13.2 bc
6	EtOH 3000 ppm	35.4 abc	90.9 bcd	13.5 bc
7	<sup>x</sup> MeOH 3000 ppm	43.0 c	101.5 d	17.0 c
8	MeOH 6000 ppm	41.0 bc	80.8 bcd	13.8 bc
9	<sup>y</sup> H <sub>2</sub> O 3000 ppm	40.9 abc	101.8 cd	16.3 bc
10	H <sub>2</sub> O 6000 ppm	44.0 ab	90.0 bcd	15.0 bc

<sup>u</sup>fungicida comercial, <sup>v</sup>diclorometano, <sup>w</sup>etanol, <sup>x</sup>metanol, <sup>y</sup>agua. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) / <sup>u</sup>commercial fungicide, <sup>v</sup>dichloromethane, <sup>w</sup>ethanol, <sup>x</sup>methanol, <sup>y</sup>water. Different letters represent significant differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

**Altura de planta.** En el Cuadro 5, se observan los valores de la altura de las plantas en cada tratamiento, todos los extractos fueron estadísticamente superiores ( $p \leq 0.05$ ) al testigo absoluto y fungicida comercial, desde la primera semana hasta el término del experimento. Los tratamientos H<sub>2</sub>O 4000, MeOH 4000 y DCM 3000 ppm, presentaron plantas con 49, 48, 42 % mayor altura, respecto a las plantas que recibieron el fungicida comercial. Se reportaron incrementos en altura de plantas de tomate (144 y 148 %) por Díaz-Díaz *et al.* (2013) con extractos de *L. tridentata* en concentraciones de 3000 y 2000 ppm con el uso de MeOH y acetona como disolventes. En el testigo absoluto (0 ppm) se observó retraso en el crecimiento general, a consecuencia de la sintomatología característica de Forl: invasión de raíz, pérdida prematura de hojas inferiores y pudrición de la radícula. Los extractos de Neem (*Azardiachta indica*) al igual que *L. tridentata* favorecen la altura (hasta en un 35 % comparado con el testigo) de plantas de tomate cuando han sido infectadas con *F. oxysporum* (Hadian *et al.*, 2011).

#### Biotest *in vivo*

**Chlorophyll index.** The content of chlorophyll in the leaves is shown in Table 5. All the extracts displayed higher levels ( $p < 0.05$ ) in comparison with the absolute control and the commercial fungicide. The treatments worth pointing out are those with H<sub>2</sub>O 6000, DCM 3000, and MeOH 4000 ppm with 49, 48, and 45 units of chlorophyll, respectively, which are values higher than those reported for healthy tomato plants (35 and 37 UC) (Mercado-Luna *et al.*, 2010). The remaining treatments presented values within this range, except for the control and the positive control, which showed the damage caused by Forl.

The UCs provide an indirect and quantitative measure of the amount of N in the plant, as well as the effect of weather variables (Rincón-Castillo and Ligarreto, 2010; Vázquez *et al.*, 2012). The plants treated with *L. tridentata* extracts maintained an overall state of well-being, even after having been infected with Forl.

**Número de hojas.** Todos los tratamientos presentaron mayor número de hojas ( $p \leq 0.05$ ) que el testigo absoluto, sobresaliendo los tratamientos MeOH 4000, DCM 3000, H<sub>2</sub>O 4000 ppm, con 52, 50 y 45 % más hojas que el fungicida comercial, respectivamente (Cuadro 5). Díaz-Díaz *et al.* (2013) registraron un incremento de 25 % en el peso seco al aplicar extractos de *L. tridentata* a 3000 y 2000 ppm en plantas de tomate inoculadas con *P. capsici* lo que da cuenta de una mayor desarrollo vegetativo al igual que los resultados aquí presentados; se reporta también el uso de infusión de *L. tridentata* como estimulante del desarrollo vegetal en tomate, en combinación con lanolina y manteca de cacao, al aumentar el peso seco (77 %) y fresco (100 %) (Recinos, 2010). No se observaron signos de toxicidad en las dosis utilizadas, al igual que los extractos acuosos de *L. tridentata* al 30 % y después de 5 días de aplicación (Rojob, 2008). La infestación de Forl, implica marchitez de las hojas inferiores hacia la parte superior (Fernández-Herrera *et al.*, 2013) por lo que los bajos niveles de infestación permitió a las plantas generar y conservaron mayor número de hojas que el testigo absoluto y fungicida comercial.

**Severidad.** Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos MeOH a 4000 y DCM a 3000 ppm, los cuales presentaron índices de severidad de 55 y 57 % (respectivamente) en comparación con el 94 % del testigo absoluto y H<sub>2</sub>O 6000 ppm. Díaz-Díaz *et al.* (2013) reportaron hasta 83 % de disminución en la severidad al evaluar plantas de tomate infectadas con *P. capsici* y tratadas con extractos de *L. tridentata* y acetona a concentraciones de 2000 ppm. Los resultados mostrados (Figura 1-A) señalan un 45 % de disminución de la severidad en MeOH 4000ppm y se establece la relación entre las variables del desarrollo vegetativo y la PCT. Existe un comportamiento

**Plant height.** Table 5 shows the values for plant height in each treatment; all the extracts were statistically higher ( $p \leq 0.05$ ) to the absolute control and commercial fungicide, from the first week to the end of the experiment. Treatments H<sub>2</sub>O 4000, MeOH 4000, and DCM 3000 ppm, presented plants 49, 48, 42 % taller than plants that received the commercial fungicide. Increases in plant height were reported for tomato plants (144 and 148 %) by Díaz-Díaz *et al.* (2013) with *L. tridentata* extracts in concentrations of 3000 and 2000 ppm with the use of MeOH and acetone as solvents. The absolute control (0 ppm) showed general growth delay caused by the typical symptomatology of Forl: invasion of the root, premature loss of lower leaves and rot of the radicle. The Neem (*Azardiachta indica*) and *L. tridentata* extracts favor height (up to 35 % in comparison to the control) in tomato plants when they have been infected with *F. oxysporum* (Hadian *et al.*, 2011).

**Leaf number.** All the treatments presented a higher number of leaves ( $p \leq 0.05$ ) than the absolute control, particularly the treatments MeOH 4000, DCM 3000, H<sub>2</sub>O 4000 ppm, with 52, 50, and 45 % more leaves than the commercial fungicide, respectively (Table 5). Díaz-Díaz *et al.* (2013) recorded a 25 % increase in dry weight when applying extracts of *L. tridentata* by 3000 and 2000 ppm in tomato plants inoculated with *P. capsici*, which accounts for a greater vegetative growth, as in the results presented in this investigation; the use of *L. tridentata* as an infusion is also reported as a stimulant tomato plant growth in combination with lanoline and cocoa butter, since it increases dry (77 %) and fresh weights (100 %) (Recinos, 2010). No signs of toxicity were observed in the doses used, as was the case in the aqueous extracts of *L. tridentata* at 30 % and after 5 days of application (Rojob, 2008). The infestation by Forl implies the wilting of the lower

similar entre los tratamientos DCM 3000, MeOH 4000 y H<sub>2</sub>O 4000 ppm, con los cuales se obtuvieron menores índices de severidad y valores superiores de clorofila, altura y número de hojas respecto al fungicida comercial, considerándose el primer reporte sobre la severidad que presenta Forl sobre plantas de tomate que han sido tratadas con extractos de *L. tridentata*.

El extracto DCM 3000 ppm, presentó el mínimo índice de severidad y un desarrollo vegetativo superior respecto al fungicida comercial, así como una inhibición del 100% a 1000 ppm en el bioensayo *in vitro* de Forl y mayor contenido de ANDG. En relación con lo anterior, Martins *et al.* (2012) plantearon que la actividad antifúngica de *L. tridentata* se atribuye a tres compuestos: ANDG, kaempferol y quercetina, los cuales son sumamente compatibles con el disolvente diclorometano encontrándose en mayor disponibilidad por la polaridad que estos poseen. Hanaa *et al.* (2011) y Villa-Martínez (2015) emplearon extractos acuosos de neem y sauce (*Salix babylonica*) en plántulas de tomate, los cuales redujeron la incidencia de la enfermedad de la marchitez por *F. oxysporum* en plántulas de tomate hasta casi un 30%, mediante el aumento de las actividades de las enzimas defensivas antioxidantes secretadas por la planta de tomate, como la peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa.

**Incidencia.** Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ); el 100 % de las plantas tratadas con los tratamientos testigo y H<sub>2</sub>O 6000 ppm registraron síntomas de infección de Forl (Figura 1-B); sin embargo, al aplicar los extractos DCM 3000 y MeOH 4000 ppm la incidencia alcanzó apenas 40 y 50 %, respectivamente. No encontramos reportes de ensayos *in vivo* para control de Forl con extractos de *L. Tridentata*; sin embargo, en plantas de zanahoria se reportó 5 % de incidencia de tizón de la hoja causado por *A. dauci* al aplicar

leaves towards the top (Fernández-Herrera *et al.*, 2013), and therefore the lower levels of infestation helped the plants generate and preserve a higher number of leaves than the absolute control and the commercial fungicide.

**Severity.** Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found between the treatments with MeOH at 4000 and DCM at 3000 ppm, which displayed severity indices of 55 and 57 % (respectively) in comparison with the 94% of the absolute control and H<sub>2</sub>O 6000 ppm. Díaz-Díaz *et al.* (2013) reported reductions of up to 83 % in severity when evaluating tomato plants infected with *P. capsici* and treated with *L. tridentata* extracts and acetone at concentrations of 2000 ppm. The results shown (Figure 1-A) indicate a reduction of 45% in the severity in MeOH 4000ppm, and a relation is established between the variables of vegetative growth and. There is a similar behavior between treatments DCM 3000, MeOH 4000, and H<sub>2</sub>O 4000 ppm, which gave lower severity indices and higher levels of chlorophyll, height, and number of leaves than the commercial fungicide, taking into account the first report on the severity of Forl on tomato plants that have been treated with *L. tridentata* extracts.

The extract DCM 3000 ppm presented the lowest severity index and a higher vegetative development than the commercial fungicide, as well as an inhibition of 100% at 1000 ppm in the Forl *in vitro* biotest and a higher NDGA content. In regard to this, Martins *et al.* (2012) stated that the antifungal activity of *L. tridentata* can be attributed to three compounds: NDGA, kaempferol, and quercetin, which are highly compatible with the solvent dichloromethane, which is more available due to the polarity of the three compounds. Hanaa *et al.* (2011) and Villa-Martínez (2015) used aqueous extracts of neem and willow (*Salix*

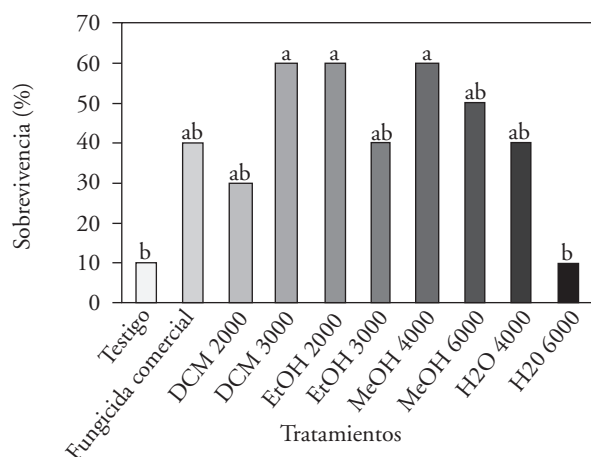
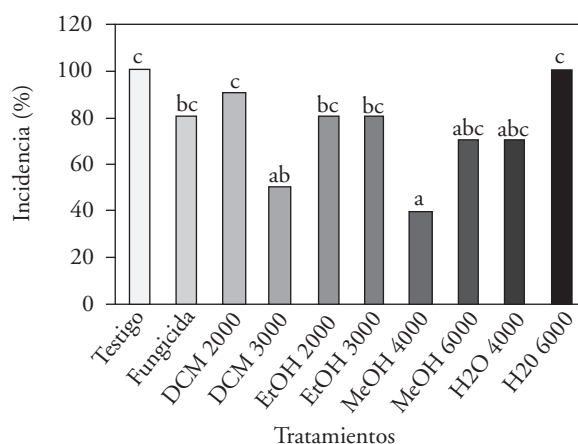
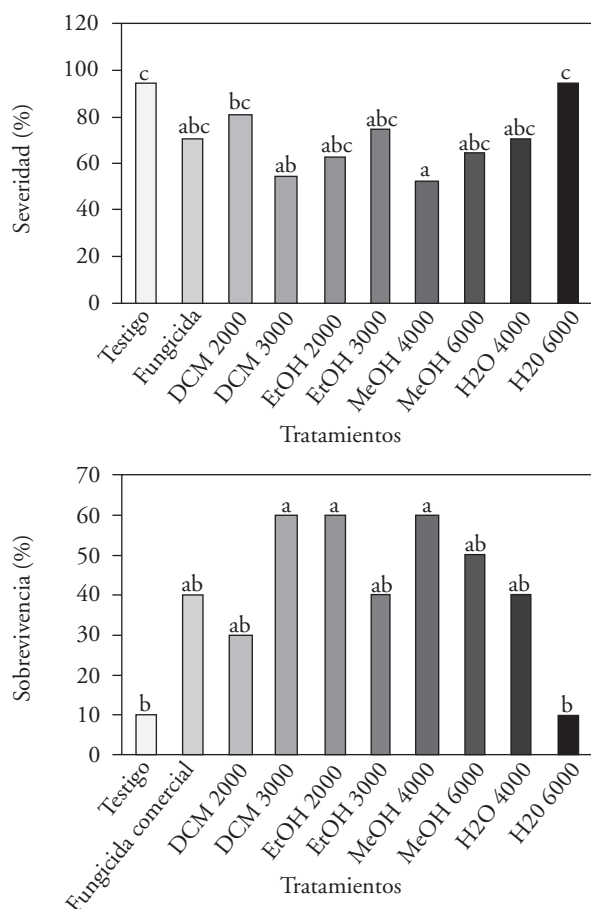


Figura 1. Porcentaje de severidad (A), incidencia (B) y sobrevivencia (C) de plantas inoculadas con Forl.  
Figure 1. Percentage of severity (A), incidence (B) and survival (C) of plants inoculated with Forl.

un extracto hidrosoluble de *L. tridentata*, mezclado con quitosano (Hernández-Castillo *et al.* 2006).

**Sobrevivencia.** A los 49 ddi sobrevivió una de cada diez plantas tratadas con el testigo y H<sub>2</sub>O a 6000 ppm mientras que con los extractos DCM 3000 y MeOH 4000 ppm favorecieron la sobrevivencia del 60 % de las plantas. Con los tratamientos EtOH 2000 y MeOH 6000 ppm 50 % y con el fungicida comercial 40 % (Figura 1-C). Estos resultados demuestran una disminución de la agresividad de Forl por efecto de los extractos vegetales de *L. tridentata*, lo cual puede atribuirse a que las sustancias fenólicas presentes en los extractos reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos

*babylonica*) in tomato plantlets, which reduced the incidence of the disease of wilting by *F. oxysporum* in tomato plantlets by up to 30%, by the increase of the defensive antioxidant enzymes secreted by the tomato plants, such as peroxidase, catalase and the dismutase superoxidase.

**Incidence.** Statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were obtained; 100 % of the plants treated with the control and H<sub>2</sub>O 6000 ppm treatments registered symptoms of Forl infection (Figure 1-B); however, when applying the extracts DCM 3000 and MeOH 4000 ppm, the incidence reached only 40 and 50 %, respectively. No reports were found on *in vivo* tests for the control of Forl with *L.*

de las enzimas volviéndolas catalíticamente inactivas ante este patógeno, favoreciendo por lo tanto la sobrevivencia de las plantas (Tappel y Marr, 1954).

## CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron permiten concluir que los extractos de *L. tridentata* pueden ser utilizados como parte de un manejo integrado de la pudrición de la corona del tomate causada por *F. oxysporum radices-lycopersici* en condiciones *in vivo*. Destaca la consistencia de los extractos de DCM a 3000 ppm y MeOH a 4000 ppm en la incidencia y severidad de Forl y la sobrevivencia en plantas de tomate. Es importante hacer mención que es el primer reporte *in vivo* donde se evalúe la capacidad antifúngica de los extractos de *L. tridentata* sobre Forl en plantas de tomate en el Valle del Yaqui, aunque es recomendable llevar la investigación a nivel de invernadero comercial enfocándose en disolventes más amigables con el medioambiente.

## LITERATURA CITADA

- Apodaca M, Zavaleta E, García R, Osada S y Valenzuela J. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* en Sinaloa México y su control. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1):1-7. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220101>
- Apodaca M, Zavaleta E, Osada S, García R y Valenzuela J. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radices lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1):7-13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222102>
- Arteaga, S, Andrade-Cetto A and Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. Journal of Ethnopharmacology 98(3):231-239. DOI:10.1016/j.jep.2005.02.002
- Atlas Agroalimentario SIAP. 2016. Atlas Agroalimentario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México, D.F. [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016)
- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B y Velázquez O. 2009. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Segunda Edición. Facultad de Química,

*Tridentata* extracts; however, in carrot plants, there were reports of a 5 % incidence of blight caused by *A. dauci* when applying a hydrosoluble extract of *L. tridentata* mixed with chitosan (Hernández-Castillo *et al.* 2006).

**Survival.** At 49 dai, one out of every 10 plants treated with the control and H<sub>2</sub>O at 6000 ppm survived, whereas with extracts DCM 3000 and MeOH 4000 ppm favored the survival of 60 % of the plants. With treatments EtOH 2000 and MeOH 6000 ppm, 50 % and the commercial fungicide, 40 % (Figura 1-C). These reports show a reduction in the aggressiveness of Forl due to the effect of the *L. tridentata* plant extracts, which may be due to the phenolic substances present in the extracts react chemically with the sensitive systems of the enzymes, making them catalytically inactive with this pathogen, therefore favoring the survival of the plants (Tappel and Marr, 1954).

## CONCLUSIONS

The results obtained lead to conclude that the *L. tridentata* extracts can be used as a part of an integrated management of the rotting of the tomato crown caused by *F. oxysporum radices-lycopersici* under *in vivo* conditions. The consistency of the extracts of DCM at 3000 ppm and MeOH at 4000 ppm on the incidence and severity of Forl and the survival in tomato plants, stand out. It is important to mention that this is the first report *in vivo* which evaluates the antifungal capability of *L. tridentata* extracts on Forl in tomato plants in the Yaqui Valley, although it is recommendable to take the investigation to a commercial greenhouse level with more environmentally friendly solvents.

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

- UNAM. México. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones\\_6526.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf)
- Cordero-Ramírez JD, López-Rivera R, Figueroa Lopez AM, Mancera-López ME, Martínez-Álvarez JC, Apodaca-Sánchez MA and Maldonado Mendoza IE. 2013. Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonist effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Journal of Basic Microbiology 53:838-847. DOI: 10.1002/jobm.201200128
- Díaz-Díaz A, Hernández-Castillo FD, Belmares-Cerda RE, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R y Aguilar-González CN. 2013. Efecto de extractos de *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua* en el desarrollo de plantas de tomate inoculadas con *Phytophthora capsici*. Agraria 10(2):49-58. [http://www.redinnovagro.in/docs/Revista\\_Agraria\\_vol\(10\)\\_No\(2\).pdf](http://www.redinnovagro.in/docs/Revista_Agraria_vol(10)_No(2).pdf)
- Domínguez AG. 2012. Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. en jitomate cultivado en suelo bajo invernadero. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI). Yautepec, Morelos, México. <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/12423/Grisel%20Dom%20C3%ADnguez%20Arizmendi%20Noviembre%202012.pdf?sequence=1>
- Fernández-Herrera E, Guerrero J, Rueda E y Acosta M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. Revista Ciencias biológicas y de la salud. Universidad de Sonora 15(3):46-50. <http://www.biocentria.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%207.pdf>
- González HA. 2014. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. Segunda Edición. Elsevier. España. 488p.
- González S y Carrasco J. 2002. Pasos para eliminar el bromuro de metilo en Chile, Tierra adentro, Mayo- Junio, 46-49. [http://www2.inia.cl/medios/tierraadentro/pdf/N68-p46\\_49.pdf](http://www2.inia.cl/medios/tierraadentro/pdf/N68-p46_49.pdf)
- Guerrero-Rodríguez E, Solís-Gaona S, Hernández-Castillo F, Flores-Olivas A, Sandoval-López V y Jasso-Cantú D. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha; *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25(1):48-53. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225107.pdf>
- Hadian S, Rahnema K, Jamali S and Eskandari A. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology 5(8):2052-2057. <http://www.aensiweb.com/old/aeb/2011/2052-2057.pdf>
- Hanna F, Abdou Z, Salama D, Ibrahim M and Srour H. 2011. Effect of neem and willow aqueous extract fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. Annals of agricultural Science 56: 1-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.aoas.2011.05.007>
- Hernández-Castillo F, Aguirre-Aguirre A, Lira-Saldivar R, Guerrero E y Gallegos-Morales G. 2006. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. PHYTON-International Journal of Experimental Botany 75:91-101. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572006000100009](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572006000100009)
- Hirano Y and Arie T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology 72:273-283. DOI:10.1007/s10327-006-0287-7
- SAGARPA-SENASICA-INIFAP. 2015. Agenda Técnica Agrícola de Sonora. Segunda Edición. SAGARPA. México, D.F. 383p.
- Lira-Saldivar R. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville). Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):214-222. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221217.pdf>
- Lira-Saldivar R, Gamboa-Alvarado R, Villareal-Cárdenas L, López-Campos R and Jiménez-Díaz F. 2002. Hydrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the north of Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. PHYTON-International Journal of Experimental Botany 167-172. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=15426010>
- Lira-Saldivar R, Hernández M and Hernández F. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C) Coville L. Extracts and chitosan against fungi that effect horticultural crops. Chapingo Serie Horticultura 12(2):211-216. DOI: [dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.05.023](http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.05.023)
- Leslie J and Summerell B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. USA. 388 p. DOI: 10.1002/9780470278376
- López A, López S, Vázquez M, Rodríguez S, Mendoza M y Padrón E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. *Rhizotocnia solani* Kühn and *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. Revista Mexicana de Fitopatología 23(2):183-190. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- Lira-Saldivar R, Balvanti G, Hernández R, Gamboa D, Jasso R and Jiménez F. 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):97-101. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221201.pdf>
- Marlatt M, Corell J and Kauffman P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. Plant Disease 80:1336-1342. DOI: 10.1094/PD-80-1336.
- Martins S, Aguilar CN, Teixeira JA and Mussato SI. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. Separation and Purification Technology 88:163-167. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>
- Martins S, Amorim E, Sobrinho T, Saraiva AM, Pisciotano M, Aguilar C, Teixeira JA and Mussato SI. 2013. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. Industrial Crops and Products 41:306-311. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.037>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato disease caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection 73:78-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>



- Méndez M, Rodríguez R, Ruiz J, Morales-Adame D, Castillo F, Hernández-Castillo FD and Aguilar CN. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products* 37:445-450. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.017>
- Mercado-Luna A, Rico-García E, Lara-Herrera A, Soto-Zarazúa G, Ocampo-Velázquez R, Guevara-González R, Herrera-Ruiz G and Torres-Pacheco I. 2010. Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology* 9(33):5326-5332. DOI: 10.5897/AJB10.130
- Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila MI y Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n32/n32a12.pdf>
- Nelson PE, Tousson TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.
- NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.economia-noms.gob.mx> (consulta, enero 2017).
- Osorio E, Flores M, Hernández D, Ventura D, Rodríguez R and Aguilar C. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 31:153-157. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669009001861>
- Peñuelas- Rubio O, Arellano-Gil M, Vargas-Arispuro I, Lares-Villa F, Cantú-Soto E, Hernández-Rodríguez SE, Gutiérrez-Coronado MA y Mungarro-Ibarra C. 2015. Bioactividad *in vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Revista Polibotánica* 40(12):183-198. DOI: 10.18387/polibotanica.40.12
- Quilambaqui H. 2005. Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp. asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. *Revista Tecnológica ESPOL* 18(1):135-140. <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/238/180>
- Recinos DAL. 2010. Efecto del uso de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah., México. pp. 28-30. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4422/T17687%20RECINOS%20DIAZ,%20ANA%20LI-LIAN%20%2061068.pdf?sequence=1>
- Rincón-Castillo A y Ligarreto G. 2010. Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Piedemonte Llanero colombiano. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2): 122-128. <http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945029003.pdf>
- Rojob A. 2008. Control *in vitro* con extractos vegetales de patógenos que afectan el cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de licenciatura de la Universidad Autónoma de Querétaro. <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2802/1/RI002644.pdf>
- Szczechura W, Staniaszek M and Habdas H. 2013. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-the cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. *Journal of Plant Protection Research* 53(2): 172-176. DOI: 10.2478/jppr-2013-0026
- Tappel A and Marr G. 1954. Effect of alpha-tocopherol, propyl gallate and nordihydroguaiaretic acid on enzymatic reaction. *Agricultural and Food Chemistry* 2(11):554-558. DOI: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60031a003>
- Townsend GR and Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27:340-343.
- Ulacio D, Salas J, Querales P y Sanabria M. 2002. Microbiota del suelo de zonas productoras de papa del estado Mérida y su relación con *Rizhoctonia solani*. *Bioagro (Venezuela)* 14(1):11-16. [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14\(1\)/2.%20Microbiota%20del%20suelo.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev14(1)/2.%20Microbiota%20del%20suelo.pdf)
- Vázquez M, Jiménez S, Torres I, Anaya I, Mendoza H y Guevara R. 2012. Comportamiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) asperjadas con ácido salicílico cultivadas bajo diferentes condiciones climáticas en invernadero. *Ciencia@UAQ* 5(1):1-9. [http://www.uaq.mx/investigacion/revista\\_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v5-n1/articulo6.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v5-n1/articulo6.pdf)
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto Sotelo M, Soto-Parra J y Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* 64(2):194- 205. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Vogt V, Cifuentes D, Tonn C, Sabini L and Rosas S. 2013. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Industrial Crops and Products* 42:583-586. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.009