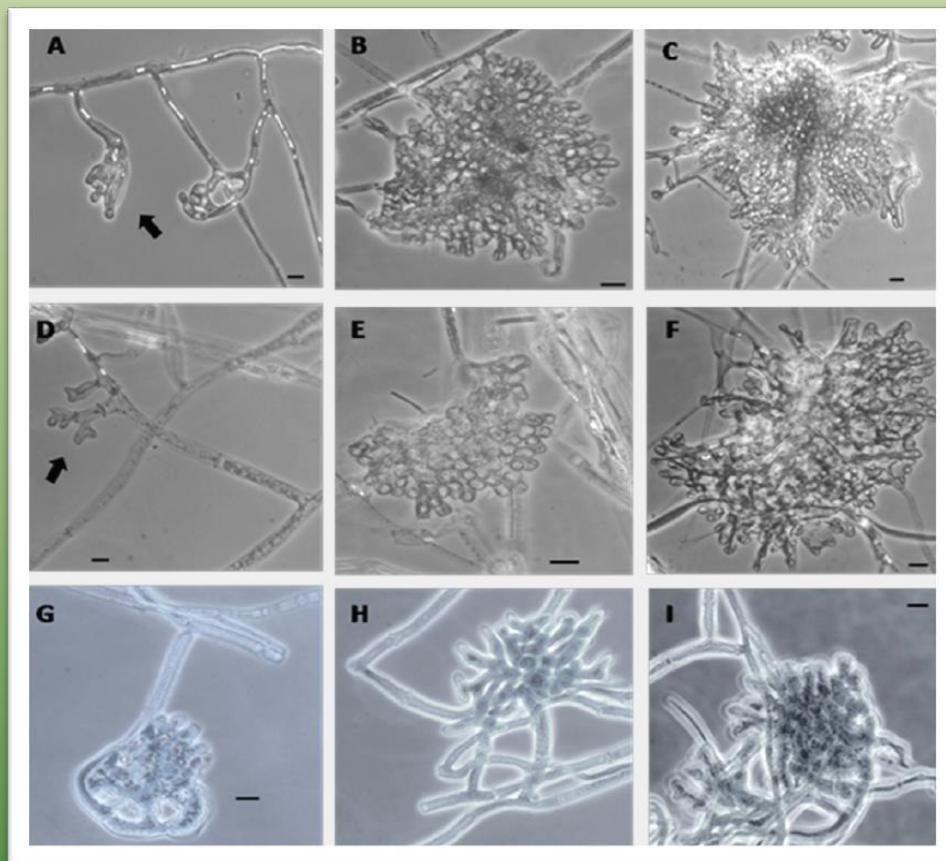


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 36, NÚMERO 3, Septiembre 2018



Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados.

Editor Técnico * Technical Editor

Tec. Noemi De La Rosa Sánchez, RMF.

Composición Web * Web Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, Colegio de Postgraduados.

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA.

Dr. Sami Jorge Micheref, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Br.

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, UASLP-CONACYT.

MC. Hilda Elizabet Flores Moctezuma, IPN.

Dr. Luis Pérez Moreno, UGTO.

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN.

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP.

Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata, CIATEJ.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Dr. Carlos de León García de Alba, COLPOS.

Portada: Desarrollo de la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* después de siete días de crecimiento en presencia de KHCO₃. A-C 8 mM, y D-F 10 mM. Se observó la desorganización celular del primordio G-I.

Original: Alejandro Alarcón/Pág. 363-378.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Early morphological development of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in the presence of potassium bicarbonate** * Desarrollo morfológico temprano de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de bicarbonato de potasio. 363
Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Hernández-Cuevas LV, Larsen J.
- Effect of alcoholic extracts of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) on the development of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet** * Efecto de extractos alcohólicos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. 379
Adirano-Anaya ML, Mejía-Ortiz J, Ovando-Medina I, Albores-Flores V, Salvador-Figueroa M.
- Induction of defense response in tomato plants against Forl by garlic extract** * Inducción de respuesta de defensa en plantas de tomate contra Forl por extracto de ajo. 394
Aguilar-Gastélum I, Martínez-Téllez MA, Corrales-Maldonado C, Rivera-Domínguez M, Vargas-Arispuro I, Arellano-Gil M.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central Mexico** * Microorganismos asociados con la pudrición de corona de alfalfa en el norte centro de México. 414
Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Talavera-Correa H.
- Antifungal property of honey on *in vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides*** * Propiedad antifúngica de mieles sobre el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. 423
Albores-Flores V, Marín-Saenz IJ, López-García JA, Sánchez-Gutiérrez A, Grajales-Conesa J.
- Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico** * Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México. 432
Mata-Santoyo CI, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M, Tovar-Pedraza JM, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, García-León E.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality * Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. 444

Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Pérez-Corral DA, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA, Fernández-Pavía SP.

Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens * Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos. 457

Correa-Pacheco ZC, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Marquina-Valle MA.

REPORTES FITOPATOLÓGICOS * PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS

Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa * Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. 468

Félix-Gastélum R, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madrigal KY, Herrera-Rodríguez G, Espinoza-Matías S.

Early morphological development of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in the presence of potassium bicarbonate

Desarrollo morfológico temprano de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de bicarbonato de potasio

Claudia Ordóñez-Valencia, Ronald Ferrera-Cerrato, Alejandro Alarcón*, Área de Microbiología, Posgrado de Edafología. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco Km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230 México; **Laura V. Hernández-Cuevas**, Centro de Investigación en Genética y Ambiente. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Autopista Texmelucan-Tlaxcala Km 10.5. Ixtacuixtla CP. 90120, Tlaxcala, México; **John Larsen**, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro No.8701, Colonia Ex Hacienda de San José de la Huerta, Morelia, Michoacán, CP. 58190 México. *Autor para correspondencia: aalarconcp@gmail.com.

Recibido: 28 de Marzo, 2018.

Aceptado: 27 de Junio, 2018.

Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Hernández-Cuevas LV, Larsen J. 2018. Early morphological development of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in the presence of potassium bicarbonate. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 363-378.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-4

Primera publicación DOI: 06 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 06, 2018.

Resumen. *Sclerotinia sclerotiorum* es un patógeno de suma importancia económica que causa grandes pérdidas en varios cultivos. Controlar este patógeno es difícil porque forma estructuras de resistencia llamadas esclerocios que pueden mantenerse viables en el suelo por muchos años. Este estudio evaluó el desarrollo morfológico de los primordios de esclerocios de *S. sclerotiorum* utilizando la técnica de Riddell, y diferentes concentraciones de

Abstract. *Sclerotinia sclerotiorum* is a pathogen of great economic importance that causes significant losses in various crops. Control of the pathogen is difficult since this fungus forms resistant sclerotia that can survive in the soil for many years. This study evaluated the morphological development of *S. sclerotiorum* sclerotium primordia by using the Riddell technique, and different concentrations of potassium bicarbonate (KHCO₃). The formation of primordia began from hyphae. However, as the concentration of KHCO₃ increased, morphological changes were observed in the initiation phase of the sclerotia, as well as in the inhibition of their development when using a 50 mM concentration of KHCO₃. This chemical compound modifies the morphology and inhibits the development of sclerotia in their initial stages; hence it may offer potential as an alternative to synthetic fungicides for the control of plant diseases caused by *S. sclerotiorum*.

bicarbonato de potasio (KHCO_3). La formación de los primordios de los esclerocios inició a partir de hifas; sin embargo, conforme las concentraciones de KHCO_3 incrementaron, se observaron cambios morfológicos en la fase de iniciación de los esclerocios, así como en la inhibición de su desarrollo al utilizar una concentración de 50 mM de KHCO_3 . Este compuesto químico modifica la morfología e inhibe el desarrollo de esclerocios en su fase inicial y, por tanto, podría utilizarse como alternativa a los fungicidas sintéticos para controlar enfermedades de plantas causadas por *S. sclerotiorum*.

Palabras clave: agente antifúngico, morfogénesis, inhibición, microscopia.

El moho blanco es causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo que pertenece a la familia Sclerotiniaceae. Es un patógeno fúngico que destruye numerosos cultivos agrícolas, como el girasol, la soya, la colza, el frijol, el garbanzo, la canola y la cebolla (Hegedus y Rimmer, 2005; Bolton *et al.*, 2006). No tiene plantas hospederas específicas y, por tanto, infecta más de 400 especies vegetales, principalmente las dicotiledóneas (Fernando *et al.*, 2004; Hegedus y Rimmer, 2005). Las condiciones ambientales que favorecen la infección fúngica son la humedad excesiva y temperaturas de entre 15 y 25 °C (Saharan y Mehta, 2008). La secreción de enzimas fúngicas, como las celulasas y las pectinasas que suavizan y degradan los tejidos vegetales, interviene en el proceso de infección de la planta (Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006), así como en la producción de ácido oxálico, que tiene efectos tóxicos en el tejido del huésped (Hegedus y Rimmer, 2005). Una característica de este patógeno es la formación de esclerocios, estructuras fúngicas de resistencia y propagación, que en condiciones favorables se mantienen viables durante varios

Key words: antifungal agent, morphogenesis, inhibition, microscopy.

White mold is caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, a fungus that belongs to the family Sclerotiniaceae. This is a destructive fungal pathogen for many agricultural crops such as sunflower, soybean, oilseed rape, bean, chickpea, canola, and onion (Hegedus and Rimmer, 2005; Bolton *et al.*; 2006). It has little host specificity, thus being able to infect over 400 plant species, mainly dicotyledons (Fernando *et al.*, 2004; Hegedus and Rimmer, 2005). The environmental conditions that promote the fungal infection are high humidity and temperatures between 15 and 25 °C (Saharan and Mehta, 2008). Secretion of fungal enzymes such as cellulases and pectinases, that soften and degrade plant tissues are involved in the plant infection process (Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006), as well as production of oxalic acid, which has toxic effects on the tissue of the host (Hegedus and Rimmer, 2005). One characteristic of this pathogen is the formation of sclerotia, fungal structures of resistance and dispersal, which under favorable conditions can remain viable for several years in soils (Bae and Knudsen, 2007; Calvo and Cary 2015; Smith *et al.*, 2015).

During the formation of sclerotia, three stages or phases have been identified: 1) initiation: aggregation of hyphae, 2) development: hyphal growth for greater size, and 3) maturation: creation of surface boundaries, internal consolidation and melanization (Le Tourneau, 1979; Rollins and Dickman, 2001; Bolton *et al.*, 2006; Saharan and Mehta, 2008). The initiation and maturation stages may be influenced by abiotic factors such as photoperiod, temperature, oxygen, and nutrient availability (e.g. carbon sources), and the morphogenesis and further development of

años en el suelo (Bae y Knudsen, 2007; Calvo y Cary 2015; Smith *et al.*, 2015).

Se han identificado tres etapas o fases en la formación de esclerocios: 1) inicio: formación de hifas, 2) desarrollo: crecimiento de hifas más grandes, y 3) madurez: creación de límites en la superficie, consolidación interna y melanización (Le Tourneau, 1979; Rollins y Dickman, 2001; Bolton *et al.*, 2006; Saharan y Mehta, 2008). En las etapas de inicio y madurez pueden influir factores abióticos como el fotoperiodo, la temperatura, el oxígeno y la disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, fuentes de carbono); la morfogénesis y el desarrollo de esclerocios comienzan entre las 12 y las 24 h del crecimiento fúngico (Hansberg y Aguirre, 1990).

El esclerocio está compuesto por tres capas: una capa externa gruesa y pigmentada, una capa intermedia fina, y una capa interna de color blanco conocida como la médula interna (Punja y Damiani, 1996; Bardin y Huang, 2001). Dependiendo de las condiciones ambientales, los esclerocios crecen debajo de la tierra, de una o dos maneras: 1) forman micelio que puede infectar las raíces y causar pudrición y marchitez de los tejidos de la planta, o 2) producen apotecios, en los cuales se producen y liberan las ascosporas, y, posteriormente, infectan los órganos aéreos de la planta (Humpherson-Jones y Cooke, 1977; Mónaco *et al.*, 1998; Bolton *et al.*, 2006).

Los bicarbonatos tienen propiedades antimicrobianas de amplio espectro, y además se ha comprobado que son eficaces para controlar muchos hongos fitopatogénicos (Bombelli y Wright, 2006; Arslan, 2015). La Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos reconoce también que los bicarbonatos son compuestos inocuos y seguros tanto para la salud humana como para el ambiente (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006), ya que su uso disminuye la utilización de plaguicidas. Algunos estudios han mostrado que

sclerotia started between 12 and 24 h of fungal growth (Hansberg and Aguirre, 1990).

The sclerotium is composed by three layers: a thick and pigmented outer layer, an intermediate and thin layer, and an internal white layer called the inner medulla (Punja and Damiani, 1996; Bardin and Huang, 2001). Depending on environmental conditions, sclerotia grow belowground in one of two ways: 1) by forming mycelium that potentially infects roots and causes rot and wilting of plant tissues, or 2) by producing apothecia, in which ascospores are produced and released, then infecting aerial plant organs (Humpherson-Jones and Cooke, 1977; Mónaco *et al.*, 1998; Bolton *et al.*, 2006).

Bicarbonates possess antimicrobial properties of wide spectrum, and their efficiency has been proven for controlling many plant pathogenic fungi (Bombelli and Wright, 2006; Arslan, 2015). The Environmental Protection Agency (EPA) of the United States also recognizes bicarbonates as innocuous and safe compounds for both human health and environment (Palmer *et al.*, 1997; Bombelli and Wright, 2006), since their use may decrease the utilization of pesticides. Some studies have shown that sodium, potassium and ammonium carbonates and bicarbonates inhibit the post-harvest growth of several fungal pathogens in fruits, vegetables and ornamental plants (Karabulut *et al.*, 2003; Arslan *et al.*, 2006; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2016). Bicarbonates alter the permeability of fungal membranes, inhibit the reactions of oxidative phosphorylation, and exert toxic effects on the structures of the pathogen (Avis, 2007). However, their efficacy depends on the concentration (0.2-3%) and on the susceptibility of each microorganism. For instance, treatments with sodium carbonate and bicarbonate improved the control of the green mold caused by *Penicillium digitatum* Sacc. (Trichocomaceae), in citrus fruits

los carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio y amonio inhiben el crecimiento de varios patógenos fúngicos en frutas, verduras y plantas ornamentales después de la cosecha (Karabulut *et al.*, 2003; Arslan *et al.*, 2006; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2016). Los bicarbonatos alteran la permeabilidad de las membranas fúngicas, inhiben las reacciones de fosforilación oxidativa, y producen efectos tóxicos en las estructuras del patógeno (Avis, 2007). Sin embargo, su eficacia depende de la concentración (0.2-3%) y de la susceptibilidad de cada microorganismo. Por ejemplo, los tratamientos con carbonato y bicarbonato de sodio mejoraron el control del moho verde causado por *Penicillium digitatum* Sacc. (Trichocomaceae) en cítricos (Smilanick *et al.*, 1999). Los bicarbonatos de sodio y potasio redujeron también el oídio o mildiú polvoriento causado por *Leveillula taurica* (Lév.) Arnaud (Erysiphaceae) en chile (Fallik *et al.*, 1997), y la conidiogénesis causada por *Helminthosporium solani* Durieu y Mont (Pleosporaceae) (Olivier *et al.*, 1998). Además, Bombelli y Wright (2006) y Türkkan *et al.* (2017) observaron que el crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (Sclerotiniaceae) se inhibe cuando se expone a diferentes bicarbonatos con medios de cultivo *in vitro*. Se ha reportado también que la aplicación de bicarbonatos controla enfermedades en cultivos de zanahoria, pepino y melón (Aharoni *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006).

En general, se han descrito los efectos inhibitorios del bicarbonato de potasio (KHCO₃) en el crecimiento de *S. sclerotiorum*, así como en la germinación y formación de esclerocios nuevos (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), pero no se conocen bien los efectos de este compuesto químico durante las primeras etapas del desarrollo morfológico de los esclerocios. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar, mediante observaciones microscópicas, los efectos de diferentes dosis de

(Smilanick *et al.*, 1999). Sodium and potassium bicarbonates also reduced powdery mildew caused by *Leveillula taurica* (Lév.) Arnaud (Erysiphaceae) in peppers (Fallik *et al.*, 1997), and decreased the conidiogenesis by *Helminthosporium solani* Durieu y Mont. (Pleosporaceae) (Olivier *et al.*, 1998). In addition, Bombelli and Wright (2006), and Türkkan *et al.* (2017) observed the growth inhibition of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (Sclerotiniaceae) when exposed to different bicarbonates with *in vitro* cultures. Plant disease control in carrot, cucumber and cantaloupe fruits has been also reported due to the application of bicarbonates (Aharoni *et al.*, 1997; Bombelli and Wright, 2006).

Overall, the inhibitory effects of potassium bicarbonate (KHCO₃) on the growth of *S. sclerotiorum*, as well as on the germination and formation of new sclerotia have been described (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), but the effects of this chemical compound during early stages of sclerotia morphological development are not well understood. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different doses of potassium bicarbonate on the early stages and primordia development of sclerotia by *S. sclerotiorum* via microscopic observations.

MATERIALS AND METHODS

Sclerotinia sclerotiorum was obtained from the microbial collection of the Soil Microbiology Department, Colegio de Postgraduados. The fungus utilized in the present experiment was previously isolated from vegetative material of lettuce plantations at the Bajío region in Guanajuato, Mexico. In order to examine the effects of different concentrations of potassium bicarbonate (KHCO₃) on the microscopic growth of *S. sclerotiorum*, the Riddell's microculture technique was used (Riddell,

bicarbonato de potasio en las primeras etapas y en el desarrollo de los primordios de los esclerocios de *S. sclerotiorum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado de *Sclerotinia sclerotiorum* se obtuvo de la colección microbiana del Departamento de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados. El hongo que se utilizó en el presente experimento fue previamente aislado de material vegetal proveniente de cultivos de lechuga en la región de El Bajío en Guanajuato, México. Para examinar los efectos de diferentes concentraciones de bicarbonato de potasio (KHCO_3) en el crecimiento microscópico de *S. sclerotiorum*, se utilizó la técnica de microcultivo de Riddell (Riddell, 1950). Esta técnica consistió en colocar una varilla de vidrio en forma de V en cajas de Petri que contenían portaobjetos y cubreobjetos de microscopio. A continuación, las cajas de Petri se esterilizaron a 150 °C por 5 h. Al concluir la esterilización, se colocó un disco de 10 mm de diámetro que contenía un medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA® Merck, Darmstat, Alemania) enriquecido con diferentes concentraciones de KHCO_3 (Fermont®, Monterrey, México; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50 mM) en los portaobjetos de microscopio. Posteriormente, utilizando una aguja estéril, se inoculó *S. sclerotiorum* en un lado del disco con PDA y después se le colocó el cubreobjetos. Este procedimiento se repitió dos veces por cada concentración de KHCO_3 ; se incluyó también un control sin bicarbonato.

Para mantener la humedad en las cajas de Petri, se agregaron 10 mL de glicerol al 10%. Todas las cajas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente (~20 °C) durante un fotoperiodo de aproximadamente 12 h. El crecimiento del hongo fue monitoreado todos los días bajo un microscopio

(1950). This consisted in placing a V-shaped glass rod into glass Petri dishes which included microscopic slides and cover slips. Later, the Petri dishes were sterilized at 150 °C for 5 h. After sterilization, a 10 mm diameter-disk of Potato Dextrose Agar medium (PDA® Merck, Darmstat, Germany) enriched with each concentration of KHCO_3 (Fermont®, Monterrey, Mexico; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 25 and 50 mM), were placed on the microscopic slides. Then, *S. sclerotiorum* was inoculated with a sterile needle on one side of the PDA-disk, and later, the cover slip was placed on it. This procedure was repeated twice for each KHCO_3 concentration, and a control without bicarbonate was also included.

In order to maintain the humidity in the Petri dishes, 10 mL of 10% glycerol were added. All Petri dishes were kept at room temperature conditions (~20 °C) and an approximate photoperiod of 12 h. Every day, the fungal growth was monitored under optical microscope (Leica CME, U.S.A.). Once the PDA-disk was fully covered with the fungal mycelium (approximately seven days of incubation), glycerol was replaced with a 10% formaldehyde solution, which was kept for 2 h for permanently fixing the fungal structures.

Later, the microscopic slide was removed from the Petri dish to prepare the fungal slides. The cover slip was carefully separated from the agar and placed on another clean slide on which a drop of the colorant cotton blue in lactophenol was added. The next step was to remove the PDA-disk from the original microscopic slide on which the colorant was also added, and a clean cover slip was immediately placed on it. In this way, four fungal preparations were obtained from each concentration of KHCO_3 , including the control without bicarbonate. Once the excess of colorant was removed, the stained fungal preparations were sealed with colorless nail polish, and evaluated under light microscope. The microscopic

óptico (Leica CME, Estados Unidos). Cuando el disco con PDA se cubrió totalmente con micelio del hongo (aproximadamente a los siete días de incubación), el glicerol se reemplazó con una solución de formaldehído al 10%, la cual se conservó por 2 h para lograr la fijación permanente de las estructuras del hongo.

Posteriormente, el portaobjetos de microscopio se retiró de la caja de Petri para preparar los portaobjetos con el hongo. El cubreobjetos fue separado cuidadosamente del agar y colocado en un portaobjetos limpio, al cual se agregó una gota de colorante azul de algodón en lactofenol. El siguiente paso fue retirar el disco con PDA del portaobjetos de microscopio original, al cual también se le agregó colorante, e inmediatamente se le colocó un cubreobjetos. De esta manera, se obtuvieron cuatro preparaciones fúngicas de cada concentración de KHCO_3 , incluido el control sin bicarbonato. Cuando se eliminó el exceso de colorante, las preparaciones fúngicas a las que se había agregado colorante fueron selladas con barniz de uñas transparente y evaluadas bajo un microscopio óptico. Las evaluaciones microscópicas tuvieron por objeto identificar el crecimiento de los primordios de los esclerocios en cada concentración de KHCO_3 . Para esto se utilizó un microscopio óptico (OLYMPUS BX51, Japón) para tomar microfotografías de las estructuras fúngicas mediante microscopía de contraste de fases. Se realizaron pruebas de bondad de ajuste de chi-cuadrada/o con el fin de comparar el efecto de las diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio en cada una de las cuatro fases de producción de estructuras. En este caso se utilizaron las herramientas de VassarStats: Sitio web de Computación Estadística (Lowry 2001-2018).

evaluations consisted on identifying the growth of the sclerotial primordia in each concentration of KHCO_3 . For this, an optical microscope (OLYMPUS BX51, Japan) was utilized for taking microphotographs of the fungal structures under phase contrast microscopy. Chi-square “goodness of fit” tests were performed in order to compare the effect of different concentrations of sodium bicarbonate on sclerotia formation for each one of the four structure phases. For it was used the VassarStats: Web Site for Statistical Computation (Lowry 2001-2018).

RESULTS AND DISCUSSION

The presented fungal structures are part of the process of sclerotia formation by *S. sclerotiorum*, and were microscopically observed before the initiation stage. The sclerotial formation in the control treatment (Figure 1, A-C) began with the proliferation of primary branching of main hyphae, thus, denoting the formation of the sclerotial primordia. As second structure, the hyphal branching became more profuse, and the presence of septa was observed in apical zones (Figure 1, D-F), while the third structure was characterized by presenting small hyphal clusters (Fig. 1, G-I). Finally, in the fourth structure, a massive cluster of hyphae was observed, in which some pigmented cells were visible (Figure 1, J-L). The initiation stage began with the union of several hyphal clusters, and this stage was macroscopically observed when a hyphal conglomerate starts growing on the surface of the culture medium.

Results showed that the application of KHCO_3 had inhibitory effects on the morphology of the

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estructuras fúngicas que se presentan son parte del proceso de la formación de esclerocios de *S. sclerotiorum*, que fueron observados microscópicamente antes de la fase de inicio. La formación de esclerocios en el tratamiento de control (Figura 1, A-C) comenzó con la proliferación de ramas primarias de las hifas principales, lo cual indicó la formación de los primordios de los esclerocios. En la segunda estructura, la ramificación de las hifas se volvió más profusa y se observó la presencia de septos en las zonas apicales (Figura 1, D-F), en tanto que la tercera estructura se caracterizó por la presencia de grupos pequeños de hifas (Figura 1, G-I). Por último, en la cuarta estructura, se observó un grupo masivo de hifas, en el cual se podían ver algunas células pigmentadas (Figure 1, J-L). La fase de inicio comenzó con la unión de varios grupos de hifas. Esta etapa se puede observar macroscópicamente cuando el conglomerado de hifas comienza a crecer en la superficie del medio de cultivo.

Los resultados mostraron que la aplicación de KHCO_3 tuvo efectos inhibitorios en la morfología de los primordios de los esclerocios (Cuadro 1). Los resultados de la dosis de 50 mM no fueron incluidos en el análisis estadístico debido a la total ausencia de crecimiento micelial. A diferencia del tratamiento sin bicarbonato (control) y con 2 mM de bicarbonato, los tratamientos con todas las demás concentraciones de este compuesto químico mostraron solo tres estructuras de desarrollo, en las cuales notamos que los primordios tenían formas irregulares con la formación de células laxas. A medida que la concentración de KHCO_3 aumentó, los primordios se hicieron más pequeños y menos compactos. Cuando la concentración de bicarbonato aumentó, se inhibió el crecimiento tanto de las hifas como de los esclerocios (Figuras 2 y 3). Sin embargo, a concentraciones de 2 mM, 4 mM

sclerotial primordia (Table 1). In fact results from the 50 mM dose were not included on statistical analysis due the complete absence of mycelial growth. Unlikely the treatment without bicarbonate (control) and 2 mM bicarbonate, treatments with all the others concentrations of this chemical compound showed only three developmental structures, in which we noticed that the primordia were irregularly shaped with the formation of loose cells. As the concentration of KHCO_3 increased, primordia became smaller and less compact. The increase in the concentration of bicarbonate resulted in growth inhibition of both hyphae and sclerotia (Figure 2 and 3). However, at 2 mM, 4 mM and 6 mM concentrations of KHCO_3 only scarce morphological changes were observed.

The most notorious morphological changes were evident after the fungus was exposed to concentrations greater than 8 mM of KHCO_3 . At 10 mM, the presence of primordia was noticed although not very well developed. Despite this, it was possible to observe the third structures of development (Figure 3, F), but it was not similar to the control by showing irregular formations of the sclerotium in which hyphal clusters were more loose (Figure 1, G-I). At 25 mM concentration, the formation of sclerotia primordia was scarce and disorganized (Figure 3, G-I), hence either the second or third structures of the sclerotium initiation could not be completed nor observed (Table 1). Finally, at the 50 mM concentration, no effects were noticed due to the absence of fungal growth in this treatment.

In this study, we observed the formation process of sclerotia during their initiation phase in which the four stages of development were identified (Bolton *et al.*, 2006; Saharan and Mehta, 2008). However, the sclerotial formation showed variations depending on the concentration of KHCO_3 . The inhibitory effect of bicarbonates on

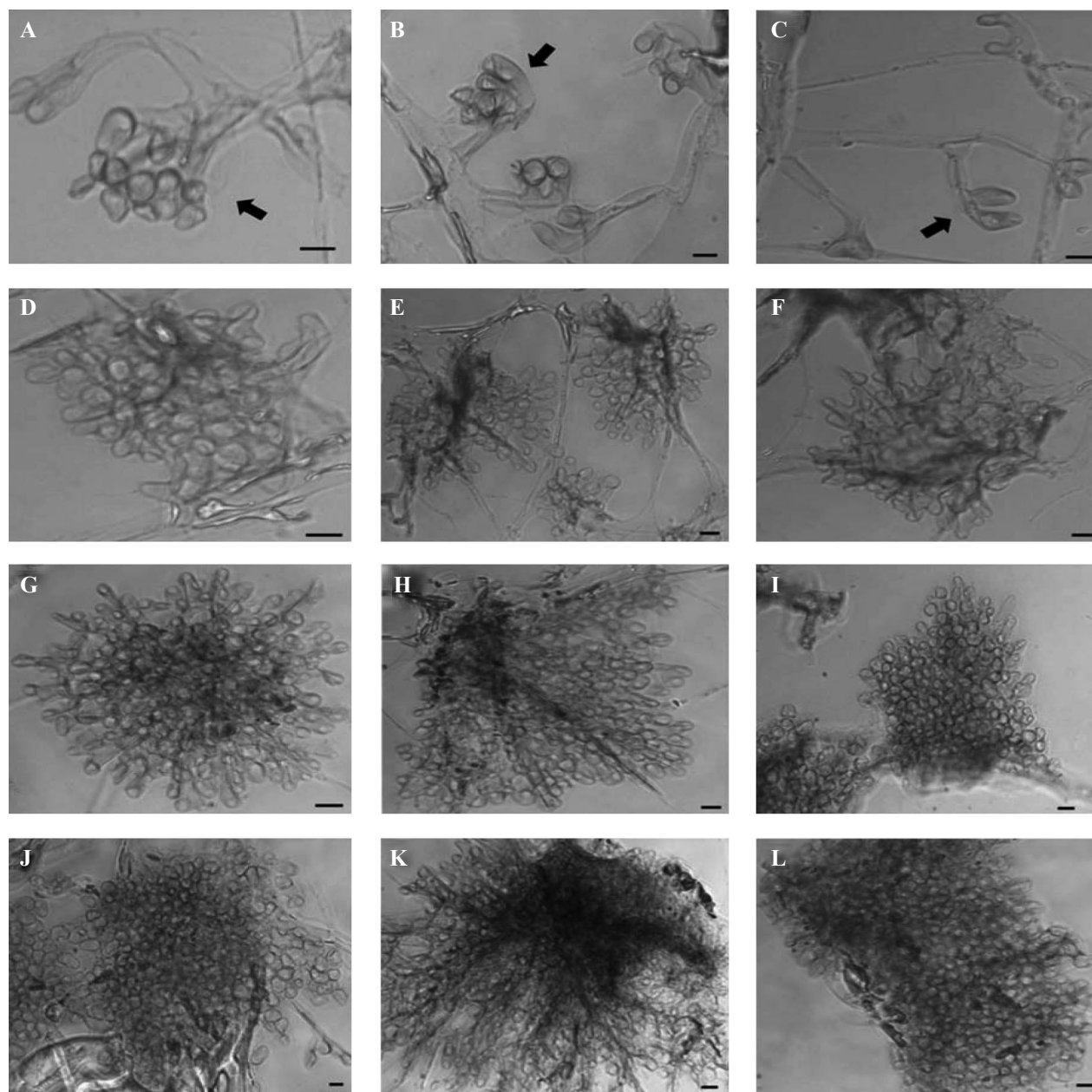


Figura 1. Formación de estructuras microscópicas observadas durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* después de siete días de crecimiento fúngico, sin KHCO_3 (control). Primera estructura: ramificación de hifas, que señalan las flechas (A-C); segunda estructura: ramificación profusa de hifas (D-F); tercera estructura: agrupamiento de hifas (G-I); cuarta estructura: agrupamiento masivo de hifas que forman los esclerocios en el proceso inicial (J-L). Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio de contraste de fases a 40X de ampliación. Barras = 10 μm .

Figure 1. Microscopic developmental structures observed during the sclerotial formation of *Sclerotinia sclerotiorum* after seven days of fungal growth, without KHCO_3 (Control). First structure: branching of hyphae, indicated by arrows (A-C); second structure: profuse branching of hyphae (D-F); third structure: clustering of hyphae (G-I); fourth structure: massive clustering of hyphae that build up the sclerotia in the initiation process (J-L). Microphotographs were taken in phase contrast microscopy at 40X magnification. Bars = 10 μm .

Cuadro 1. Frecuencia de los esclerocios en cada fase de producción de estructuras. El valor de la última columna indica la probabilidad de la ausencia de efectos debido a la exposición a bicarbonato de sodio en cada fase de producción de estructuras (prueba de bondad de ajuste de chi-cuadrada).

Table 1. Frequencies of sclerotia on each structure phase. The value on last column indicates the probability of not effects due to sodium bicarbonate exposition for each structure phase (chi square “goodness fit”).

Fase de la estructura	Tratamientos							Probabilidad
	Control	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM	25 mM	
I	6	5	5	6	5	5	7	0.8606
II	5	5	5	5	5	5	0	0.2914
III	4	5	5	6	5	5	0	<0.0001
IV	4	5	0	0	0	0	0	<0.0001

y 6 mM de KHCO_3 solo se observaron pequeños cambios morfológicos.

Los cambios morfológicos más notorios fueron evidentes después de que el hongo fue expuesto a concentraciones de más de 8 mM de KHCO_3 . Con la concentración de 10 mM, se notó la presencia de primordios, aunque no bien desarrollados. A pesar de esto, pudimos observar la tercera estructura de desarrollo (Figura 3, F), aunque no fue similar a la del control, debido a las formaciones irregulares del esclerocio, en el cual los grupos de hifas fueron más laxos (Figura 1, G-I). A la concentración de 25 mM, la formación de primordios de los esclerocios fue escasa y desorganizada (Figura 3, G-I), y, por esta razón, no pudimos observar ni se terminó de formar la segunda o la tercera estructura de inicio de los esclerocios (Cuadro 1). Por último, con la concentración de 50 mM, no se notó ningún efecto, debido a la ausencia de crecimiento fúngico en este tratamiento.

En este estudio, observamos el proceso de formación de esclerocios durante su primera fase, en la cual se identificaron las cuatro etapas de desarrollo (Bolton *et al.*, 2006; Saharan y Mehta, 2008). Sin embargo, la formación de esclerocios mostró variaciones dependiendo de la concentración de

the growth of several species of phytopathogenic fungi, especially during postharvest, has been recorded before (Aharoni *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1997; Bombelli and Wright, 2006; Jabnoun-Khiareddine *et al.*, 2016), and Ordóñez-Valencia *et al.* (2009) demonstrated that KHCO_3 inhibited the growth of *S. sclerotiorum* in *in vitro* cultures. The inhibitory effect of bicarbonate salts on fungi was probably due to reduced fungal cell turgor pressure, which resulted in collapse and shrinkage of hyphae (Türkkan *et al.*, 2017).

The formation of sclerotial primordia by *S. sclerotiorum* was initiated by branching and clustering of hyphae (Figure 1), resulting in a mass of cells that eventually originate mature sclerotia. Similar effects were observed by Smits and Noguera (1988) in the formation of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*, which began from hyphal branching and entwinements, besides the increase in size of the associate cells and the reduction in size of the sclerotial mass. Townsend and Willets (1954) observed different development patterns (thickening, branching, and septation of main hyphae and their entwinement) in *Rhizoctonia solani*, *Botrytis allii*, *B. cinerea*, and *Sclerotium cepivorum*.

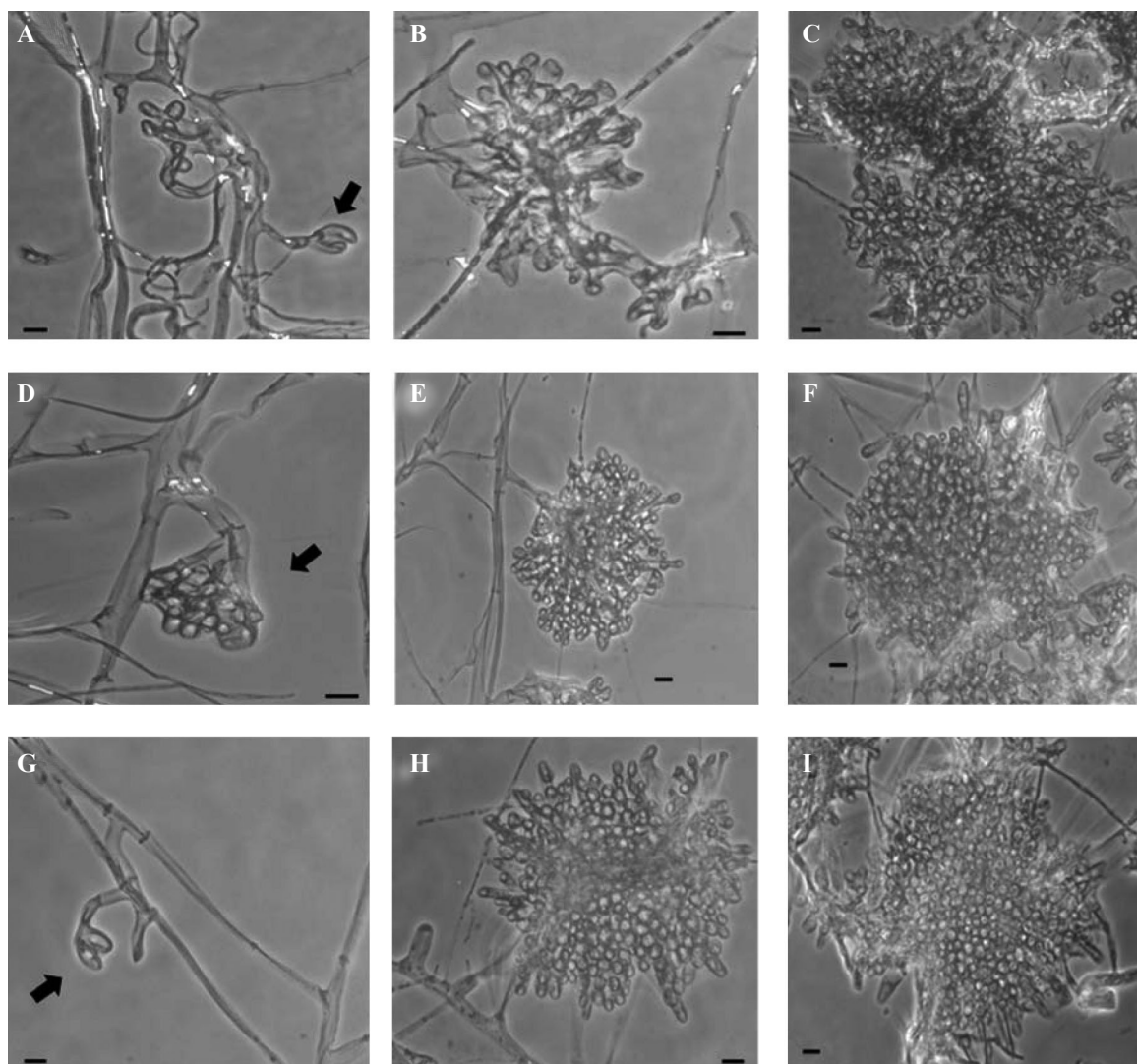


Figura 2. Estructuras microscópicas de desarrollo durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, después de siete días de crecimiento del hongo. La primera (que indican las flechas), la segunda y la tercera estructura del desarrollo de esclerocios en presencia de KHCO_3 : (A-C) 2 mM, (D-F) 4 mM, y (G-I) 6 mM. Se tomaron microfotografías en un microscopio de contraste de fase a 40X de ampliación. Barras = 10 μm .

Figure 2. Microscopic developmental structures observed during the sclerotial formation of *Sclerotinia sclerotiorum*, after seven days of fungal growth. First (indicated by arrows), second, and third structure of sclerotial development in presence of KHCO_3 : (A-C) 2 mM, (D-F) 4 mM, and (G-I) 6 mM. Microphotographs were taken in phase contrast microscopy at 40X magnification. Bars = 10 μm .

KHCO_3 . El efecto inhibitorio de los bicarbonatos en el crecimiento de varias especies de hongos fitopatogénicos, sobre todo durante la postcosecha, ya ha sido documentado (Aharoni *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1997; Bombelli y Wright, 2006; Jabnoun-

In the present study, KHCO_3 resulted in microscopic morphological changes during early phases of sclerotia development. The increase of bicarbonate concentrations resulted in less profuse and loose hyphal branching, leading to the

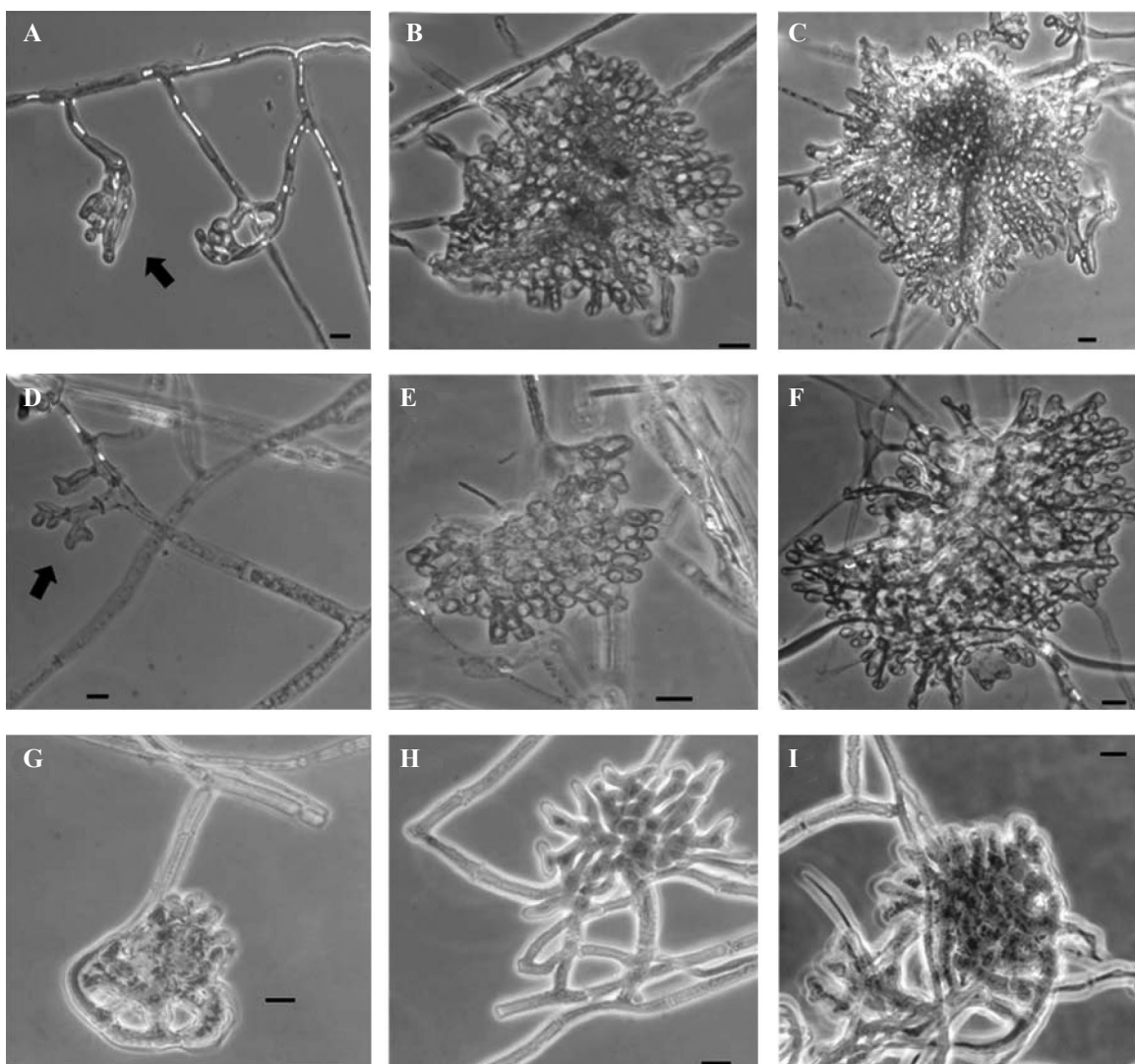


Figura 3. Se observaron estructuras microscópicas de desarrollo durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, después de siete días de crecimiento del hongo. La primera (que indican las flechas), la segunda y la tercera estructura del desarrollo de esclerocios en presencia de KHCO_3 : (A-C) 8 mM, y (D-F) 10 mM. A la dosis de 25 mM se observó desorganización celular del primordio (G-I), en la cual no se observaron ni la segunda ni la tercera estructura de desarrollo de los esclerocios. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio de contraste de fases a 40X de ampliación. Barras = 10 μm .

Figure 3. Microscopic developmental structures observed during the sclerotial formation of *Sclerotinia sclerotiorum*, after seven days of fungal growth. First (indicated by arrows), second and third structures of sclerotial development in presence of KHCO_3 : (A-C) 8 mM, and (D-F) 10 mM. For 25 mM a cellular disorganization of the primordium was observed (G-I), in which the second and third structures of sclerotial development were not observed. Microphotographs were taken in phase contrast microscopy at 40X magnification. Bars = 10 μm .

Khiareddine *et al.*, 2016), y Ordóñez-Valencia *et al.* (2009) demostraron que el KHCO_3 inhibió el crecimiento de *S. sclerotiorum* en medios de cultivo *in vitro*. El efecto inhibitorio de las sales de

decrement and consequent absence of well-formed sclerotia (Table 1). Igwegbe *et al.* (1977) reported that the addition of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of 6-metilpurine caused significant reduction in the sclerotia formation by *S. rolfsii*.

bicarbonato en los hongos probablemente se produjo debido a la reducida presión de turgencia del hongo, que ocasionó el colapso y encogimiento de las hifas (Türkkan *et al.*, 2017).

La formación de los primordios de los esclerocios de *S. sclerotiorum* comenzó con la ramificación y el agrupamiento de hifas (Figura 1), que formaron una masa de células que finalmente produjo esclerocios maduros. Smits y Noguera (1988) observaron efectos similares en la formación de esclerocios de *Macrophomina phaseolina*, la cual comenzó desde la ramificación y entrelazamiento de las hifas, además del aumento de tamaño de las células asociadas y la reducción del tamaño de la masa de esclerocios. Townsend y Willets (1954) observaron diferentes patrones de desarrollo (engrosamiento, ramificación y septación de las principales hifas y sus entrelazamientos) en *Rhizoctonia solani*, *Botrytis allii*, *B. cinerea* y *Sclerotium cepivorum*.

En el presente estudio, el KHCO_3 produjo cambios morfológicos microscópicos durante las fases iniciales del desarrollo de los esclerocios. El aumento de las concentraciones de bicarbonato produjo la ramificación menos profusa y laxa de hifas, lo cual causó la reducción y la consecuente ausencia de esclerocios bien formados (Cuadro 1). Igwegbe *et al.* (1977) reportaron que al agregar $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 6-metilpurina causó una reducción significativa en la formación de esclerocios de *S. rolfsii*.

Al agregar KHCO_3 , aumentó el pH (de 6.5 a 8.0) del medio de cultivo (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), lo cual dio como resultado la reducción del crecimiento fúngico. Al respecto, Alexander (1977) mencionó que muchos hongos se desarrollan mejor en condiciones ácidas que alcalinas, porque un ambiente ácido no es propicio para la existencia de bacterias ni de actinomicetos, y esto ocasiona que los hongos monopolicen el uso de sustratos orgánicos

The addition of KHCO_3 caused an increase in pH (from 6.5 to 8.0) in the culture medium (Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), which resulted in reductions of fungal growth. In this regard, Alexander (1977) mentioned that many fungi grow better under acidic conditions than alkaline, because an acidic environment is not conducive to the existence of either bacteria or actinomycetes, resulting in the monopoly of fungi for utilization of organic substrates (Giri *et al.*, 2005). On the other hand, it has been observed that both growth and development of sclerotia of *S. sclerotiorum* depend on the pH and the production of oxalic acid (Rollins and Dickman, 2001; Chen *et al.*, 2004). Neutral or alkaline pH values inhibit the formation of sclerotia, and the production of oxalic acid helps reducing the alkaline pH of the medium, creating more favorable conditions for the development of sclerotia (Rollins and Dickman, 2001).

Although some reports have described the negative effects of bicarbonate on certain plant pathogenic fungi (Bombelli and Wright, 2006; Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), yet the present study is one of the first reports describing inhibitory effects of KHCO_3 on *S. sclerotiorum* during the initial phases of the sclerotia formation as well as on the morphology of sclerotial primordia.

The inhibitory effects of KHCO_3 on fungal growth and development may in part be explained by affecting vital biochemical processes such as the biogenesis of either the fungal cell wall and/or the apical wall (Sentandreu *et al.*, 1994; Sideri and Georgiou, 2000). Certain antimicrobial compounds cause oxidative stress in fungi which may show morphological changes, impaired growth rate, and low content of proteins and ATP (Harel *et al.*, 2005; Marcet-Houben and Gabaldon, 2011). In this regard, the application of KHCO_3 may account on the production of reactive oxygen species (ROS) as a response of the stress generated by this salt,

(Giri *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha observado que tanto el crecimiento como el desarrollo de esclerocios de *S. sclerotiorum* dependen del pH y de la producción de ácido oxálico (Rollins y Dickman, 2001; Chen *et al.*, 2004). Los valores de pH neutros o alcalinos inhiben la formación de esclerocios, y la producción de ácido oxálico ayuda a reducir el pH alcalino del medio de cultivo, creando condiciones más favorables para el desarrollo de los esclerocios (Rollins y Dickman, 2001).

Aunque en algunos reportes se han descrito los efectos negativos del bicarbonato en ciertos hongos fitopatogénicos (Bombelli y Wright, 2006; Ordóñez-Valencia *et al.*, 2009), el presente estudio es uno de los primeros reportes que describen los efectos inhibitorios que tiene el KHCO_3 en *S. sclerotiorum* durante las fases iniciales de la formación de esclerocios, así como en la morfología de los primordios de los esclerocios.

Los efectos inhibitorios del KHCO_3 en el crecimiento y desarrollo fúngico pueden explicarse en parte por el hecho de que este compuesto afecta procesos bioquímicos vitales, como la biogénesis, ya sea de la pared celular y/o la pared apical del hongo (Sentandreu *et al.*, 1994; Sideri y Georgiou, 2000). Ciertos compuestos antimicrobianos causan estrés oxidativo en los hongos, y éstos pueden mostrar cambios morfológicos, tasa de crecimiento deficiente y bajo contenido de proteínas y ATP (Harel *et al.*, 2005; Marcet-Houben y Gabaldon, 2011). A este respecto, la aplicación de KHCO_3 puede causar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en respuesta al estrés generado por esta sal y, posteriormente, producir alteraciones en la morfología y desarrollo de *S. sclerotiorum*.

Los iones de bicarbonato producen alteraciones en las reacciones de oxidación y nitración en los sistemas biológicos, regulan el pH y estimulan la producción de especies reactivas de nitrógeno, como el peroxinitrito (ONOO^-) o el superóxido (O_2^-) (Knorev *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2005; Lush-

then, causing alterations on the morphology and development of *S. sclerotiorum*.

Bicarbonate ions cause alterations in oxidation and nitration reactions in biological systems, regulate pH, and stimulate the production of either reactive nitrogen species such as peroxynitrite (ONOO^-) or superoxide (O_2^-) (Knorev *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2005; Lushchak *et al.*, 2009). As a result of oxidative stress in combination with abiotic factors also have negative effects on the sclerotia formation in filamentous fungi (Georgiou *et al.*, 2006). Moreover, Sideri and Georgiou (2000) demonstrated that the production of hydrogen peroxide (H_2O_2) in *S. rolfsii* (Typhulaceae) exposed to different light and iron conditions; the highest production of H_2O_2 was recorded during early stages of fungal growth. However, as sclerotia become mature the hydrogen peroxide production decreased. Nevertheless, further research is needed to elucidate the effects of KHCO_3 on either physiological, biochemical or molecular processes during fungal morphogenesis.

CONCLUSIONS

The present results clearly demonstrate that KHCO_3 is effective in controlling both growth and development of *S. sclerotiorum* under *in vitro* conditions, which would help reducing the formation of sclerotia, as well as being a valid alternative for replacing or reducing the use of synthetic fungicides. However, this is a preliminary study; thus, the efficiency of KHCO_3 must also be studied in a soil including plant-pathogen interactions. Moreover, *S. sclerotiorum* can spend 90% of its life cycle as sclerotia, thus it is important to direct more research efforts to know in detail the processes involved in either early initiation or further development of this persistent fungal structures.

chak *et al.*, 2009). La combinación del estrés oxidativo con factores abióticos también tiene efectos negativos en la formación de esclerocios en hongos filamentosos (Georgiou *et al.*, 2006). Por otra parte, Sideri y Georgiou (2000) demostraron que la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en *S. rolfsii* (Typhulaceae) está expuesta a diferentes condiciones de luz y hierro, y que la mayor producción de H_2O_2 se registra durante las primeras etapas del crecimiento fúngico. Sin embargo, a medida que los esclerocios maduran, la producción de peróxido de hidrógeno disminuye. No obstante, es necesario realizar más investigación para esclarecer los efectos que tiene el $KHCO_3$ en los procesos fisiológicos, bioquímicos o moleculares durante la morfogénesis fúngica.

CONCLUSIONES

Los presentes resultados claramente demuestran que el $KHCO_3$ es eficaz para controlar tanto el crecimiento como el desarrollo de *S. sclerotiorum* en condiciones *in vitro*, lo cual ayudaría a reducir la formación de esclerocios, y también sería una opción viable para reducir el uso de plaguicidas sintéticos. Sin embargo, este es un estudio preliminar, y, por tanto, debe estudiarse también la eficacia del $KHCO_3$ en el suelo e incluir las interacciones planta-patógeno. Además, *S. sclerotiorum* pasa el 90% de su ciclo vital en forma de esclerocios y, por tanto, es importante realizar más investigación a fin de conocer en detalle los procesos que intervienen en las primeras etapas de estas persistentes estructuras de hongos o en su desarrollo posterior.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por el apoyo económico otorgado a Claudia Ordóñez-Valencia para la realización de

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico) for financial support to Claudia Ordóñez-Valencia (MSc. studies), and to the grant SEP-CONACyT 58594. Authors also thanks the comments and suggestions of two anonymous reviewers.

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

sus estudios de maestría, y al proyecto SEP-CONACyT 58594. Los autores agradecen también los comentarios y sugerencias de dos revisores anónimos.

## LITERATURA CITADA

- Aharoni Y, Fallik E, Copel A, Gil M, Grinberg S, and Klein JD. 1997. Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. *Postharvest Biology and Technology* 10:201-206. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)01412-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)01412-9)
- Alexander M. 1977. *Introduction to soil microbiology*, 2nd edition. New York, John Wiley and Sons.
- Arai H, Berlett BS, Chock PB, and Stadtman ER. 2005. Effect of bicarbonate on iron-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:10472-10477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504685102>
- Arslan U. 2015. Evaluation of antifungal activity of mono and dipotassium phosphates against phytopathogenic fungi. *Fresenius Environmental Bulletin* 24:810-816. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/281927544\\_Evaluation\\_of\\_antifungal\\_activity\\_of\\_mono\\_and\\_dipotassium\\_phosphates\\_against\\_phytopathogenic\\_fungi](https://www.researchgate.net/publication/281927544_Evaluation_of_antifungal_activity_of_mono_and_dipotassium_phosphates_against_phytopathogenic_fungi)
- ArslanU, Ilhan K and Karabulut OA. 2006. Evaluation of food additives and low-toxicity compounds for the control of bean rust and wheat leaf rust. *Journal of Phytopathology* 154:534-541. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01144.x>
- Avis TJ. 2007. Antifungal compounds that target fungal membranes: applications in plant disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29:323-329. <https://doi.org/10.1080/07060660709507478>
- Bae YS and Knudsen GR. 2007. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35:21-24. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.05.014>



- Bardin SD and Huang HC. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 23:88-98. <https://doi.org/10.1080/07060660109506914>
- Bolton MD, Thomma BPHJ and Nelson BD. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology 7:1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>
- Bombelli EC y Wright ER. 2006. Efecto del bicarbonato de potasio sobre la calidad del tomate y acción sobre *Botrytis cinerea* en postcosecha. Ciencia e Investigación Agraria 33:197-203. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/28138683\\_Efecto\\_del\\_bicarbonato\\_de\\_potasio\\_sobre\\_la\\_calidad\\_del\\_tomate\\_y\\_accion\\_sobre\\_Botrytis\\_cinerea\\_en\\_poscosecha](https://www.researchgate.net/publication/28138683_Efecto_del_bicarbonato_de_potasio_sobre_la_calidad_del_tomate_y_accion_sobre_Botrytis_cinerea_en_poscosecha)
- Calvo AM and Cary JW. 2015. Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. Frontiers in Microbiology 6:1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>
- Chen C, Harel A, Gorovoits R, Yarden O and Dickman MB. 2004. MAPK Regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* in linked with pH and cAMP sensing. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:404-413. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.404>
- Fallik E, Ziv O, Grinberg S, Alkalai S and Klein JD. 1997. Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting. Phytoparasitica 25:41-43. <https://doi.org/10.1007/BF02981478>
- Fernando WGD, Nakkeeran S and Zhang Y. 2004. Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Pp: 329-347. In: Pandalai SG (ed). Recent Research Developments in Environmental Biology. Research Signpost. India. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/238111476\\_Ecofriendly\\_methods\\_in\\_combating\\_Sclerotinia\\_sclerotiorum\\_Lib\\_de\\_Bary](https://www.researchgate.net/publication/238111476_Ecofriendly_methods_in_combating_Sclerotinia_sclerotiorum_Lib_de_Bary)
- Georgiou DC, Patsoukis N, Papapostolou I and Zervoudakis G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. Integrative and Comparative Biology 46:691-712. <https://doi.org/10.1093/icb/icj034>
- Giri B, Giang PH, Kumari R, Prasad R and Varma A. 2005. Microbial diversity in soils. Pp: 19-55. In: Buscot F and Varma A. (eds.). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 422p. DOI: 10.1007/b137872
- Hansberg W and Aguirre J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. Journal of Theoretical Biology 142:201-221. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80222-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80222-X)
- Harel A, Gorovits R and Yarden O. 2005. Changes in protein kinase A activity accompany sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 95:397-404. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0397>
- Hegedus DD and Rimmer SR. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When "to be or not to be" a pathogen?. FEMS Microbiology Letters 251:177-184. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.040>
- Humpherson-Jones FM and Cooke RC. 1977. Morphogenesis in sclerotium-forming fungi. II. Rhythmic production of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. New Phytology 78:181-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1977.tb01556.x>
- Igwegbe ECK, King V and Salary J. 1977. 6-methylpurine-induced inhibition of sclerotia morphogenesis in *Sclerotium rolfsii* and its reversal by adenosine. Mycopathologia 62:153-159. <https://doi.org/10.1007/BF00444108>
- Jabnoun-Khiareddine H, Abdallah R, El-Mohamedy R, Abdel-Kareem F, Gueddes-Chahed M, Hajlaoui A and Daami-Remadi M. 2016. Comparative efficacy of potassium salts against soil-borne and air-borne fungi and their ability to suppress tomato wilt and fruit rots. Journal of Microbial and Biochemical Technology 8:45-55. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000261>
- Karabulut OA, Smilanick JL, Mlikota F, Mansour M and Droby S. 2003. Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. Plant Disease 87:1384-1389. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1384>
- Knorev EA, Zhang H, Joseph J, Kennedy MC and Kalyanaraman B. 2000. Bicarbonate exacerbates oxidative injury induced by antitumor antibiotic doxorubicin in cardiomyocytes. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 279:2424-2430. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2424>
- Le Tourneau D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Phytopathology 69:887-890. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-69-887>
- Lowry R. 2001-2018. VassarStats. A Web Site for Statistical Computation. <http://vassarstats.net/csfit.html>
- Lushchak OV, Bayliak MM, Korobova OV, Levine RL and Lushchak VI. 2009. Buffer modulation of menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Redox Report 14:214-220. <https://doi.org/10.1179/135100009X12525712409454>
- Marcet-Houben M and Gabaldón T. 2011. Evolution of fungi and their respiratory metabolism. Pp: 257-272. In: Pontarotti P (ed). Evolutionary Biology-Concepts, Biodiversity, Macroevolution and Genome Evolution. Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin. 345p. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20763-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20763-1_15)
- Mónaco CI, Rollán MC y Nico AI. 1998. Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. Revista Iberoamericana de Micología 15:81-84. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/237685229\\_Efecto\\_de\\_micoparásitos\\_sobre\\_la\\_capacidad\\_reproductiva\\_de\\_Sclerotinia\\_sclerotiorum](https://www.researchgate.net/publication/237685229_Efecto_de_micoparásitos_sobre_la_capacidad_reproductiva_de_Sclerotinia_sclerotiorum)
- Olivier C, Halseth ED and Mizubuti ESGm, Loria R. 1998. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. Plant Disease 82:213-217. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.213>
- Ordóñez-Valencia C, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R and Hernández-Cuevas LV. 2009. *In vitro* antifungal effects of potassium bicarbonate on *Trichoderma* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycoscience 50:380-387. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0495-Z>
- Palmer CL, Horst RK and Langhans RW. 1997. Use of bicarbonates to inhibit in vitro colony growth of *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81:1432-1438. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1432>
- Punja ZK and Damiani A. 1996. Comparative growth, morphology and physiology of three *Sclerotium* species. Mycologia 88:694-706. <http://dx.doi.org/10.2307/3760963>

- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42:265-270. <http://dx.doi.org/10.2307/3755439>
- Rollins JA and Dickman MB. 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Applied and Environmental Microbiology* 67:75-81. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.1.75-81.2001>
- Saharan GS and Mehta N. 2008. Reproduction and reproductive structures. Pp: 113-161. *In*: Saharan GS and Mehta N (eds). *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Springer. India. 418p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9_8)
- Sentandreu R, Mormeneo S and Ruiz-Herrera J. 1994. Biogenesis of the fungal cell wall. Pp: 111-124. *In*: Wessels JGH, Meinhardt F (eds). *The Mycota I Growth, differentiation and sexuality*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 521p. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-11908-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-11908-2_6)
- Sideri M and Georgiou DC. 2000. Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii* are induced by the oxidizing growth factors, light and iron. *Mycologia* 92:1033-1042. <http://dx.doi.org/10.2307/3761468>
- Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota F, Usall J and Michael IF. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83:139-145. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.2.139>
- Smith ME, Henkel TW and Rollins JA. 2015. How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology* 13:211-220. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.010>
- Smits GB and Noguera R. 1988. Ontogeny and morphogenesis of sclerotia and pycnidia of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomia Tropical Maracay* 38:69-78.
- Türkkan M, Özcan M and Erper I. 2017. Antifungal effect of carbonate and bicarbonate salts against *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mould of kiwifruit. *Akademik Ziraat Dergisi* 6:107-114. <http://dx.doi.org/10.29278/azd.371066>
- Townsend BB and Willetts HJ. 1954. The development of sclerotia of certain fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 37:213-221. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(54\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(54)80003-9)



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

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

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

Recibido: 16 de Mayo, 2018.

Aceptado: 17 de Julio, 2018.

Adirano-Anaya ML, Mejía-Ortiz J, Ovando-Medina I, Albores-Flores V, Salvador-Figueroa M. 2018. Effect of alcoholic extracts of garlic (*Allium sativum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) on the development of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 379-393.

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

Primera publicación DOI: 20 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 20, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### *Mycosphaerella fijiensis* isolates

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

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Treatment design.

A two-factor (garlic and clove extracts) 4<sup>2</sup> factorial design was used at four levels (extract concentration), which resulted in 16 treatments (Table 1).

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

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



## Diseño de tratamientos

Se estableció un diseño factorial 4<sup>2</sup>, de dos factores (extracto de ajo y extracto de clavo) a cuatro niveles (concentración del extracto), lo que resultó en 16 tratamientos (Cuadro 1).

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

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

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

$A_{ETI}$  = Área de crecimiento efectivo del tratamiento control (mm<sup>2</sup>) =  $A_{T1n} - A_{T10}$

$A_{ETN}$  = Área de crecimiento efectivo del tratamiento

N (mm<sup>2</sup>) =  $A_{TNn} - A_{TN0}$

$A_{T1n}$  = área de crecimiento del tratamiento control a cualquier tiempo (mm<sup>2</sup>)

$A_{T10}$  = área de crecimiento del tratamiento control a t = 0 (mm<sup>2</sup>)

$A_{TN0}$  = área de crecimiento de cualquier tratamiento a cualquier tiempo (mm<sup>2</sup>)

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

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

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

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

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

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

(mm<sup>2</sup>) =  $A_{T1n} - A_{T10}$

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

(mm<sup>2</sup>) =  $A_{TNn} - A_{TN0}$

$A_{T1n}$  = Growth area of the control treatment at any time (mm<sup>2</sup>)

$A_{T10}$  = Growth area of the control treatment at t = 0 (mm<sup>2</sup>)

$A_{TN0}$  = Growth area of any treatment at any time (mm<sup>2</sup>)

$A_{TN0}$  = Growth area of any treatment at t = 0 (mm<sup>2</sup>).



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

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

### Análisis estadístico

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

## RESULTADOS

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

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

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

### Statistical analysis.

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

## RESULTS

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

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

**Cuadro 2. Área de la colonia de las colonias de *M. fijiensis* crecida por cuatro semanas en medio ADP adicionado de extracto de ajo y/o clavo.**  
**Table 2. Area of *M. fijiensis* colony after four weeks of growth in ADP medium to which garlic and/or clove extract were added.**

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

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

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

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

La transformación de los datos de área de la colonia ( $\text{mm}^2$ ) al Ln para cada semana de cultivo

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

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

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

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

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

## DISCUSIÓN

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

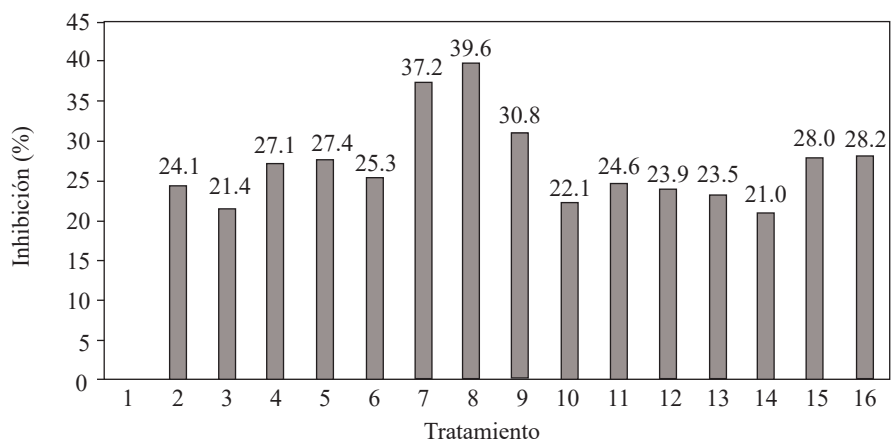


Figura 2. Inhibición del desarrollo de la colonia de *M. fijiensis* (porcentaje de área), después de cuatro semanas de cultivo, en los diferentes tratamientos planteados en el Cuadro 1.

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

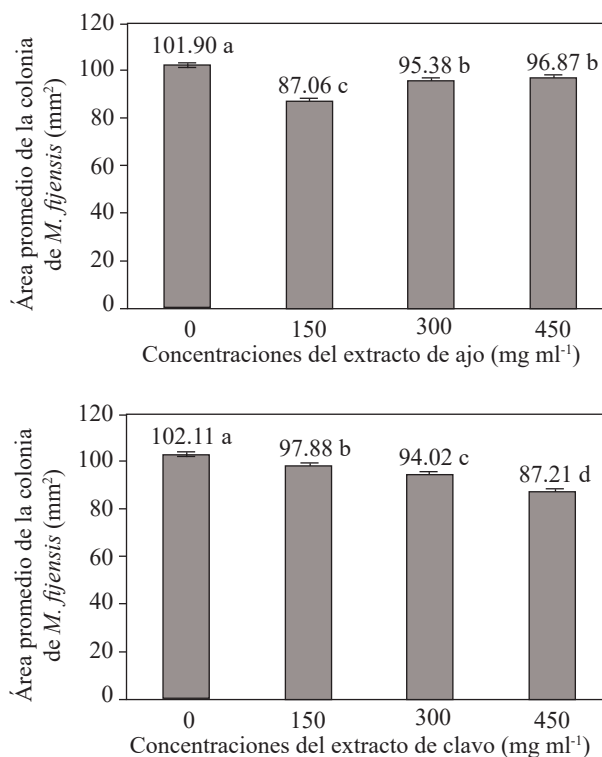
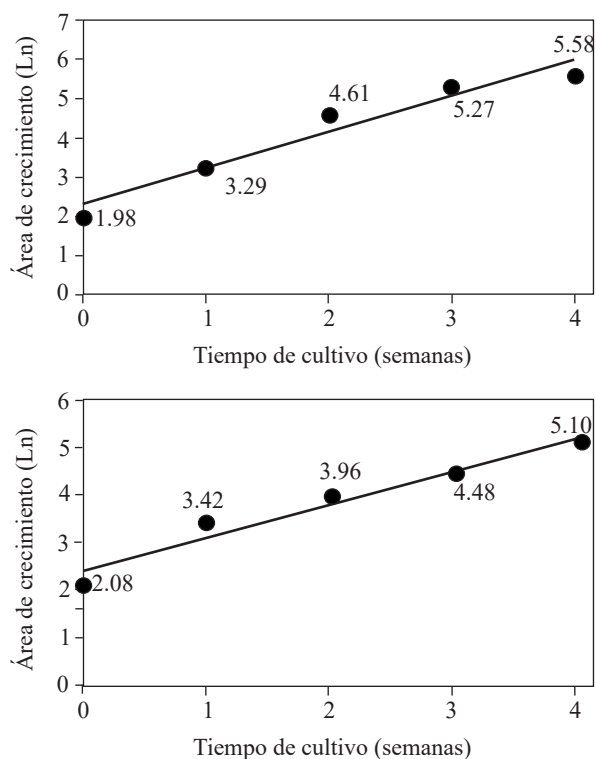


Figura 1. Área promedio de crecimiento de la colonia de *M. fijiensis* en medio de cultivo ADP adicionado con diferentes concentraciones de ajo (arriba) y clavo (abajo).

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



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

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

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

**Cuadro 4.** Valores de la pendiente (m), o velocidad de crecimiento (semana<sup>-1</sup>), ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) derivados de linealizar los datos de Ln del área de la colonia (mm<sup>2</sup>) y la semana de cultivo.

**Table 4.** Slope values (m) or growth rate (week<sup>-1</sup>), intercept (b) and determination coefficient (r<sup>2</sup>) after linearizing Ln data from the colony area (mm<sup>2</sup>) and the cultivation week.

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

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

When data from the area of the colony (mm<sup>2</sup>) were converted to Ln for each week of culture, a similar performance was observed in all treatments. Figure 3 shows the extreme treatments, that is, the treatment with the largest areas (Treatment 1) and the one with the smallest areas (Treatment 8). The values of the regression line for all the treatments are shown in Table 4. As can be seen in the table, the slope of the line (m) or colony growth rate (week<sup>-1</sup>) for all the treatments ranged from 0.7081 week<sup>-1</sup> to 0.9177 week<sup>-1</sup>. Therefore, the colony growth rate of Treatment 10 was 23% slower compared to the growth rate of Treatment 1. As for the intercept, it had an average value of 2.3589 ±0.07675 and,

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

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

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

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

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

## DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

## CONCLUSIONES

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

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

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

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

## LITERATURA CITADA

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

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

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

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

## CONCLUSIONS

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

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

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

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

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

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

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

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

Induction of defense response in tomato plants against Forl by garlic extract

Inducción de respuesta de defensa en plantas de tomate contra Forl por extracto de ajo

Heem Aguilar-Gastélum, Miguel Ángel Martínez-Téllez, Consuelo Corrales-Maldonado, Marisela Rivera-Domínguez, Irasema Vargas-Arispuro*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera A la Victoria Km. 0.6, CP. 83304, Hermosillo, Sonora; Maritza Arellano-Gil, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, Colonia Centro, CP. 85000 Ciudad Obregón Sonora. *Autor para Correspondencia: iris@ciad.mx.

Recibido: 13 de Junio, 2018.

Aceptado: 20 de Julio, 2018.

Aguilar-Gastélum I, Martínez-Téllez MA, Corrales-Maldonado C, Rivera-Domínguez M, Vargas-Arispuro I, Arellano-Gil M. 2018. Induction of defense response in tomato plants against Forl by garlic extract. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 394-413.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1806-2

Primera publicación DOI: 22 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 22, 2018.

Resumen. Se evaluó un extracto de ajo (EA) para inducir la defensa de plantas de tomate contra *Fusarium oxysporum radicles-lycopersici* (Forl), mediante el incremento de la concentración endógena de ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ). La aspersión de 1 y 2 % del EA sobre plantas intencionalmente infectadas con 1×10^7 esporas mL^{-1} de Forl, redujeron en 73.53% la severidad de la enfermedad producida por Forl respecto al control infectado. La altura fue similar ($p \leq 0.05$) en plantas tratadas con EA y no-tratadas. La acumulación de AS en plantas

Abstract. A garlic extract (EA) was evaluated to induce the defense of tomato plants against *Fusarium oxysporum radicles-lycopersici* (Forl), by increasing the endogenous concentration of salicylic acid (AS) and jasmonic acid (AJ). Spraying 1 and 2% of EA on plants intentionally infected with 1×10^7 spores mL^{-1} of Forl reduced in 73.53% the severity of the disease produced by Forl with respect to the infected control. The height was similar ($p \leq 0.05$) in plants treated with EA and untreated. The accumulation of AS in plants sprayed with 1 and 2% of EA presented two significant increases ($p \leq 0.05$), in the second and fifth weeks after spraying, with higher concentrations than the infected and non-infected controls in 11 and 6 times for the first and 2.7 times and 3.8 times for the second, respectively. The AJ was induced from the first week after the treatments, increasing 2.5 and 1.8 times more than the infected and non-infected controls, maintaining those values throughout the evaluation. The results show that the EA reduced the development of the disease caused by Forl

asperjadas con 1 y 2% de EA, presentaron dos incrementos significativos ($p \leq 0.05$), en la segunda y quinta semana después de las aspersiones, con concentraciones mayores que los controles infectado y no-infectado en 11 y 6 veces para el primero y en 2.7 y 3.8 veces para el segundo, respectivamente. El AJ se indujo desde la primera semana después de los tratamientos, incrementando 2.5 y 1.8 veces más que los controles infectado y no-infectado, manteniendo esos valores durante toda la evaluación. Los resultados muestran que el EA redujo el desarrollo de la enfermedad provocada por For1 a plantas de tomate mediado por un incremento en la concentración endógena de AS y AJ.

Palabras clave: SAR, severidad, ácido salicílico, ácido jasmónico.

El ataque de fitopatógenos es uno de los aspectos más preocupante en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), tanto cuando se cultiva a cielo abierto o en sistema protegido bajo malla o invernadero. Entre las enfermedades de mayor importancia, se encuentra la pudrición de la corona (PCT) causada por el hongo saprófito *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), llegando a reducir los rendimientos de cosecha hasta un 50% (Apodaca *et al.*, 2004). El patógeno puede sobrevivir en el suelo por largos períodos de tiempo, infectando las plantas, a través de heridas en la raíz o durante la formación de nuevas raíces (Szczechura *et al.*, 2013). Una buena estrategia de control de la enfermedad, es el uso de variedades resistentes y el uso de injertos (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003). Sin embargo, el control de esta enfermedad depende principalmente del control químico (McGovern, 2015), existiendo reportes que después que el hongo penetra al tejido vegetal, el control químico resulta sin efecto (Apodaca *et al.*, 2002). Un método

to tomato plants mediated by an increase in the endogenous concentration of AS and AJ.

Key words: SAR, severity, salicylic acid, jasmonic acid.

Phytopathogen attack is one of the most disturbing aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) production, either when grown in an open field, a greenhouse or a mesh-protected system. Among the most important tomato diseases is crown rot (TCR) caused by the saprophyte fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), which reduces harvested yields up to 50% (Apodaca *et al.*, 2004). The pathogen can survive in the soil for long periods of time and infects plants through cuts in the roots or when new roots are forming (Szczechura *et al.*, 2013). A good strategy for controlling the disease is to use resistant varieties and grafting (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003). However, this disease is controlled mainly by chemical fungicides (McGovern, 2015), but it has been reported that once the fungus penetrates the plant tissue, chemical control becomes ineffective (Apodaca *et al.*, 2002). A method that could potentially reduce Forl disease severity is to induce plant resistance to the pathogen (Ojha and Chatterjee, 2012). It has been reported that plants that are susceptible to pathogens, and that, after being treated with biotic and abiotic agents that affect the host's physiology, quickly and coordinatedly activate their defense system (El-Kallal, 2007; Arzoo *et al.*, 2012). Plant extracts or their components have been reported to be defense inducers in different crops (Baysal *et al.*, 2002; Zaker and Mosallanejad, 2010; Arzoo *et al.*, 2012). Of particular interest are extracts that can induce salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), which are signal molecules that have an important role in regulating the signaling network involved in

con potencial para reducir la severidad de la enfermedad causada por Forl, es la inducción de resistencia de la planta al patógeno (Ojha y Chatterjee, 2012). Existen reportes de plantas que presentan susceptibilidad a patógenos, las cuales, después de aplicar agentes bióticos y abióticos que afectan la fisiología del hospedero, inducen a una rápida y coordinada activación del sistema de defensa (El-Kallal, 2007; Arzoo *et al.*, 2012). Los extractos de plantas o sus componentes, han sido reportados como inductores de defensa en distintos cultivos (Baysal *et al.*, 2002; Zaker y Mosallanejad, 2010; Arzoo *et al.*, 2012). Particularmente interesante, son los extractos capaces de inducir al ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ), moléculas señal que tienen una función importante en regular la red de señalización implicada en inducir las respuestas de defensa de la planta contra patógenos (Ryan y Moura 2002; Van Loon *et al.*, 2006). La defensa de la planta es más efectiva cuando la resistencia adquirida es sistémica, ya que resulta eficiente contra un amplio espectro de patógenos (Gozzo y Faoro, 2013). La resistencia sistémica adquirida, implica el incremento de señales móviles como el AS y el AJ, compuestos que están involucrados en la expresión de genes que activan los mecanismos de defensas en los tejidos alejados al sitio donde inició el ataque, extendiendo la defensa hacia las partes no infectadas de la planta (Ojha y Chatterjee, 2012). Por lo tanto, inducir la defensa de la planta, la predispone a resistir efectivamente ataques de otros fitopatógenos (Kachroo y Robin, 2013). En este contexto, la inducción de resistencia es una técnica no convencional de control de patógenos, donde el agente inductor de la resistencia, puede no tener efecto directo sobre el patógeno (Arzoo *et al.*, 2012). Para este estudio se aplicó un extracto de ajo a plantas de tomate para inducir la resistencia contra Forl, cuantificando la acumulación de AS y AJ como parámetros bioquímicos y la severidad de

inducing plant defense responses against pathogens (Ryan and Moura 2002; Van Loon *et al.*, 2006). A plant's defense is more effective when the acquired resistance is systemic, because it is effective against a wide range of pathogens (Gozzo and Faoro, 2013). Systemic acquired resistance implies an increase in mobile signals, such as SA and JA, two compounds that are involved in the expression of genes that activate defense mechanisms in plant tissues far away from where the pathogen attack began and that extend the defense to non-infected plant parts as well (Ojha and Chatterjee, 2012). Therefore, induced defense helps plants to effectively resist attacks from other pathogens (Kachroo and Robin, 2013). In this case, resistance induction is a non-conventional pathogen control technique where the resistance-inducing agent may not have a direct effect on the pathogen (Arzoo *et al.*, 2012). In this research, garlic extract was applied to tomato plants in order to induce resistance against Forl by quantifying SA and JA accumulation as biochemical parameters, and disease severity, plant height and chlorophyll content as resistance parameters.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

We used 21-day old seedlings of tomato (*Solanum lycopersicum*) var. Tiny tim cherry, which were propagated from certified seed in a commercial greenhouse. The seedlings were taken to a growth chamber and kept at a temperature of 25 °C, under a 16 h light/8 h darkness (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of luminous intensity) photoperiod and 80% relative humidity. When the seedlings reached 28 days after germination, a 2% rooting stimulator (Magic root) was applied; 45 days after germination, the seedlings were inoculated with

la enfermedad, altura de la planta y el contenido de clorofila como parámetro de resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Tiny tim cherry de 21 día de crecimiento, las cuales fueron propagadas a partir de semillas certificadas en un invernadero comercial. Las plántulas se trasladaron a una cámara de crecimiento a temperatura de 25 °C, fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica) y 80% de humedad relativa. Cuando las plántulas completaron 28 días después de germinación, se aplicó un enraizador (Magic root) al 2%. Al completar 45 días después de germinación, las plántulas fueron inoculadas con Forl e inmediatamente trasplantaron a bolsas de 3 kg, conteniendo sustrato preparado (Nutrigarden). Después de que las plántulas fueron trasplantadas, se procedió a designar y aplicar aleatoriamente los tratamientos a cada grupo de plantas.

Extracto de ajo (EA).

El extracto se preparó a partir de 10 g de dientes de ajo fresco (var. Río sonora), se licuó con 14 mL de agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente. El homogenado se centrifugó por 20 minutos a 15 000 x g a 4 °C, se adicionaron 6 mL de etanol al sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 8000 x g por 20 min a 4 °C (Jansen *et al.*, 1987). El sobrenadante representó el extracto de ajo.

Obtención de esporas de Forl

La cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* fue identificada molecularmente

Forl and immediately transplanted to 3-kg bags containing prepared substrate (Nutrigarden). After the seedlings were transplanted, treatments were assigned and randomly applied to each group of plants.

Garlic extract (EA).

The extract was prepared using 10 g of fresh garlic cloves (var. Río Sonora) that were blended in 14 mL of distilled water for 1 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 15000 x g at 4 °C for 20 min, then 6 mL of ethanol were added to the supernatant and the mixture was centrifuged again at 8000 x g at 4 °C for 20 min (Jansen *et al.*, 1987). The supernatant represented the garlic extract.

Obtaining Forl spores

The *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* strain was molecularly identified using the ITS1-5.8S ADNr-ITS2 sequencing technique and/or D1/D2 domains of the 28S ADNr gene at the Genomic Biotechnology Center of the Instituto Politécnico Nacional (Access number: 90436915:DO452455.1 in the NCBI database). The Forl strain was donated by the Plant Biotechnology Laboratory of ITSON Centro's CIBAA. It was grown in an agar-potato-dextrose (PDA) culture medium and incubated at 28 °C for 7 days. It was re-cultivated by taking a small piece of mycelium and inoculating it in fresh PDA at 28 °C for 7 days, or until the fungus produced enough spores to prepare a solution of 1×10^7 spores/mL. The spore suspension was prepared by adding 5 mL of distilled water containing 0.01% of 0.02% Tween 80 on the surface of the dish containing the fungus; then the surface was scraped using a glass rod, and the liquid containing fungus spores was collected and filtered through gauze to remove the mycelium; the

empleando la técnica de secuenciación de ITS1-5.8S ADNr-ITS2 y/o dominios D1/D2 del 28S ADNr en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (Núm. de acceso:90436915:DO452455.1 en base NCBI). La cepa de Forl fue donada para este estudio por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBAA en ITSON centro. Para su crecimiento se utilizó como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se mantuvo a 28 °C por 7 días en incubadora. Se resembró tomando un pequeño pedazo de micelio e inoculándolo sobre PDA fresco a 28 °C por 7 días o hasta que el hongo alcanzó una esporulación suficiente para preparar una solución de 1×10^7 esporas/mL. La suspensión de esporas se preparó adicionando 5 mL de agua destilada conteniendo 0.01% de Tween 80 al 0.02% sobre la superficie de la placa con el hongo, se raspó con una varilla de vidrio, el líquido conteniendo las esporas del hongo se colectó y filtró sobre gaza para eliminar micelio y el filtrado fue centrifugado a 5000 x g. Las esporas colectadas fueron re-suspendidas en agua estéril hasta lograr una concentración de 1×10^7 esporas/mL cuantificadas con un cámara de Neubauer.

Inoculación de plántulas de tomate con Forl

Las plántulas de tomate de 45 días después de germinadas, se extrajeron del semillero, se lavaron suavemente las raíces para eliminar el sustrato. En las raíces adventicias, se hicieron pequeñas heridas con un bisturí previamente esterilizado, inmediatamente, se sumergieron durante 30 minutos en una solución inoculante (1×10^7 esporas/mL) de Forl. Posteriormente se realizó el trasplante, como se describió en párrafo anterior.

Tratamientos aplicados para la inducción de resistencia en plantas de tomate

Se prepararon grupos de 10 plántulas por tratamiento con tres repeticiones. Se evaluaron seis

filtrate was centrifuged at 5000 x g. The collected spores were re-suspended in sterilized water until reaching a concentration of 1×10^7 spores/mL, quantified with a Neubauer chamber.

Tomato seedlings inoculated with Forl.

Forty-five days after germination, the tomato seedlings were taken from the seedbed and their roots were gently washed to remove the substrate. Using a previously sterilized scalpel, small cuts were made on the adventitious roots, which were immediately submerged in a Forl inoculating solution (1×10^7 spores/mL) for 30 min. The seedlings were then transplanted as described in the previous paragraph.

Treatments to induce resistance in tomato plants

Groups of 10 seedlings per treatment with three replications were formed. Six treatments were evaluated, as shown in Table 1. The first three treatments were used as controls. Seedlings were inoculated with Forl (1×10^7 spores mL^{-1}) before transplanting. In treatments with EA, the extract was sprayed on the leaves 7 and 14 days after inoculation with Forl and transplanting.

Evaluation of disease severity

To evaluate the response of the tomato plants to the pathogen, we used a hedonic scale proposed by Apodaca *et al.* (2004) and Clavijo-Castro (2014). Plants were classified after the fifth true leaf emerged, and each plant was evaluated using a scale of 1-5 (Table 2), according to disease intensity. To quantify disease severity, the parameters chlorophyll index (UC) and height (cm) were evaluated every 7 days after the treatment was applied for 49 days. Chlorophyll content was measured with a SPAD 502 meter (Minolta), a

tratamientos que se muestran en el Cuadro 1. Los primeros tres tratamientos fueron usados como controles. La inoculación se realizó con Forl (1×10^7 esporas mL^{-1}) previo al trasplante. La aplicación de los tratamientos del EA, se llevó a cabo por aspersión al follaje a los 7 y 14 días después de la inoculación con Forl y trasplante.

Evaluación de la severidad de la enfermedad.

Para evaluar la respuesta de las plantas de tomate al patógeno, se utilizó una escala hedónica propuesta por Apodaca *et al.* (2004) y Clavijo-Castro (2014). La clasificación de las plantas se realizó 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. Para cuantificar la severidad de la enfermedad, se evaluaron en las plantas los parámetros: índice de clorofila (UC) y altura (cm) cada 7 días después de la aplicación del tratamiento durante 49 días. El contenido de clorofila, se midió empleando el equipo SPAD 502 (Minolta). El equipo mide la absorción en longitudes de onda de 650 y 940 nm para estimar niveles de la clorofila. La medición se realizó en la tercera hoja por triplicado para obtener el índice de clorofila. La altura de la planta se midió con un flexómetro desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

La severidad se calculó utilizando la fórmula propuesta por Townsend y Heuberguer (1943) (1).

$$\text{Severidad} = (\sum nv / 5N) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

S= Severidad

n= Plantas por categoría

v= Valor de la categoría

N= Plantas por unidad experimental

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para inducir resistencia en plantas de tomate infectadas con Forl.
Table 1. Treatments used to induce resistance in tomatoes plants infected with Forl.

| Tratamiento | Plantas |
|-------------|--|
| 1 | Testigo absoluto |
| 2 | Raíces heridas |
| 3 | Raíces heridas e inoculadas con Forl |
| 4 | Raíces heridas e inoculadas con Forl + EA 0.5% |
| 5 | Raíces heridas e inoculadas con Forl + EA 1% |
| 6 | Raíces heridas e inoculadas con Forl + EA 2% |

device that measures absorption in 650 and 940 nm wave lengths to estimate chlorophyll levels. Measurements were made in triplicate on the third leaf to obtain the chlorophyll index. Plant height was measured from the base of the stem to the tip using a flexometer.

The severity was calculated by applying the formula proposed by Townsend and Heuberguer (1943) (1).

$$\text{Severity} = (\sum nv / 5N) \times 100 \quad (1)$$

Where:

S= Severity

n= Plants per category

v= Value of the category

N= Plants per experimental unit

Quantification of salicylic acid and jasmonic acid

The content of SA and JA was determined on leaves before and after transplanting, both on treated and non-treated plants, every 7 days for 49 days. The leaves were cut from the plants, wrapped in aluminum foil, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until they

Cuadro 2. Escala hedónica para evaluar la severidad de la enfermedad producida por Forl en plantas de tomate.

Table 2. Hedonic scale used to evaluate disease severity caused by Forl in tomato plants.

| Clase | Intensidad de la enfermedad |
|-------|--|
| 0 | Sin síntomas visibles a la enfermedad |
| 1 | Puntos necróticos en hipocotilo |
| 2 | Hojas marchitas, oscurecimiento en la base del hipocotilo o disminución en el crecimiento de la planta |
| 3 | Marchitez, lesión necróticas 1-5 cm y disminución en el crecimiento de la planta |
| 4 | Lesión necrótica 6-10 cm, defoliación y disminución en el crecimiento. |
| 5 | Muerte de la planta |

Cuantificación de ácido salicílico y ácido jasmónico

El contenido de AS y AJ se determinó en hojas, antes y después del trasplante, tanto en plantas tratadas y en las no tratadas, evaluando cada 7 días, durante 49 días. Las hojas se cortaron de la planta y fueron envueltas en papel aluminio, inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Para la cuantificación de los metabolitos se siguió la metodología propuesta por Guzmán-Téllez *et al.* (2014) y Arbona y Gómez-Cárdenas (2008). Se partió de 1 g de hojas que se colocaron en tubos (30 mL), se les agregaron 10 mL de agua des-ionizada. Posteriormente se homogeneizó con Ultra-Turrax. Los tubos se centrifugaron (Galaxy 7D centrifuga, VWR, USA) a 4000 g durante 45 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se colectó el sobrenadante y se ajustó a un pH de 3.0, con ácido acético al 15%. Se prepararon dos muestras de 3 ml c/u del sobrenadante pH 3 y se agregaron 2 mL de éter etílico a cada tubo. Se agitó y la fase orgánica se recuperó y se llevó a sequedad bajo chorro de nitrógeno gaseoso. El residuo seco resultante se re-suspendió con 500 μL de la fase móvil A/B (50/50) preparada para la determinación en HPLC. Después se filtró utilizando un filtro de PTFE de 0.45 μm (Pall Gelman Acrodisc filtros). El filtrado se

were analyzed. To quantify metabolites, we used the methodology proposed by Guzmán-Téllez *et al.* (2014) and Arbona and Gómez-Cárdenas (2008). We started by cutting 1 g of leaves and placing them in tubes (30 mL) to which 10 mL of deionized water were added. This was homogenized with an Ultra-Turrax dispersing machine. The tubes were centrifuged (Galaxy 7D Centrifuge, VWR, USA) at 4000 g for 45 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was collected, and its pH adjusted to 3.0 with 15% acetic acid. Two 3-ml samples of the pH 3 supernatant were prepared, and 2 mL of ethyl ether were added to each tube. The tubes were shaken to recover the organic phase, which was then dried under a stream of gaseous nitrogen. The dry residue obtained was re-suspended in 500 μL of the A/B (50/50) mobile phase that was prepared for determination in high performance liquid chromatography (HPLC). It was then filtered using a 0.45 μm PTFE filter (Pall Gelman Acrodisc filters). The filtrate was used to determine SA and JA content with a liquid chromatography system (Agilent Technologies Model 1260 Infinity) controlled by the OpenLab ChemStation software (Agilent Technologies). The equipment consists of a quaternary pump, a diode-array detector and a 7725i Rehodyne manual injector; we used a 250 x 4.6 mm C18 column (Phenomenex Luna) of 5 μm particle. The mobile

utilizó para la determinación del ácido salicílico y del ácido jasmónico, utilizando un cromatógrafo de líquidos (Agilent Technologies modelo 1260 infinity), controlado por el programa OpenLab ChemStation (Agilent Technologies). El equipo consta de una bomba cuaternaria, un detector de arreglo de diodos y un inyector manual Rheodyne 7725i, la columna utilizada fue C18 (Phenomenex Luna) de 250 x 4.6 mm de 5 μm de partícula. La fase móvil consistió de una fase A compuesta de 94.9% H_2O , 0.1% HCOOH (ácido fórmico) y 5% CH_3CN (acetonitrilo) y una fase B de 5% H_2O , 94.9% CH_3CN y 0.1% HCOOH , en una proporción 60 (A):40 (B), la cual se trabajó de manera isocrática a 1 mL por minuto durante 20 min a temperatura ambiente. La longitud de onda de detección fue 303 nm para los dos compuestos. Se utilizaron compuestos puros de ácido salicílico y ácido jasmónico (Sigma Aldrich) para realizar curvas de calibración, determinar los tiempos de retención de cada compuesto y calcular la concentración. Los rangos de las curvas de calibración fueron: para AS, 0.02-0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ y de 0.1-1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, para AJ, 0.05-0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.1-1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Diseño experimental y análisis de datos

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 6 tratamientos y tres repeticiones. El experimento se repitió dos veces para su validación. Los datos se analizaron con ANOVA (de una vía) en el paquete estadístico NCSS (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah) versión 2007. Los datos de las 7 semanas de índice de clorofila, altura, severidad y la concentración de ácido salicílico y ácido jasmónico fueron las variables respuestas. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$. El índice de clorofila y altura, se analizaron mediante estadística descriptiva.

phase consisted of an A phase containing 94.9% H_2O , 0.1% HCOOH (formic acid) and 5% CH_3CN (acetonitrile) and a B phase containing 5% H_2O , 94.9% CH_3CN and 0.1% HCOOH , at a 60 (A):40 (B) ratio, for which we used an isocratic method at 1 mL per min during 20 min at room temperature. The detection wave length used for both compounds was 303 nm. Pure salicylic acid and jasmonic acid compounds were used to determine the calibration curves (Sigma Aldrich), the retention time of each compound and calculate the concentration. The calibration curves ranged as follows: 0.02-0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.1-1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ for AS, and 0.05-0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.1-1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ for AJ.

Experimental design and data analysis

We used a completely randomized design with 6 treatments and three replications. The experiment was conducted twice for validation. Data were analyzed using ANOVA (one-way) and NCSS statistical software version 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah). Seven-week data on the chlorophyll index, height, severity, and salicylic and jasmonic acid concentration were variable responses. The means were compared using the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The chlorophyll index and height were analyzed using descriptive statistics.

RESULTS AND DISCUSSION

Chlorophyll content in tomato plants

The chlorophyll content in all tomato plants a week after transplanting was between 41 and 44 UC (Figure 1). These values are within the range (41.3-56.11 UC) reported for tomato plants

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Contenido de clorofila en plantas de tomate.

El contenido de clorofila en las plantas de tomate después de una semana del trasplante fue entre 41-44 UC para todas las plantas (Figura 1). Estos valores se encuentran en el rango (41.3-56.11 UC) reportado para plantas de tomate medidos en condiciones similares a las nuestras (Mendoza *et al.*, 1998; Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017). El contenido de clorofila presentó una disminución a partir de la tercera semana después del trasplante en las plantas testigo absoluto y control con raíces heridas, comportamiento asociado a la demanda de nitrógeno durante el rápido crecimiento vegetativo de las

that were measured under conditions similar to ours (Mendoza *et al.*, 1998; Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017). The chlorophyll content in plants used as absolute controls and controls with roots with cuts on them decreased starting on the third week after transplanting, a fact that is associated with the plants' demand for nitrogen during their rapid vegetative growth (Nurzyeki, 2013). However, the control plants that had roots with cuts and that had been inoculated with Forl showed a significant decrease in UC beginning the second week after transplanting, with significantly lower chlorophyll values ($p \leq 0.05$) than the other two control groups (Figure 1). The decrease in UC could be due to the presence of Forl, as reported by Mendoza *et al.* (1998) and Hiderman *et al.* (1992).

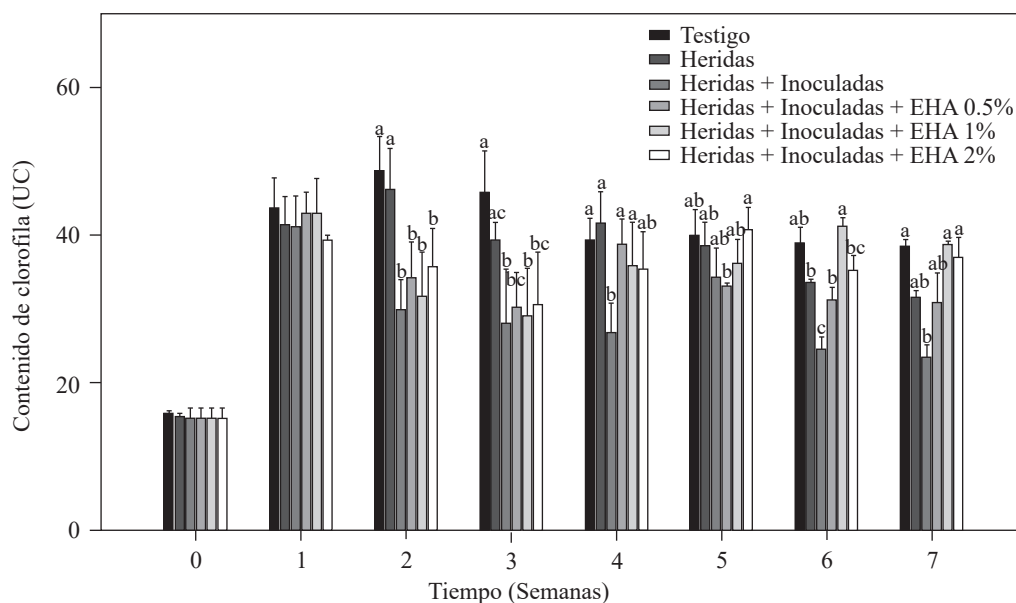


Figura 1. Contenido de clorofila en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl, y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces.

Figure 1. Chlorophyll content in tomato plants non-inoculated and inoculated with Forl and treated with different concentrations of garlic extract. The values are the means of three repetitions of 10 plants each. The vertical bars represent the standard deviation ($n=3$). Different letters indicate a significant difference between treatments, according to the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The experiment was conducted twice.

plantas (Nurzyeki, 2013). Sin embargo, las plantas control con raíces heridas e inoculadas con Forl, presentaron una disminución significativa en las UC, a partir de la segunda semana después del trasplante, con valores de clorofila significativamente menores ($p \leq 0.05$) que los otros dos grupos de controles (Figura 1). Pudiendo atribuirse esta disminución en las UC, a la presencia de Forl, como lo reportaron Mendoza *et al.* (1998) y Hiderman *et al.* (1992).

Las plantas tratadas con EA, lograron incrementar las UC. Específicamente, las plantas que recibieron los tratamientos de 1 y 2% de EA, incrementaron significativamente ($p \leq 0.05$) los valores de UC, logrando en las dos últimas semanas de la evaluación, alcanzar los valores del testigo absoluto, que presentó un valor de clorofila de 41.3 UC, y las plantas con EA 1 y 2% con valores de 41.5 y 40.5 UC, respectivamente. Massacci *et al.* (2008) reportó que las plantas infectadas con *F. oxysporum* no logran llevar a cabo procesos fotosintéticos, reduciendo la tasa de asimilación fotosintética. Coincidiendo con los datos obtenidos en esta evaluación, donde los menores valores de clorofila (24.9 UC) se presentaron en el grupo de plantas control con raíces heridas e inoculadas que no recibieron tratamiento de EA, y no lograron recuperar los valores de clorofila, como lo hicieron las plantas que recibieron los tratamientos con EA. Las UC es una medida indirecta de la cantidad de N en la planta (Vázquez *et al.*, 2012), por lo que se asume que, las plantas tratadas con el EA, mantuvieron un buen desarrollo, aun cuando fueron infectadas con Forl.

Altura de las plantas de tomate

Los resultados de las mediciones de la altura de las plantas de tomate se muestran en la Figura 2. Se puede observar que las tres primeras semanas después de la inoculación y trasplante, todas las plantas crecieron sin mostrar diferencias significativas

Plants treated with EA were able to increase the UC. Specifically, plants treated with 1 and 2% of EA had significantly increased values of UC ($p \leq 0.05$), so during the last two weeks of evaluation they were able to reach the values of the absolute control, whose chlorophyll value was of 41.3 UC, and plants treated with 1 and 2% of EA with values of 41.5 and 40.5 UC, respectively. Massacci *et al.* (2008) reported that in plants infected with *F. oxysporum*, photosynthetic processes do not take place, and this decreases the photosynthetic assimilation rate. These results are in agreement with data obtained in this evaluation, where the lowest chlorophyll values (24.9 UC) were observed in the group of control plants that had roots with cuts and that had been inoculated but not treated with EA so that they were not able to recover the chlorophyll values as the plants treated with EA did. UC is an indirect measure of the amount of N in a plant (Vázquez *et al.*, 2012), so it is assumed that plants treated with EA developed well even when they were infected with Forl.

Height of the tomato plants

The results of measuring the height of the tomato plants are shown in Figure 2. During the first three weeks after inoculation and transplanting, all the plants grew and there were no significant differences between the plants non-treated and treated with EA ($p \leq 0.05$). After the fourth week, there were marked differences in growth within the groups of plants; for example, plants treated with 1 and 2% EA grew the most, and plants treated with 2% EA reached 67.8 cm, while plants treated with 1% EA reached 62.2 cm; these values were similar ($p \leq 0.05$) to the value of the absolute control: 61.9 cm. Plants treated with 0.5% EA reached an average height of 53.5 cm, which is higher than the 34.9 cm reached by the control with cut + inoculated roots.

entre las plantas tratadas con EA y las no tratadas ($p \leq 0.05$). Después de la cuarta semana, los grupos de plantas, marcaron las diferencias en el crecimiento, siendo las plantas que recibieron el tratamiento con el EA en concentraciones de 1 y 2%, las que presentaron el mayor crecimiento, alcanzando los valores de 67.8 cm para las plantas tratadas con EA al 2%, 62.2 cm las plantas con EA al 1%, valores similares ($p \leq 0.05$) al 61.9 cm al que presentó el grupo de testigo absoluto. Las plantas tratadas con EA al 0.5%, alcanzaron una altura promedio de 53.5 cm, valor superior al 34.9 cm, que presentó el control de raíces heridas + inoculadas, ambos grupos presentan valores estadísticamente menores ($p \leq 0.05$) que los de los tratamientos con 1 y 2% de EA (Figura 2). La disminución en el crecimiento,

Both groups showed values that are statistically lower ($p \leq 0.05$) than the values of treatments with 1 and 2% of EA (Figure 2). Growth decrease is a characteristic symptom of plants infected by Forl (Apodaca *et al.*, 2004; Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017), due to the proliferation of the pathogen in the plant's vascular bundles, which means the spores are disseminated towards the apex in the xylem flow (Hadian *et al.*, 2011). This is in agreement with the results observed in control plants with cuts in the roots + Forl inoculation that were not treated with EA; the disease established itself and was propagated intercellularly. The treatment with 0.5% EA induced the lowest level of resistance in tomato plants because the group of plants sprayed with EA were the lowest in height of the three EA

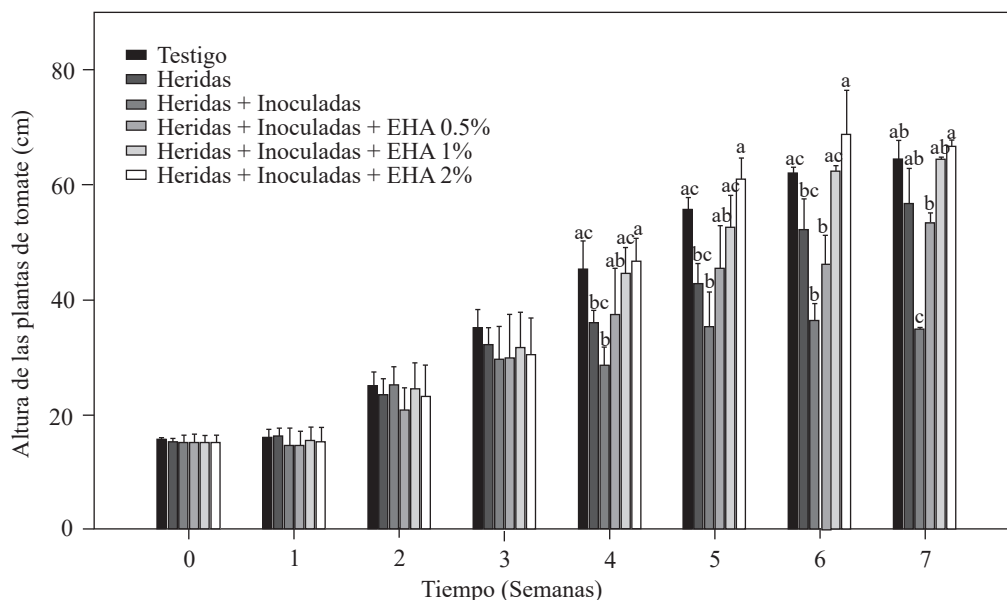


Figura 2. Evaluación de la altura de plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con extracto de ajo con diferentes concentraciones. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces.

Figure 2. Evaluation of the height of tomato plants non-inoculated and inoculated with Forl and treated with different concentrations of garlic extract. The values are the means of three repetitions with 10 plants each. The vertical bars represent the standard deviation ($n=3$). Different letters indicate a significant difference between treatments, according to the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The experiment was conducted twice.

es un síntoma característico de plantas infectadas por Forl (Apodaca *et al.*, 2004; Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017), debido a la proliferación del patógeno en los haces vasculares de la planta, diseminando las esporas hacia el ápice mediante el flujo del xilema (Hadian *et al.*, 2011). Concordando con los resultados observados en las plantas control con heridas en la raíz + inocularon con Forl, sin recibir tratamiento con EA, estableciéndose la enfermedad y propagándose intercelularmente. El tratamiento de EA al 0.5%, indujo la menor resistencia a la planta de tomate ya que el grupo de plantas que recibió este tratamiento, presentó la menor altura de los tres tratamientos de EA. El efecto del ajo como promotor de crecimiento vegetativo y reproductivo en plantas infectadas con patógenos, esta reportado por Fatema y Ahmad (2005), en plantas de cacahuate infectadas con nematodos, y en plantas de tomate infectada con Fol por Chohan y Perveen (2015). En ambos casos las soluciones acuosas de ajo mejoraron la respuesta en el crecimiento de la planta y controlando al patógeno. En este estudio las concentraciones del EA de 1 y 2% mejoraron el desarrollo de las plantas induciendo la resistencia a Forl.

Severidad de la enfermedad de plantas de tomate infectadas con Forl

Los resultados de la evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por Forl en las plantas de tomate, se muestra en la Figura 3. Todas las plantas inoculadas con Forl, presentaron en diferentes grados, síntomas característicos de la enfermedad, incluyendo, marchitez en las hojas y defoliación, disminución en el crecimiento y afectaciones en el tallo como puntos y lesiones necróticas en los haces vasculares. Como se esperaba, las plantas testigo absoluto y las de raíces heridas, no presentaron síntomas a la enfermedad ya que no fueron

treatments. The effect of garlic as a promoter of vegetative and reproductive growth in pathogen-infected plants was reported by Fatema and Ahmad (2005) in peanut plants infected by nematodes, and by Chohan and Perveen (2015) in tomato plants infected with Fol. In both cases, aqueous garlic solutions improved the plant's growth response and were able to control the pathogen. In this study, 1 and 2% concentrations of EA improved plant development and induced resistance to Forl.

Disease severity of tomato plants infected with Forl

Results of the evaluation of disease severity caused by Forl in tomato plants are shown in Figure 3. All plants inoculated with Forl showed characteristic symptoms of the disease at different levels, including leaf wilt and defoliation, slow growth and stem damage in the form of spots and necrotic lesions on vascular bundles. As expected, the absolute control and the plants with cut roots did not develop disease symptoms because they were not inoculated with the fungus (Figure 3). The minimum value of disease severity was 26.4% in the group of plants treated with 1 and 2% EA, followed by 33.4% in plants treated with 0.5% EA. The most affected plants were those in the control group with cut roots + inoculation, which showed visible symptoms starting the second week after inoculation and 100% severity in the seventh week. These results show the positive effect of applying EA, because disease severity was reduced by 66 to 73% compared to the severity level in the control plants (cut + inoculated), which means that the plants treated developed fewer symptoms. The effect on disease severity caused by Forl in tomato plants treated with EA could be due to the accumulation of metabolites such as SA and JA, which induce defense mechanisms, as demonstrated by Shah

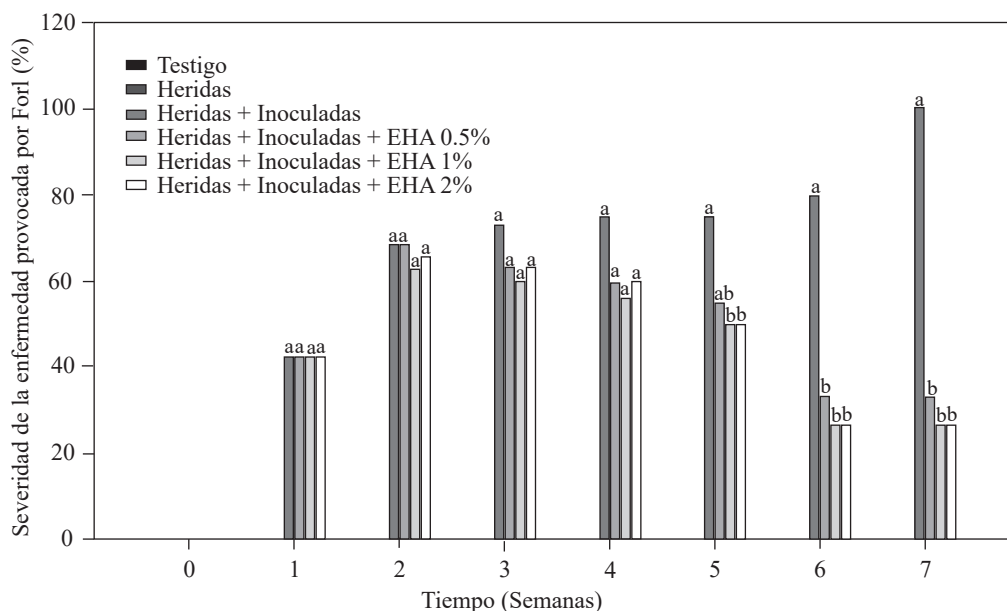


Figura 3. Porcentaje de severidad de la enfermedad provocada por Forl en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces.

Figure 3. Percentage of disease severity caused Forl in non-inoculated and inoculated tomato plants that were treated with different concentrations of garlic extract. The values are the means of three replications of 10 plants each. Different letters indicate a significant difference between treatments, according to the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The experiment was conducted twice.

inoculadas con el hongo (Figura 3). El valor mínimo de severidad de la enfermedad fue del 26.4%, que se presentó en el grupo de plantas que recibieron el tratamiento con el EA al 1 y 2%, seguido del tratamiento con EA 0.5% con 33.4%. Las plantas más afectadas fueron el grupo control de raíces heridas + inoculadas, que mostraron síntomas visibles desde la segunda semana después de la inoculación, presentando una severidad del 100% en la séptima semana. Estos resultados muestran el efecto positivo de la aplicación del EA, donde las plantas tratadas presentaron una reducción de daños entre el 66 y 73 %, comparado con la severidad presentada por las plantas control (heridas + inoculadas), lo que significa que los síntomas ocasionados por el hongo disminuyeron en las plantas tratadas. Este

and Zeier (2013) and El Oirdi *et al.* (2011), where these metabolites induced the expression of genes involved in plant defense under stress conditions. Based on this result, we can conclude that the exogenous application of EA acted as an activator of systemic acquired resistance in tomato plants.

Quantification of salicylic acid (SA)

The results of SA quantification in tomato plants are shown in Figure 4. There were variations in the SA content beginning in the first week of inoculation and basal levels of $0.10 \mu\text{g g}^{-1}$ in the absolute control plants, a value within the range ($0.10\text{-}10 \mu\text{g g}^{-1}$) reported for Solanaceae (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). In cut

efecto en la reducción de la severidad de la enfermedad provocada por Forl en plantas de tomate tratadas con EA, podría atribuirse a la acumulación de metabolitos como el AS y AJ que inducen los mecanismos de defensa, como lo demostraron Shah y Zeier (2013) y El Oirdi *et al.* (2011) donde, estos metabolitos, indujeron la expresión de genes involucrados en la defensa en condiciones de estrés. Basado en este resultado se puede inferir que la aplicación exógena del EA funcionó como activador de la resistencia sistémica adquirida en las plantas de tomate.

Cuantificación de ácido salicílico (AS)

Los resultados obtenidos en la cuantificación de AS en las plantas de tomate se muestran en la Figura 4. Puede observarse que las variaciones en el contenido de AS presentaron cambios desde la semana de la inoculación de las plantas, cuantificando niveles basales de $0.10 \mu\text{g g}^{-1}$ en las plantas testigo absoluto, valor dentro del rango ($0.10\text{-}10 \mu\text{g g}^{-1}$) reportado para plantas Solanáceas (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). En las plantas heridas e inoculadas se cuantificó una concentración inicial de $0.24 \mu\text{g g}^{-1}$, dos veces la concentración del control absoluto. En las plantas inoculadas con Forl y tratados con EA 1 y 2%, mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) del contenido de AS en la tercera semana después de la inoculación. En las plantas con EA al 2%, se cuantificaron valores 11 y 6 veces más altos que los que se presentaron en los controles para esa misma semana y en el tratamiento con EA al 1%, se cuantificaron 8 y 4.5 veces más los valores que sus respectivos controles. Después de este incremento, los niveles de AS decrecieron las semanas posteriores, volviendo a incrementarse en la sexta semana (Figura 4). Las plantas control (testigo absoluto y heridas + inoculadas), a partir de la quinta semana mostraron un incremento en la

and inoculated plants, an initial concentration of $0.24 \mu\text{g g}^{-1}$ was quantified, which was twice the concentration in the absolute control. In plants inoculated with Forl and treated with 1 and 2% of EA, there was a significant increase ($p \leq 0.05$) in the SA content in the third week after inoculation. In plants treated with 2% EA, we found values that were 11 and 6 times higher than the values of the control treatments within the same week; for the treatment with 1% EA, we found values 8 and 4.5 times higher than the values of their respective controls. After that increase, SA levels decreased in the following weeks but increased again in the sixth week (Figure 4). As of the fifth week, SA accumulation in the control plants (absolute control and cut + inoculated plants) increased and reached a maximum concentration of 0.78 y $0.82 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. These increases in the control treatments occurred two weeks after the increase in the group of plants treated with 1 and 2% EA. Increases in SA content were between 2 and 5 times higher than the basal values reported in plants at the onset of flowering, and in plants infected with necrotic pathogens such as *Fusarium oxysporum* (Swarupa *et al.*, 2014). This fact may explain the increase in SA content in the control plants from week five to seven. However, increases five times higher than SA concentration that occurred in the third week in plants treated with 1 and 2% EA may be associated with the treatment applied rather than with the presence of the pathogen, given that the maximum SA values in treatments with 1 and 2% of EA were consistent with the reduced symptoms observed when disease severity was evaluated (Figure 3). In support of this deduction, Ojha and Chatterjee (2012) applied SA to tomato plants infected with *F. oxysporum* and observed a significant increase in plant resistance to pathogen attack when the activity of enzymes related to the defense system increased. The greatest increases

acumulación de AS, alcanzando la máxima concentración de 0.78 y 0.82 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Estos incrementos en los controles, se presentaron dos semanas posterior al incremento que se presentó en el grupo de plantas tratadas con el EA al 1 y 2%. Los incrementos en el contenido de AS entre 2 a 5 veces los valores basales, son reportados en plantas durante el inicio de la floración, así como en plantas infectadas con patógenos necróticos como *Fusarium oxysporum* (Swarupa *et al.*, 2014). Pudiendo ser esta la razón de los incrementos del AS en las plantas control en las semanas de la quinta a la séptima. Sin embargo, los incrementos de más de 5 veces la concentración de AS que se presentaron en la tercera semana en las plantas tratadas con EA al 1 y 2%, pudiera estar asociada al tratamiento recibido más que a la presencia del patógeno, debido a

in enzyme activity took place 21 days after SA application. This result is in agreement with the results of the present study, which show that the highest SA values were quantified the third week after treatment application. The protective effect against Forl in plants treated with EA, which improved their growth and development, was also reported by Hayat *et al.*, (2012), who by increasing endogenous SA concentrations were able to significantly improve plant growth characteristics, including height, leaf number and color, shoot diameter, dry and fresh weight, and photosynthetic rate.

Based on the results of our study, increased SA concentration coincides with an improvement in plant development, as well as resistance to the pathogen, which agrees with the important

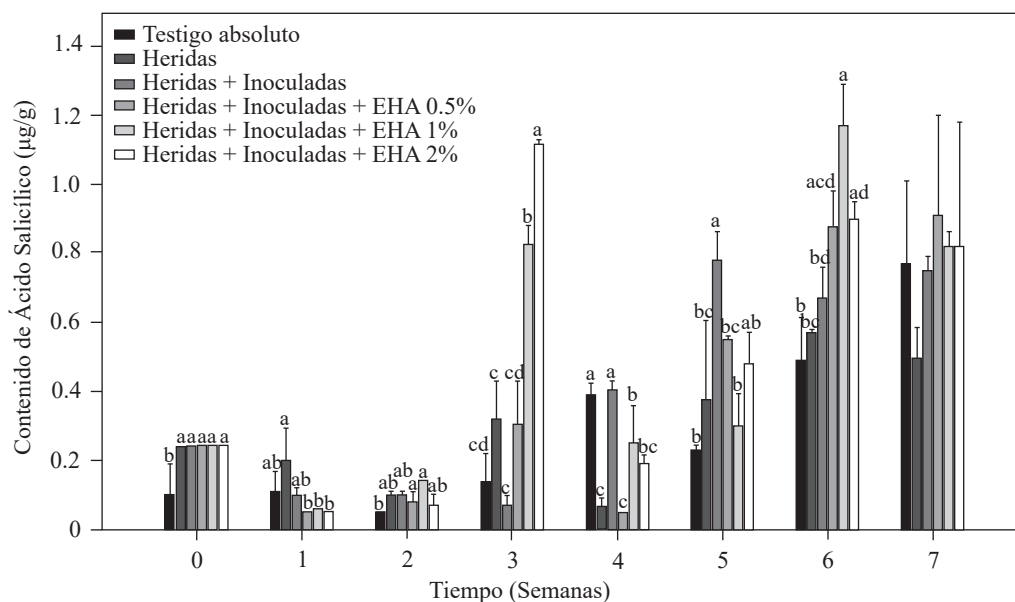


Figura 4. Concentración de ácido salicílico en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces.

Figure 4. Concentration of salicylic acid in tomato plants inoculated and non-inoculated with Forl and treated with different concentrations of garlic extract. The values are the means of three repetitions with 10 plants each. The vertical bars represent the standard deviation ($n=3$). Different letters indicate a significant difference among treatments, according to the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The experiment was conducted twice.

que los valores máximos de AS en los tratamientos con el EA de 1 y 2%, concuerda con la disminución de los síntomas observados durante la evaluación de la severidad de la enfermedad (Figura 3). Apoyando esta deducción, Ojha y Chatterjee (2012), aplicando AS a plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum*, significativamente incrementó la resistencia de la planta al ataque del patógeno al aumentar la actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa, presentándose los mayores incrementos en la actividad de las enzimas, a los 21 días después de la aplicación del AS. Coincidiendo con el resultado obtenido en este estudio, los valores más altos de AS se cuantificaron a la tercer semana después de la aplicación del tratamiento. El efecto protector contra Forl, que mostraron las plantas tratadas con el EA, manifestado en mejora en el crecimiento y desarrollo de la planta, también fue reportado por Hayat *et al.*, (2012), al aumentar las concentraciones endógenas de AS, mejoró significativamente las características de crecimiento de las plantas incluyendo la altura, el número y color de hojas, el diámetro del vástago, el peso seco y fresco de la planta, así como también la tasa fotosintética.

Para el caso de los resultados de este estudio, el incremento en la concentración de AS coincide con la mejora del desarrollo de la planta, así como la resistencia al patógeno, lo que concuerda con el papel importante reportado del AS en la acción protectora contra patógenos. Probablemente por la capacidad que tiene de inducir la transcripción de proteínas de defensa (PR) en las que codifican enzimas quitinasas, glucanasas, endohidrolasas, y β -1, 3-glucanasa para contribuir con la resistencia sistémica adquirida (RSA) contra diversos patógenos por su actividad antifúngica (Heil y Bostock, 2002; Hayat *et al.*, 2010).

protective role of SA against pathogens, probably because of its ability to induce the transcription of defense proteins (PR) which codify enzymes such as chitinases, glucanases, endohydrolases and β -1, 3-glucanase that contribute to systemic acquired resistance (SAR) against different pathogens because of its antifungal activity (Heil and Bostock, 2002; Hayat *et al.*, 2010).

Quantification of jasmonic acid (JA)

The results of JA quantification in tomato plants are shown in Figure 5. Plants with cut roots + plants inoculated with Forl, as well as those to which EA was applied increased their JA content, with initial values of $0.89 \mu\text{g g}^{-1}$ in plants cut and/or inoculated with Forl, which was significantly higher ($p \leq 0.05$) than the value of $0.74 \mu\text{g g}^{-1}$ of the absolute control plants. As of the second week, application of 1 and 2% EA produced an increase 2.5 times the value of the absolute control, and 1.8 times the value of the cut + Forl control. These JA values remained significantly higher ($p \leq 0.05$) in the third week after inoculation and after transplanting plants treated with 1 and 2% EA. In all treatments, except for the absolute control, JA content was gradually reduced as of the fourth week until the end of the evaluation but maintained high levels, which indicates that the plant was responding to a stress condition (Ryan and Moura, 2002). From this result we can infer that 1 and 2% EA concentrations are enough to increase endogenous JA concentrations in tomato plants, which in turn can induce plant defense responses (Kravchuk *et al.*, 2011). JA is known to be a key regulator that stimulates defense responses in synergy with SA and reduces symptoms of diseases caused by pathogens (Pieterse *et al.*, 2012) by

Cuantificación de ácido jasmónico (AJ)

Los resultados obtenidos en la cuantificación de AJ en las plantas de tomate se muestran en la Figura 5. Se puede observar que tanto las plantas con raíz herida, como las de raíz herida + inoculadas con Forl y a las que se les aplicaron los EA, provocaron un incremento en el contenido de AJ en las plantas de tomate, cuantificando valores iniciales de $0.89 \mu\text{g g}^{-1}$ en plantas con herida y/o inoculadas con Forl, valor significativamente mayor ($p \leq 0.05$) que el de las plantas testigo absoluto con $0.74 \mu\text{g g}^{-1}$. A partir de la segunda semana, la aplicación de EA al 1 y 2 % indujeron un incremento de 2.5 veces el valor del testigo absoluto y de 1.8 veces el del control con herida + Forl. Estos valores de

activating the expression of genes involved in plant defense (Ryan, 2000). It has been reported that JA induces protease and polyphenol oxidase inhibitors, and shikimate pathway compounds specifically in tomato plants, which reduces pathogens (El Oirdi *et al.*, 2011). It is well accepted that plants need to activate induced systemic resistance that depends on JA to fight necrotrophic pathogens (Glazebrook, 2005). Therefore, protecting tomato plants from Forl as was done in this study could be related to rapid JA induction and quantified endogenous concentrations (Rahman *et al.*, 2012). However, simultaneous activation of the defense systems that depend on SA and JA results in increased resistance to pathogens (Mur *et al.*, 2006). This is in agreement with the observed increases in endogenous SA and

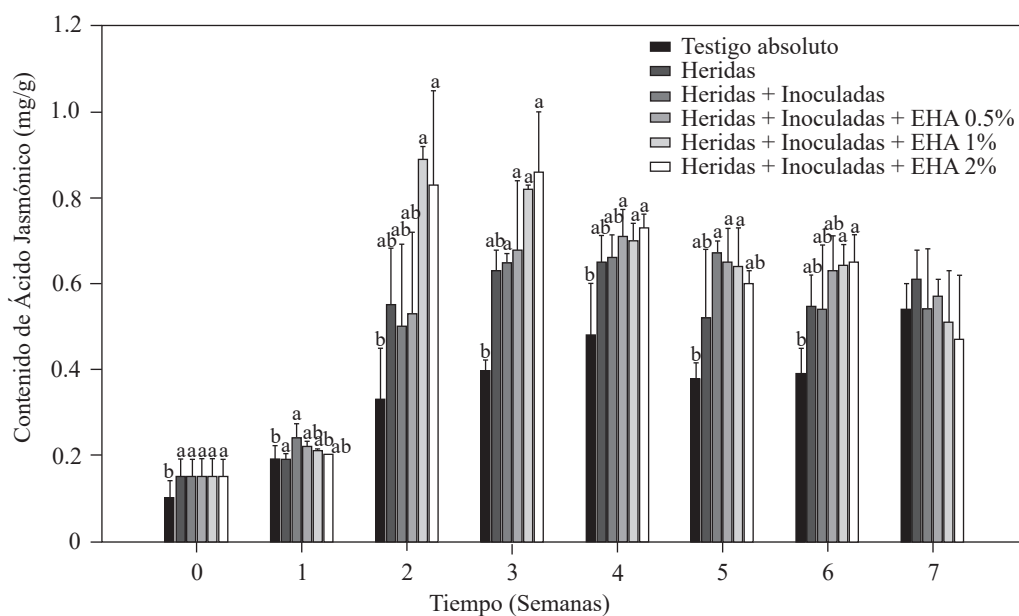


Figura 5. Concentración de ácido jasmónico en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$). Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para $p \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces.

Figure 5. Concentration of jasmonic acid in tomato plants non-inoculated and inoculated with Forl and treated with different concentrations of garlic extract. The values are the means of three repetitions with 10 plants each. The vertical bars represent the standard deviation ($n=3$). Different letters indicate a significant difference between treatments, according to the Tukey-Kramer method at a $p \leq 0.05$ probability level. The experiment was conducted twice.

AJ se mantuvieron significativamente ($p \leq 0.05$) altos en la tercera semana después de la inoculación y trasplante en las plantas tratadas con EA al 1 y 2%. En todos los tratamientos, con excepción del testigo absoluto, el contenido de AJ disminuyó gradualmente a partir de la cuarta semana hasta el final de la evaluación, conservando niveles altos, lo que nos indica que la planta está respondiendo a alguna situación de estrés (Ryan y Moura, 2002). De este resultado podemos inferir que las concentraciones del EA del 1 y 2% es suficiente para incrementar concentraciones endógenas de AJ en las plantas de tomate, el cual a su vez puede inducir respuestas de defensa en la planta (Kravchuk *et al.*, 2011). El AJ es reconocido como un regulador clave para estimular en las plantas las respuestas de defensa en sinergia con el AS, reduciendo los síntomas de las enfermedades ocasionados por patógenos (Pieterse *et al.*, 2012), mediante la activación en la expresión de genes involucrados en la defensa (Ryan, 2000). Específicamente, en plantas de tomate se ha reportado que el AJ induce inhibidores de proteasas y polifenoloxidasas y compuestos de la ruta de los fenilpropanoides, mostrando un efecto en la disminución de patógenos (El Oirdi *et al.*, 2011). Es bien aceptado que las plantas requieren activar la resistencia sistémica inducida dependiente de AJ, para combatir patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Por lo que la protección de las plantas de tomate contra Forl, observada en este estudio, puede estar relacionada con la rápida inducción de AJ y las concentraciones endógenas cuantificadas (Rahman *et al.*, 2012). Sin embargo, la activación simultánea de los sistemas de defensa dependiente de AS y AJ, resultan en un incremento de la resistencia a patógenos (Mur *et al.*, 2006). Lo anterior concuerda con los resultados observados en los incrementos endógenos de AS y AJ y la disminución de los síntomas de la enfermedad producida por Forl en plantas de tomate.

JA and the reduction of disease symptoms caused by Forl in tomato plants.

CONCLUSIONS

Based on the results of this study, we may conclude that spraying 1 and 2% of EA on tomato plants conferred resistance against *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* (Forl), by increasing the endogenous content of salicylic acid and jasmonic acid.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank CONACYT for the scholarship granted to Ileem Aguilar Gastélum to her Master's degree.

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

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que la aspersión de un EA al 1 y 2% a plantas de tomate le proporcionó la resistencia contra *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* (Forl), mediado por el incremento del contenido endógeno de ácido salicílico y ácido jasmónico.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por la beca otorgada a Ileem Aguilar Gastélum para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias.

## LITERATURA CITADA

Apodaca M, Zavaleta E, García R, Osada S y Valenzuela J. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* en Sinaloa México y su control. Revista Mexicana de Fitopatología 20:1-7.

- Disponibile en línea: <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. *radicis lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:7-13. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222102>
- Arbona V and Gómez-Cadenas A. 2008. Hormonal modulation of citrus responses to flooding. Journal of Plant Growth Regulation 27:241-250. DOI: 10.1007/s00344-008-9051-x
- Arzoo K, Biswas S and Rajik M. 2012. Biochemical evidences of defence response in tomato against fusarium wilt induced by plant extracts. Plant Pathology Journal 11:42-50. DOI: 10.3923/ppj.2012.42.50
- Baysal O, Laux P and Zeller W. 2002. Further studies on the induced resistance effect of plant extract from *Redera helix* against fire blight (*Erwinia amylovora*). Acta Horticulturae 590:273-277. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.40
- Carrillo FJA, Montoya RTJ, García ERS, Cruz OJE, Márquez ZI y Sanduño BJ. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en El Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:123-127. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221205>
- Clavijo CSD. 2014. Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium spp.* en Capsicum. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia, 75 pp. Disponible en línea: [http://www.bdigital.unal.edu.co/47659/1/29673462\\_Sharon.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/47659/1/29673462_Sharon.pdf)
- Chohan S and Perveen R. 2015. Phytochemical analysis and antifungal efficacy of rhizome extracts of various plants against fusarium wilt and root rot of tomato. International Journal of Agriculture and Biology 17:1193-1199. DOI: 10.17857/IJAB/15.0055
- El Oirdi M, El Rahma TA, Rigan L, El Hadram A, Rodrigue MC, Daay F, Vojno A and Bouarab K. 2011. *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. The Plant Cell 23:2405-2421. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083394>
- El-Kalla SM. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plant against fusarium wilt diseases by bioagent fungi (Arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (Jasmonic acid and Salicylic acid): 1-Changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defense mechanism. Australian Journal of Basic Applied Science 1:691-705. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/42bb/00a3ee771688eba8485814214110d11cb703.pdf>
- Fatema S and Ahmad MU. 2005. Comparative efficacy of some organic amendments and a nematicide (Furadan-3G) against root-knot on two local varieties of groundnut. Plant Pathology Journal 4:54-57. DOI: 10.3923/ppj.2005.54.57
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43:205-227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- Gozzo F and Faoro F. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:12473-12491. DOI: 10.1021/jf404156x.
- Guzmán TE, Montenegro DD and Benavides MA. 2014. Concentration of salicylic acid in tomato leaves after foliar aspersions of this compound. American Journal of Plant Sciences 5:2048-2056. DOI: 10.4236/ajps.2014.513220
- Hadian S, Rahnama 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 5:2052-2057. Disponible en línea: <http://www.aensiweb.com/old/aeb/2011/2052-2057.pdf>
- Hayat Q, Hayat S, Alyemeni MN and Ahmad A. 2012. Salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. Plant Soil Environmental 58:417-423. DOI: 10.17221/232/2012-PSE
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68:14-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- Heil M and Bostock RM. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annals of botany 89:503-512. DOI: 10.1093/aob/mcf076
- Hiderman J, Makino A, Kurita Y, Mae T and Ojima K. 1992. Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. Plant and cell physiology 33:1209-1214. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078375>
- Jansen H, Müller B and Knobloch K. 1987. Allicin characterization and its determination by HPLC. Planta Médica 53:559-562. DOI: 10.1055/s-2006-962811
- Kachroo A and Robin GP. 2013. Systemic signaling during plant defense. Current Opinion in Plant Biology 16:527-533. DOI: 10.1016/j.pbi.2013.06.019
- Kravchuk Z, Vicedo B, Flors V, Camanes G, González BC, García AP. 2011. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against *B. cinerea*. Journal of Plant Physiology 168:359-366. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.07.028
- Massacci A, Nabiev SM, Pietrosanti L, Nematov SK, Chernikova TN, Thor K, Leipner J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry 46:189-195. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.10.006>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato disease caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection 73:78-92. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Mendoza M, González GA, Santelises AA, Etcheveres JD y Rincón JA. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra 16:135-141. Disponible en línea: <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/16/2/art135-141.pdf>

- Mur L, Kenton P, Atzorn R, Miersch O and Wasternack C. 2006. The Outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140:249-262. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072348>
- Nurzycki J. 2013. Effect of substrates on nutrient content in root zone and leaves of greenhouse tomato. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus* 12:169-178. Disponible en línea: <http://www.acta.media.pl/pl/full/7/2013/000070201300012000050016900178.pdf>
- Ojha S and Chatterjee NCh. 2012. Induction of resistance in Tomato plants against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Protection Research* 52:220-225. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0034-3>
- Peñuelas RO, Arellano GM, Verdugo FA, Chaparro ELA, Hernández RSE, Martínez CJL y Vargas AIC. 2017. *Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:360-376. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-3
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon RA, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Development Biology* 28:489-521. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
- Rahman TA, Oirdi ME, Gonzalez LR, Bouarab K. 2012. Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Molecular Plant Microbe Interaction* 25:1584-93. DOI: 10.1094/MPMI-07-12-0187-R
- Rivas SVM and Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental Botany* 62:3321-3338. DOI: 10.1093/jxb/err031
- Ryan CA. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:112-121. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00269-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00269-1)
- Ryan CA and Moura DS. 2002. Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proceeding of the National Academy of Science*. 99:6519-6520. <https://doi.org/10.1073/pnas.112196499>
- Shah J and Zeier J. 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 4:30. DOI: 10.3389/fpls.2013.00030
- Swarupa V, Ravishankar K and Rekha A. 2014. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta* 239:735-751. DOI: 10.1007/s00425-013-2024-8
- Szczuchura W, Staniaszek M and Habdas H. 2013. *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici*-the cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. *Journal of Plant Protection Research* 53:172-176. DOI: 10.2478/jppr-2013-0026
- Townsend GR and Heuberger JW. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 27:340-343. Disponible en línea: <https://eurekamag.com/research/025/008/025008582.php>
- Van Loon L, Rep M and Pieterse CM. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-62. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- 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*, 5:1-9. Disponible en línea: [http://www.uaq.mx/investigacion/revista\\_ciencia@uaq/Archivos-PDF/v5-n1/articulo6.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/Archivos-PDF/v5-n1/articulo6.pdf).
- Zaker M and Mosallanejad H. 2010. Antifungal activity of some plant extracts on *Alternaria alternata*, the causal agent of alternaria leaf spot of potato. *Pakistan Journal of Biological Science* 13:1023-1029. DOI: 10.3923/pjbs.2010.1023.1029

# Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central Mexico

## Microorganismos asociados con la pudrición de corona de alfalfa en el norte centro de México

**Rodolfo Velásquez-Valle, Luis Roberto Reveles-Torres\***, Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Km. 24.5 Carretera Zacatecas - Fresnillo, C.P. 98500, Calera de V. R., Zacatecas; **Hugo Talavera-Correa**, Unidad Académica de Biología, Universidad Autónoma de Zacatecas. \*Autor para correspondencia: reveles.roberto@inifap.gob.mx.

Recibido: 13 de Junio, 2018.

Aceptado: 03 de Agosto, 2018.

Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Talavera-Correa H. 2018. Microorganisms associated with alfalfa crown rot in north central Mexico. *Revista Mexicana de Fito patología* 36(3); 414-422.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1806-1

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 17, 2018.

**Resumen.** La alfalfa es un importante cultivo forrajero en los estados de Aguascalientes, Durango y Zacatecas localizados en el norte centro de México. Información sobre los manchones de plantas muertas atribuidas a la enfermedad conocida como pudrición de la corona y sus microorganismos asociados es muy escasa en esta región, consecuentemente, el objetivo del actual trabajo fue identificar los géneros de microorganismos asociados a la pudrición de la corona en los estados mencionados. Muestras de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona y el suelo alrededor de ellas fueron recolectadas en 30 parcelas de alfalfa. Trece

**Abstract.** Alfalfa is an important forage crop in the states of Aguascalientes, Durango, and Zacatecas located in the northern-center of Mexico. Very scarce information is available on the spots of killed plants attributed to the disease known as crown rot and its associated microorganisms in this region. Therefore, the objective of the current work was to identify the genera of microorganisms associated to crown rot in the mentioned states. Samples of alfalfa plants showing crown rot symptoms and soil around them were collected in 30 alfalfa fields. Thirteen nematodes genera were identified in the soil samples: (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus*, and *Xiphinema*) as well as five fungi (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) and oomycetes (*Phytophthora*, and *Pythium*) genera in the crown tissues. It is remarkable the high incidence of *Ditylenchus* (56.7%), *Pratylenchus* (50%) and *Fusarium* fungi (100%).

géneros de nematodos fueron identificados en las muestras de suelo: *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*, así como cinco géneros de hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*) y oomicetos (*Phytophthora* y *Pythium*) en los tejidos de la corona. Se destaca la alta incidencia de los nematodos *Ditylenchus* (56.7%) y *Pratylenchus* (50%) y del hongo *Fusarium* (100%).

**Palabras clave:** hongos, nematodos, oomicetos, distribución regional.

La producción de alfalfa (*Medicago sativa*) representa el 27% de la producción nacional de forraje. En México la superficie cultivada con esta forrajera durante 2018 fue de poco más de 387,000 hectáreas donde se obtuvo un rendimiento promedio de 58.7 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de forraje en verde (SIAP, 2018). Los estados con mayor producción de alfalfa a nivel nacional son Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Baja California, Sonora, Durango, Coahuila y Puebla que en conjunto aportan el 70% de la producción nacional (Lara y Jurado, 2014). La alfalfa es un cultivo importante en el norte centro de México, donde se localizan los estados de Aguascalientes, Durango (Los Llanos) y Zacatecas; en esta área se han observado manchones de plantas muertas de alfalfa de dimensiones variables en la mayoría de las parcelas comerciales, pero existe escasa o ninguna información respecto a los organismos asociados con la pudrición de la corona o a las pérdidas que esta enfermedad provoca en la región. La pudrición de la corona de alfalfa se encuentra diseminada mundialmente; algunas especies de *Fusarium* se encuentran entre los hongos más comunmente aislados de las coronas y raíces necróticas de plantas

**Key words:** fungi, nematodes, oomycetes, regional distribution.

Alfalfa (*Medicago sativa*) is a perennial crop that accounts for 27% of national forage production. In Mexico, the area sown to alfalfa in 2018 was a bit more than 387,000 hectares with an average yield of green forage of 58.7 t ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> (SIAP, 2018). The states with the highest alfalfa production at the national level are Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Baja California, Sonora, Durango, Coahuila and Puebla, which together account for 70% of national production (Lara and Jurado, 2014). Alfalfa is an important crop in north-central Mexico, where the states of Aguascalientes, Durango (Los Llanos) and Zacatecas are located. Large variable-sized spots of dead alfalfa plants have been observed in most commercial plots, but there is little or no information about the organisms that cause crown rot or the extent of losses caused by the disease. Alfalfa crown rot is spread throughout the world. Several *Fusarium* species are among the fungi most commonly isolated from necrotic crowns and roots of alfalfa plants (Uddin and Knous, 1991); in Sudan, Ao *et al.* (2018) mention that *Fusarium*, *Rhizoctonia* and some *Pythium* species are present in alfalfa plots. On the other hand, in Mexico, Chew (2000) noted there was a high incidence of crown rot in alfalfa plots in the Comarca Lagunera (region of lagoons). In the Mexican state of Guanajuato, *F. incarnatum* was reported as being the causal agent of alfalfa root rot (Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Velásquez-Valle (2001) reported the presence of galls on the roots of alfalfa plants collected in Aguascalientes. Other studies have reported the presence of bulb nematodes (*Ditylenchus dipsaci*) on alfalfa leaf samples collected in the state of Jalisco (Rosas-Hernández *et al.*, 2017). Alfalfa productivity in this region could increase by



de alfalfa (Uddin y Knous, 1991); en Sudán, Ao *et al.* (2018) mencionaron la presencia de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y algunas especies de *Pythium* en parcelas de alfalfa. Por otra parte, en México Chew (2000) señaló la alta incidencia de la pudrición de la corona en las parcelas de alfalfa de la Comarca Lagunera. En el estado de Guanajuato se reportó a *F. incarnatum* como el agente causal de la pudrición de las raíces de alfalfa (Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Velásquez-Valle (2001) reportó la presencia de agallas en las raíces de plantas de alfalfa recolectadas en Aguascalientes. Otros estudios han revelado la presencia del nematodo de los bulbos (*Ditylenchus dipsaci*) en muestras foliares de alfalfa recolectadas en el estado de Jalisco (Rosas-Hernández *et al.*, 2017). La productividad del cultivo de alfalfa en esta región puede elevarse mediante la aplicación de medidas fitosanitarias que reduzcan el problema de pudrición de la corona; sin embargo, dichas medidas deben poseer un sólido fundamento en el conocimiento de los organismos potencialmente causales de esa enfermedad. El objetivo del trabajo consistió en identificar los géneros de microorganismos asociados con plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.

Entre enero y agosto de 2017 se recolectaron muestras de raíces de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona, así como suelo de alrededor de las plantas en 30 parcelas comerciales, de las cuales el 50, 30 y 20% se ubicaron en los estados de Zacatecas, Aguascalientes y Durango, respectivamente. En cada parcela se seleccionaron al azar tres plantas con poco crecimiento, follaje escaso y amarillo, frecuentemente con síntomas de marchitez. Las plantas se extrajeron con la mayor cantidad posible de raíces y se tomó una submuestra de suelo en cada una de ellas; el suelo obtenido alrededor de cada planta se mezcló para obtener la muestra compuesta representativa. La corona

implementing phytosanitary measures to reduce the crown rot problem. However, these measures must be solidly based on knowledge of the organisms that could be the potential causes of the disease. The objective of this study was to identify the genera of microorganisms associated with alfalfa plants presenting crown rot symptoms in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.

Between January and August 2017, samples of alfalfa roots with crown rot symptoms and of the soil surrounding the plants were collected from 30 commercial plots, of which 50, 30 and 20% were in Zacatecas, Aguascalientes and Durango, respectively. Three stunted plants with a few yellow leaves, most of them with wilt symptoms, were randomly collected from each plot. The plants were extracted with as many of the roots as possible, and a subsample of the soil surrounding each plant was taken; this soil was mixed together to obtain a representative compound sample. The crown of each plant was rinsed with tap water and tissue was taken from its center. The tissue was then disinfected and cultivated in Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). The Petri dishes were incubated at  $28 \pm 1$  °C in a bacteriological oven (Felisa, Mod. FE 131) for three or four days. The genera of the resulting colonies of fungi or oomycetes were identified using the taxonomical keys of Barnett (1967) and Watanabe (1994). To extract thread-like nematodes, each soil sample was homogenized and then a 50-g subsample of each was taken and placed in a Baermann funnel, according to the methodology proposed by Cepeda (1995). The genera of the recovered nematodes were identified using the taxonomic keys and information provided by Mai and Mullin (1996), Kanzaki and Giblin-Davis (2012) and Castillo *et al.* (2012). The roots were examined to detect galls caused by the *Meloidogyne* nematode.

de cada planta se enjuagó en agua corriente y se obtuvo el tejido de la parte central, se desinfectó y sembró en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Las cajas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  en una estufa bacteriológica (Felisa, Mod. FE 131) por tres a cuatro días. Las colonias de hongos u oomicetos resultantes se identificaron a nivel género con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett (1967) y Watanabe (1994). Para la extracción de nematodos filiformes, cada muestra de suelo se homogenizó y se obtuvo una submuestra de 50 g que se colocó en un embudo de Baermann por parcela comercial, de acuerdo con la metodología propuesta por Cepeda (1995). Los nematodos recuperados fueron identificados a nivel género utilizando las claves taxonómicas e información proporcionada por Mai y Mullin (1996), Kanzaki y Giblin-Davis (2012) y Castillo *et al.* (2012). Las raíces se examinaron en busca de agallas causadas por el nematodo *Meloidogyne*.

Los resultados mostraron que en las muestras de raíces se identificaron cinco géneros de hongos u oomicetos potencialmente fitopatógenos al cultivo (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*) y en el suelo se identificaron 13 géneros de nematodos fitoparásitos, depredadores y de vida libre (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*). Los nematodos más frecuentemente identificados fueron *Aphelenchus*, *Rhabditis* y *Dorylaimus*, (96.7, 73.3 y 70% respectivamente); por el contrario, *Criconemoides*, *Trichodorus* y *Xiphinema* fueron los menos frecuentes (3.3% en cada caso) (Cuadro 1).

Es importante señalar la presencia de *Ditylenchus* en aproximadamente 57% de las parcelas de alfalfa muestreadas en los tres estados; se debe

The results showed there were five genera of fungi or oomycetes on the root samples that are potentially phytopathogenic to the crop (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* and *Phytophthora*), while the results of soil samples showed 13 genera of phytoparasite, predator and free-living nematodes (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* and *Xiphinema*). The most frequently identified nematodes were *Aphelenchus*, *Rhabditis* and *Dorylaimus* (96.7, 73.3 and 70%, respectively). In contrast, *Criconemoides*, *Trichodorus* and *Xiphinema* were identified the least frequently (3.3% in each case) (Table 1).

It should be noted that *Ditylenchus* was present in approximately 57% of the alfalfa plots sampled

**Cuadro 1. Frecuencia de detección de nematodos en la rizosfera de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en parcelas de Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.**

**Table 1. Frequency of nematode detection in the rhizosphere of alfalfa plants with crown rot symptoms in plots in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.**

| Género                 | Frecuencia de detección (%) | Distribución                                           |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>Aphelenchus</i>     | 96.7                        | AGS <sup>x</sup> , DGO <sup>y</sup> , ZAC <sup>z</sup> |
| <i>Aphelenchoides</i>  | 13.3                        | DGO, ZAC                                               |
| <i>Criconemoides</i>   | 3.3                         | ZAC                                                    |
| <i>Ditylenchus</i>     | 56.7                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Dorylaimus</i>      | 70.0                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Helicotylenchus</i> | 6.6                         | AGS, DGO                                               |
| <i>Mononchus</i>       | 16.7                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Pratylenchus</i>    | 50.0                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Psilenchus</i>      | 6.6                         | AGS, ZAC                                               |
| <i>Rhabditis</i>       | 73.3                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Trichodorus</i>     | 3.3                         | AGS                                                    |
| <i>Tylenchus</i>       | 33.3                        | AGS, DGO, ZAC                                          |
| <i>Xiphinema</i>       | 3.3                         | ZAC                                                    |

<sup>x</sup> Aguascalientes, <sup>y</sup> Durango, <sup>z</sup> Zacatecas.

destacar un estudio realizado por Boelter *et al.* (1985) quienes indicaron la asociación de *D. dipsaci* con la muerte invernal de plantas de alfalfa y la reducción en el rendimiento de forraje, por lo que es posible que su daño al cultivo en esta región de México se confunda o subestime como efecto de bajas temperaturas invernales. Por otro lado, se debe resaltar su ausencia en los muestreos realizados por Chew (2000) en parcelas de alfalfa de la Comarca Lagunera. También Williams-Woodward y Gray (1999), así como Milano de Tomasel y McIntyre (2001) señalaron que es frecuente que las infestaciones por *D. dipsaci* en plantas de alfalfa ocurran en conjunto con las de *Aphelenchoides ritzemabosi*, tanto en suelo como en el follaje de alfalfa; en el actual trabajo se detectó la presencia simultánea de *Aphelenchoides* y *Ditylenchus* en las muestras de suelo provenientes de dos parcelas ubicadas en el sureste de Zacatecas; además se encontró a *Aphelenchoides* en otras dos parcelas en Durango, pero en estas no se detectó a *Ditylenchus*.

De acuerdo con Castillo *et al.* (2012), *Pratylenchus penetrans* se encuentra distribuido en el continente americano donde parasita más de 350 hospedantes incluyendo la alfalfa; los resultados del actual trabajo muestran que especímenes del género *Pratylenchus* se encontraron en las muestras de suelo del 50% de las parcelas de alfalfa muestreadas en los tres estados. De acuerdo con Chew (2000) este nematodo está presente en las parcelas de alfalfa de Coahuila y Durango. Mauza y Webster (1982) demostraron una interacción sinérgica entre poblaciones de *P. penetrans* y el hongo *Fusarium oxysporum* en plántulas de alfalfa, aunque *F. solani* no fue patogénico a las plántulas de alfalfa, en cambio, redujo las poblaciones de *P. penetrans*; es importante resaltar que en el actual estudio la presencia de *Fusarium* en el tejido de la corona de plantas de alfalfa, fue coincidente con la de *Pratylenchus* en las muestras de suelo, aunque esta información

in the three states, it is important to highlight a study conducted by Boelter *et al.* (1985), who indicated the association of *D. dipsaci* with the death in winter of alfalfa plants and reduced forage yield. Thus, it could be that the damage caused by the nematode in this region of Mexico is underestimated or mistaken for the effect of low winter temperatures. On the other hand, we should highlight that the nematode was not present in samplings conducted by Chew (2000) in alfalfa plots in the Comarca Lagunera. Williams-Woodward and Gray (1999), and Milano de Tomasel and McIntyre (2001) also pointed out that *D. dipsaci* infestations frequently occur in conjunction with *Aphelenchoides ritzemabosi*, both in the soil and on alfalfa foliage. In the present study, we detected the simultaneous presence of *Aphelenchoides* and *Ditylenchus* in soil samples taken from two alfalfa plots in southeastern Zacatecas. *Aphelenchoides* was also found in two alfalfa plots in Durango, but not *Ditylenchus*.

According to Castillo *et al.* (2012), *Pratylenchus penetrans* is distributed all over the Americas, where it parasitizes more than 350 hosts, including alfalfa. The results of this study show that specimens of the *Pratylenchus* genus were found in 50% of the alfalfa plots sampled in the three states. According to Chew (2000), this nematode is present in alfalfa plots in Coahuila and Durango. Mauza and Webster (1982) demonstrated a synergistic interaction between *P. penetrans* and *Fusarium oxysporum* populations in alfalfa seedlings. Although *F. solani* was not pathogenic to alfalfa seedlings, it reduced *P. penetrans* populations. It is important to point out that in this study the presence of *Fusarium* in alfalfa plants' crown tissue coincided with the presence of *Pratylenchus* in the soil samples, though this information can be confirmed later by extracting nematodes from the crown tissue.

The *Aphelenchus* genus includes species considered to be biological control agents of fungal

puede confirmarse posteriormente mediante la extracción de nematodos del tejido de la corona.

El género *Aphelenchus* abarca especies consideradas como agentes de control biológico de microorganismos fungosos, así como especies fitopatógenas facultativas, aunque no se han reportado daños severos en especies de importancia agrícola (Kanzaki y Giblin-Davis, 2012). *Aphelenchus avenae* se encuentra ampliamente distribuida sobre rizomas, tubérculos, bulbos y raíces en descomposición; se le reportó en lesiones causadas por *Pythium arrhenomanes* en raíces de maíz (*Zea mays*), pero no sobre raíces sanas (Mai y Mullin, 1996). Es probable que la alta incidencia (96.7%) de este nematodo en el presente estudio se deba a la descomposición de los tejidos de la corona de la planta.

En una tercera parte de las muestras de suelo se encontraron especímenes pertenecientes a *Tylenchus*. Según Thorne (1961), los miembros de *Tylenchus* se encuentran entre los nematodos más frecuentemente hallados en la rizosfera, sin embargo, no han sido reportados como fitoparásitos, a excepción de *T. costatus*.

Se identificó un espécimen de *Xiphinema* en una parcela de alfalfa en Zacatecas; previamente se había señalado (Chew, 2000) su presencia en alfalfa en los estados de Coahuila y Durango; la incidencia de éste género en esta leguminosa ha sido mencionada también por Wojtowicz *et al.* (1982) en el estado de Pennsylvania, EU. *Trichodorus* fue detectado en una parcela de alfalfa en Aguascalientes; es importante indicar que Thorne (1961) había indicado que esta forrajera era un hospedante poco favorable para este nematodo.

No se detectaron agallas causadas por nematodos como *Meloidogyne*; este resultado coincide con el obtenido por Chew (2000) en parcelas con esta forrajera en la Comarca Lagunera, aunque un reporte previo hace referencia a la presencia de agallas por ese nematodo en una parcela de alfalfa en Aguascalientes (Velásquez-Valle, 2001).

microorganisms and facultative phytopathogenic species, although severe damage has not been reported on major agricultural species (Kanzaki and Giblin-Davis, 2012). *Aphelenchus avenae* is widely distributed on decaying rhizomes, tubers, bulbs and roots. It was found on lesions caused by *Pythium arrhenomanes* on maize roots (*Zea mays*) but not on healthy roots (Mai and Mullin, 1996). The high incidence of this nematode (96.7%) found in this study is probably due to the decaying tissues in the plant's crown.

In one third of soil samples, specimens belonging to *Tylenchus* were found. According to Thorne (1961), members of the *Tylenchus* family are among the nematodes most frequently found in the rhizosphere; however, except for *T. costatus*, they have not been reported as phytoparasites.

A *Xiphinema* specimen was identified in an alfalfa plot in Zacatecas; it had been previously reported (Chew, 2000) on alfalfa crops in the states of Coahuila and Durango. Wojtowicz *et al.* (1982) also reported the incidence of this genus on alfalfa in the state of Pennsylvania, USA. *Trichodorus* was detected in an alfalfa plot in Aguascalientes. It is important to mention that Thorne (1961) had indicated that alfalfa was not a good host of this nematode.

No galls caused by nematodes such as *Meloidogyne* were detected, and this result is in agreement with that obtained by Chew (2000) in alfalfa plots in the Comarca Lagunera. However, a previous report mentioned the presence of galls caused by this nematode in an alfalfa plot in Aguascalientes (Velásquez-Valle, 2001).

The alfalfa plants collected had scant foliage, most frequently a dull green to yellowish in color, and smaller in size than non-affected plants; other symptoms such as stunting and necrosis were observed as well. The crown of these plants had brown-to-black lesions frequently extending towards the root's vascular tissues, according to the syndrome described by Uddin and Knous (1991).



Las plantas de alfalfa recolectadas tenían escaso follaje, frecuentemente de color verde opaco a amarillo y de menor tamaño que el de plantas no afectadas, otros síntomas como enanismo y muerte de las plantas también fueron observados. La corona de estas plantas manifestaba lesiones de color café a negro que con frecuencia se extendían hacia los tejidos vasculares de la raíz en coincidencia con el síndrome descrito por Uddin y Knous (1991).

De estos síntomas se aislaron e identificaron cinco géneros de microorganismos; los hongos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium* así como los oomicetos *Phytophthora* y *Pythium* (Cuadro 2).

Es importante resaltar la elevada incidencia en las parcelas de alfalfa de cada estado y por ende, regional de los hongos *Fusarium* y *Rhizoctonia* asociados con la pudrición de la corona (Cuadro 2). Un grupo de especies de *Fusarium* han sido asociadas con la enfermedad: *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. roseum*, *F. oxysporum* entre otras (McKenzie y Davidson, 1975; Mauza y Webster, 1982; Esteban-Santiago *et al.*, 2016). Es necesario recordar que no todas las especies de *Fusarium* son patogénicas a la alfalfa (Mauza y Webster, 1982) por lo que es necesario continuar con los trabajos de identificación y patogenicidad que permitan definir el papel de este hongo en la pudrición de la corona de la alfalfa. Según Chew (2000) *Fusarium* sp. resultó el hongo

Based on these symptoms, five genera of microorganisms were isolated and identified: *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Verticillium* fungi, as well as *Phytophthora* and *Pythium* oomycetes (Table 2).

It is worth mentioning the high incidence of *Fusarium* and *Rhizoctonia* in alfalfa plots in each state, and consequently, at the regional level; these two fungi are associated with crown rot (Table 2). A group of *Fusarium* species has been associated with the disease: *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. roseum*, *F. oxysporum*, among others (McKenzie and Davidson, 1975; Mauza and Webster, 1982; Esteban-Santiago *et al.*, 2016). We need to keep in mind that not all the *Fusarium* species are pathogenic to alfalfa (Mauza and Webster, 1982), so further identification and pathogenicity research needs to be done in order to define the role they play in alfalfa crown rot. According to Chew (2000), *Fusarium* sp. was the fungus most frequently found on alfalfa plants with crown rot symptoms in the Comarca Lagunera, which is in agreement with the results of this study.

*Rhizoctonia solani* has been reported to be the causal agent of the damping-off of alfalfa seedlings and of lesions at the base of alfalfa sprouts (Vincelli and Herr, 1992; Fowler *et al.*, 1999). In the Comarca Lagunera, Chew (2000) reported that

**Cuadro 2. Frecuencia de detección de hongos y oomicetos a partir de la corona de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en parcelas de Aguascalientes, Durango y Zacatecas, México.**

**Table 2. Frequency of fungi and oomycete detection on alfalfa plants with crown rot symptoms in plots in Aguascalientes, Durango and Zacatecas, Mexico.**

| Patógeno            | Frecuencia de aislamiento (%) |         |           |              |
|---------------------|-------------------------------|---------|-----------|--------------|
|                     | Aguascalientes                | Durango | Zacatecas | Norte centro |
| <i>Fusarium</i>     | 100                           | 100     | 100       | 100          |
| <i>Rhizoctonia</i>  | 88.9                          | 83.3    | 100       | 93.3         |
| <i>Verticillium</i> | 33.3                          | 16.7    | 66.7      | 46.7         |
| <i>Phytophthora</i> | 0.0                           | 0.0     | 13.3      | 6.7          |
| <i>Pythium</i>      | 83.3                          | 33.3    | 60.0      | 53.3         |



mayormente encontrado en plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona en la región de la Comarca Lagunera, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El hongo *Rhizoctonia solani* ha sido reportado como el agente causal del damping-off de plántulas de alfalfa y de lesiones en la parte basal de los brotes (Vincelli y Herr, 1992; Fowler *et al.*, 1999). En la Comarca Lagunera, Chew (2000) lo reportó con mayor frecuencia en plantas de alfalfa con pudrición de la corona, solamente superado por *Fusarium*.

Según Larkin *et al.* (1995) algunos microorganismos radiculares de la alfalfa como *Phytophthora* y *Pythium* han sido asociados con dificultades en el desarrollo y establecimiento de poblaciones de esta forrajera. *Phytophthora* se identificó en dos parcelas de alfalfa en los municipios de Calera y Luis Moya, Zacatecas. Algunas especies de *Phytophthora* han sido señaladas como patógenicas a alfalfa; la infección de raíces de alfalfa por *P. megasperma* redujo la tasa de desarrollo en plantas adultas y en infecciones severas provocó síntomas como follaje amarillo, marchitez y defoliación prematura (Marks y Mitchell, 1971). Por otro lado, la incidencia de *Pythium* en esta región resultó de 53.3% (Cuadro 2); una situación similar se reportó en Sudán (Ao *et al.*, 2018) donde la incidencia combinada de cuatro especies de *Pythium* alcanzó el 44%.

En conclusión, se identificaron 13 géneros de nematodos (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*) en la rizosfera de plantas de alfalfa con síntomas de pudrición de la corona; tres géneros de hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) y dos géneros de oomicetos (*Phytophthora* y *Pythium*) asociados a la pudrición de la corona de plantas de alfalfa.

after *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* was the fungus found most frequently on alfalfa plants with crown rot.

According to Larkin *et al.* (1995), some alfalfa root microorganisms, such as *Phytophthora* and *Pythium*, have been associated with limited development and establishment of alfalfa populations. *Phytophthora* was identified in two alfalfa plots in the municipalities of Calera and Luis Moya, Zacatecas. Some *Phytophthora* species have been classified as pathogenic to alfalfa. For example, alfalfa roots infected by *P. megasperma* reduced the development rate in adult plants, and severe infections caused symptoms such as yellow foliage, wilting and premature defoliation (Marks and Mitchell, 1971). On the other hand, the incidence of *Pythium* in the region was 53.3% (Table 2). A similar situation was reported in Sudan (Ao *et al.*, 2018), where the combined incidence of four *Pythium* species reached 44%.

In conclusion, 13 genera of nematodes were identified (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rhabditis*, *Trichodorus*, *Tylenchus* and *Xiphinema*) in the rhizosphere of alfalfa plants with crown rot symptoms; three genera of fungi (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*) and two of oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) were associated with crown rot on alfalfa plants.

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

LITERATURA CITADA

Ao S, Bucciarelli B, Dornbusch MR, Miller SS, and Samac DA. 2018. First report of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed

- rot, seedling root rot, and damping-off caused by *Pythium* spp. in Sudanese soil. *Plant Disease* 102:1043. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-17-1411-PDN>
- Barnett HL. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. Second Edition. Burgess Publishing Company. 225 p.
- Boelter HR, Gray AF, and Delaney HR. 1985. Effect of *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa mortality, winterkill, and yield. *Journal of Nematology* 17:140-144. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618429/>
- Castillo P, Stanley J, Inserra RN, and Manzanilla-López RH. 2012. Pratylenchidae-the lesión nematodes. Pp. 411-478. In: *Practical Plant Nematology*. (Ed. by R.H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura. Guadalajara, Jalisco, México. 883 p.
- Cepeda SM. 1995. Prácticas de Nematología Agrícola. Primera edición. Editorial Trillas. 109 p.
- Chew MIY. 2000. Enfermedades de la alfalfa. In: *Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México*. Libro Técnico No. 2. Campo Experimental La Laguna – INIFAP. 102 p. Disponible en línea: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1938/produccionyutilizaciondelaalfalfaenlazonanortedemexico.pdf?sequence=1>
- Esteban-Santiago JM, Leyva-Mir SG, Royan IM, Camacho-Tapia M y Tovar-Pedraza JM. 2016. Identificación del agente causal de la pudrición de la raíz y hongos asociados a semilla de alfalfa (*Medicago sativa*) en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (Suplemento):S59. Disponible en línea: http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen_Poster_S342016.pdf
- Fowler MC, Miller-Garvin JE, Regulinski DP, and Viands DR. 1999. Association of alfalfa radicle length with *Rhizoctonia* damping off. *Crop Science* 39:659-661. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302918657>
- Kanzaki N. and Giblin-Davis RM. 2012. Aphelenchoidea. Pp. 161-208. In: *Practical Plant Nematology*. (Ed. by R.H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura. Guadalajara, Jalisco, México. 883 p.
- Lara MCR y Jurado GP. 2014. Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Sitio Experimental La Campana-INIFAP. Folleto Técnico Núm. 52. Chihuahua, Chih. México. 53 p. Disponible en línea: <https://www.producechihuahua.org/paqs/PT-0010Alfalfa.pdf>
- Larkin RP, English JT, and Mihail JD. 1995. Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology* 85:430-435. <http://doi.org/10.1094/Phyto-85-430>
- Mai WF and Mullin PG. 1996. Plant-parasitic nematodes. Fifth Edition. A pictorial key to genera. Cornell University Press. 277 p.
- Marks GC and Mitchell JE. 1971. Penetration and infection of alfalfa roots by *Phytophthora megasperma* and the pathological anatomy of infected roots. *Canadian Journal of Botany* 49:63-67. Disponible en línea: <https://vdocuments.site/documents/penetration-and-infection-of-alfalfa-roots-by-phytophthora-megasperma.html>
- Mauza BE and Webster JM. 1982. Suppression of alfalfa growth by concomitant populations of *Pratylenchus penetrans* and two *Fusarium* species. *Journal of Nematology* 14:364-367. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618186/>
- McKenzie JS and Davidson JGN. 1975. Prevalence of alfalfa crown and root diseases in the Peace river region of Alberta and British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey* 55:121-125. Disponible en línea: [https://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol55/CPDS_Vol_55_No_4_\(121-125\)1975.pdf](https://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol55/CPDS_Vol_55_No_4_(121-125)1975.pdf)
- Milano de Tomasel MC and McIntyre GA. 2001. Distribution and biology of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa grown in Colorado. *Nematropica* 31:11-16. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/35224467_Distribution_and_biology_of_Ditylenchus_dipsaci_and_Aphelenchoides_ritzemabosi_in_alfalfa_grown_in_Colorado
- Rosas-Hernández L, Ramírez-Suarez A, Alcasio-Rangel S, López-Buenfil JA and Medina-Gómez E. 2017. Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev (Nematoda: Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:377-396. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-8
- SIAP. 2018. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap> (consulta, 22 de Julio de 2018).
- Thorne G. 1961. Principles of Nematology. McGraw-Hill Book Company, Inc. 553 p.
- Uddin W. and Knous TR. 1991. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada. *Plant Disease* 75:51-56. DOI: 10.1094/PD-75-0051
- Velásquez-Valle R. 2001. Geographic and host range of *Meiloidogyne* spp. in north central Mexico. *Plant Disease* 85:445. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.445A>
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 2001. Sintomatología y géneros de microorganismos asociados con las pudriciones de la raíz de Chile (*Capsicum annum* L.) en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219207.pdf>
- Vincelli PC and Herr LJ. 1992. Two diseases of alfalfa caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 and AG-4. *Plant Disease* 76:1283. DOI: 10.1094/PD-76-1283B
- Watanabe T. 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, Inc. 411 p.
- Williams-Woodward JL and Gray FA. 1999. Seasonal fluctuations of soil and tissue populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa. *Journal of Nematology* 31:27-36. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67032>
- Wojtowicz MR, Golden AM, Forer LB, and Stouffer RF. 1982. Morphological comparisons between *Xiphinema rivesi* Dalmaso and *X. americanum* Cobb populations from the Eastern United States. *Journal of Nematology* 14:511-516. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/65411/63079>

Antifungal property of honey on *in vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides*

Propiedad antifúngica de mieles sobre el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*

Víctor Albores-Flores*, Ivana Janet Marín-Saenz, José Alfonso López-García, Adriana Sánchez-Gutiérrez, Julieta Grajales-Conesa, Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino s/n. Colonia Solidaridad 2000. Tapachula Chiapas, CP. 30798, México. *Autor para correspondencia: alboresflores@gmail.com.

Recibido: 16 de Mayo, 2018.

Aceptado: 30 de Julio, 2018.

Albores-Flores V, Marín-Saenz IJ, López-García JA, Sánchez-Gutiérrez A, Grajales-Conesa J. 2018. Antifungal property of honey on *in vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 423-431.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1805-3

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 17, 2018.

Resumen. Aunado a la alta toxicidad de los productos químicos para el control fitosanitario de las enfermedades fúngicas a nivel de campo, el microorganismo causante de enfermedad no es completamente eliminado, por lo que, productos de origen natural tanto vegetal como animal han generado interés para el control de plagas y enfermedades en las plantas. El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antifúngica de mieles de abeja en el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum*

Abstract. In addition to the high toxicity of chemicals for phytosanitary control of fungal diseases in field conditions, the microorganism causing disease is not completely eliminated. Therefore, products of natural origin, both plant and animal, have generated interest for the control of pests and diseases in plants. Thus this study aimed to evaluate the antifungal activity of honey in the *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. Nine samples of honeys were evaluated, corresponding to three bees species: *Melipona solani*, *M. beecheii* and *Scaptotrigona mexicana*. We registered a decreased colony diameter of *C. gloeosporioides* at higher concentration of honey, with lower 40% growth of the colony compared to the control treatment within 12 days of incubation. In general, growth rate of the fungus colony in the three types of bee honey was in average, 40% lower than the control treatment. Inhibition rate value observed in bee honeys is 70% higher than that obtained with the fungicide Chlorothalonil®.

gloeosporioides. Se evaluaron nueve muestras de mieles, correspondientes a tres especies de abejas: *Melipona solani*, *M. beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*. Se encontró que el diámetro de la colonia de *C. gloeosporioides* fue menor a mayor concentración de miel, con un 40% menos crecimiento de la colonia respecto al tratamiento testigo a los 12 días de incubación. En general la tasa de crecimiento de la colonia del hongo en las mieles correspondientes a los tres tipos de abeja fue en promedio de 40% menos que el testigo. El valor de porcentaje de inhibición observada en las mieles de abeja fue 70% mayor a lo obtenido con el fungicida Clorotalonil.

Palabras clave: crecimiento micelial, *Melipona solani*, *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana*, Clorotalonil®.

En el presente siglo los productos utilizados en el control fitosanitario no contrarrestan el desarrollo de las enfermedades, radicando el problema en la baja eficiencia de penetración en la cutícula, la actividad del principio activo y la acumulación en el tejido de las plantas (Campa *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2017). Por lo cual, el desarrollo de productos alternativos con actividad antifúngica y que sean de naturaleza microbiana, vegetal o animal, son actualmente una opción y una realidad (Correa *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2016). Estudios recientes han identificado a la miel de las abejas como una alternativa en el control de hongos *in vitro*, siendo esta de origen natural derivado del proceso de transformación del néctar por las abejas (*Apis mellifera*).

La miel presenta una variedad de propiedades de interés nutracéutico (Ramalivhana *et al.*, 2014) además, de ser empleada como alternativa medicinal desde tiempos ancestrales (Vallianou *et al.*, 2014). Estudios recientes, han asociado las propiedades antimicrobianas a la concentración y composición de

Key words: mycelial growth, *Melipona solani*, *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana*, Clorotalonil®.

In this century, products used in the control of plant health do not counteract disease development, since they do not eradicate the problem due to the low efficiency of penetration into the cuticle, the activity of the active principle and the accumulation in plant tissue (Campa *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2017). Therefore, the development of alternative products with antifungal activity and of a microbial, plant or animal nature are currently an option and a reality (Correa *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2016). Recent studies have identified honey as an alternative in the control of fungi *in vitro*, since it has a natural origin, derived from the process of transformation of nectar by bees (*Apis mellifera*).

Honey presents a variety of nutraceutical properties (Ramalivhana *et al.*, 2014) and has also been used as a medicinal alternative for centuries (Vallianou *et al.*, 2014). Recent studies have found a relation between the anti-microbial properties and the concentration and composition of honey (Fangio *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2013). Its anti-fungal action has been observed against the fungal genera of *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* (Moussa *et al.*, 2012; Londoño-Orozco *et al.*, 2008; Montenegro *et al.*, 2009; Olaitan *et al.*, 2007). Thus the aim of the present study was to evaluate the antifungal activity of honey in the *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides*.

Honey samples

Honey samples were collected during February and March 2016, in meliponaries from the “Asociación de Meliponicultores del Soconusco

la miel (Fangio *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2013). La acción antifúngica se ha observado contra los géneros de hongos *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida* (Moussa *et al.*, 2012; Londoño-Orozco *et al.*, 2008; Montenegro *et al.*, 2009; Olaitan *et al.*, 2007). Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de las mieles de abeja en el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Muestras de mieles

Las muestras de mieles de abeja se colectaron en los meses de Febrero y Marzo del 2016, en meliponarios pertenecientes a la “Asociación de Meliponicultores del Soconusco S. C. del R. L.” en los municipios de la región del Soconusco, Chiapas: Tapachula, Tuxtla-Chico y Cacahoatán.

Se utilizaron nueve muestras de mieles, correspondientes a tres especies de abejas: *Melipona solani* (n=3, de los siguientes lugares: Trinidad (MsTa), San Jerónimo (MsSjb) e Izapa (Mslc)), *M. beecheii* (n=2, de los siguientes localidades: Tapachula (MbTa) y (MbTb) y de *Scaptotrigona mexicana* (n=4, de los siguientes lugares: Cacahoatán (Smca), Francisco y Madero (SmFMb), Izapa I (Smic), Izapa II (Smid)). Las mieles se recolectaron de tres cajas diferentes de los meliponarios, con la finalidad de contar con una miel compuesta por sitio, las cuales se extrajeron con jeringas estériles de 5 ml, y se guardaron en frascos debidamente etiquetados. Se almacenaron a -4 °C hasta su análisis.

Actividad antifúngica de las mieles.

La actividad antifúngica de las mieles de abejas se evaluó mediante enfrentamientos en laboratorio con una cepa de *C. gloeosporioides* perteneciente a la colección del Instituto de Biociencias de

S. C. del R. L.” in the municipal areas of the Soconusco, Chiapas: Tapachula, Tuxtla-Chico and Cacahoatán.

Nine honey samples were used from three bee species: *Melipona solani* (n=3, from Trinidad (MsTa), San Jerónimo (MsSjb) and Izapa (Mslc)), *M. beecheii* (n=2, from Tapachula (MbTa) and (MbTb) and *Scaptotrigona mexicana* (n=4, from Cacahoatán (Smca), Francisco y Madero (SmFMb), Izapa I (Smic), Izapa II (Smid)). The honey was collected from three different boxes in the meliponaries in order to obtain a mixed honey sample per site, which was taken using sterile 5 ml syringed, and it was stored in properly labelled jars. They were stored at -4 °C until their analysis.

Anti-fungal activity of honey

The anti-fungal activity of honey was evaluated by antagonizing it in the laboratory with a *C. gloeosporioides* strain from the collection of the Bioscience Institute of the Autonomous University of Chiapas. The strain was reactivated in a potato-dextrose-agar (PDA) medium without honey and a pH of 6.0. The biotrial was carried out with a PDA medium mixed with a honey solution, and for this, we prepared dishes with a volume of solution (in concentrations of 25, 50 and 100 % honey) of 100 µl for every 20 mL of medium. After the strain inoculation (0.5 cm culture discs), the Petri dishes were incubated at 32 °C for 12 days.

Mycelial growth was measured every third day using a Vernier (Stainless Hardebed®) with a capacity of 0-150 mm (minus the size of the inoculant disc).

The growth rate of every culture was determined with the following equation:

$$\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$$

la Universidad Autónoma de Chiapas. La cepa se reactivó en medio de agar papa dextrosa (PDA) sin miel y pH de 6.0. El bioensayo se realizó con medio PDA mezclado con solución de miel, para lo cual se elaboraron placas con un volumen de solución (en las concentraciones de: 25, 50 y 100% de miel) de 100 µl por cada 20 mL de medio. Posterior a la inoculación de la cepa (discos de colonia de 0.5 cm), las cajas Petri se incubaron a 32 °C en una estufa incubadora durante 12 días.

El crecimiento micelial se midió cada tercer día con un Vernier (Stainless Hardebed®) con capacidad de 0-150 mm (restando el tamaño del disco de inóculo).

La tasa de crecimiento de cada colonia, se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$$

donde: μ , fue la velocidad de crecimiento de la colonia, Db, fue el diámetro de la colonia (mm) en el tiempo “b”; Da, correspondió al diámetro de la colonia en el tiempo “a”, y “tb y ta” fueron el tiempo en que se realizó la evaluación.

Determinación de la actividad antifúngica como equivalentes equiparables a Clorotalonil®

La actividad antifúngica de las mieles, se transformó a equivalentes de Clorotalonil® (2, 4, 5, 6-tetrachloroisophthalonitrile), el cual es un fungicida químico comúnmente empleado para el control de *C. gloeosporioides*. Para ello, se determinó la inhibición (%) del crecimiento de este hongo mediado por el Clorotalonil® a través de la preparación de soluciones con las siguientes concentraciones: 0, 0.9, 1.8, 3.6, 5.4 y 7.2 mg ml⁻¹. Con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración (Figura 1).

where μ was growth rate of the culture, Db was the diameter of the culture (mm) in time “b”, Da was the diameter of the culture in time “a”; and “tb” and “ta” were the time in which the evaluation was carried out.

Determination of anti-fungal activity as equivalents comparable to Clorotalonil®

The anti-fungal activity of the honey was converted to equivalents of Chlorothalonil® (2, 4, 5, 6-tetrachloroisophthalonitrile), which is a chemical fungicide, commonly used in the control of *C. gloeosporioides*. For this, we determined the growth inhibition (%) of this fungus mediated by the Chlorothalonil® by preparing solutions with the concentrations 0, 0.9, 1.8, 3.6, 5.4 y 7.2 mg ml⁻¹. Using the data obtained, we created a calibration curve (Figure 1).

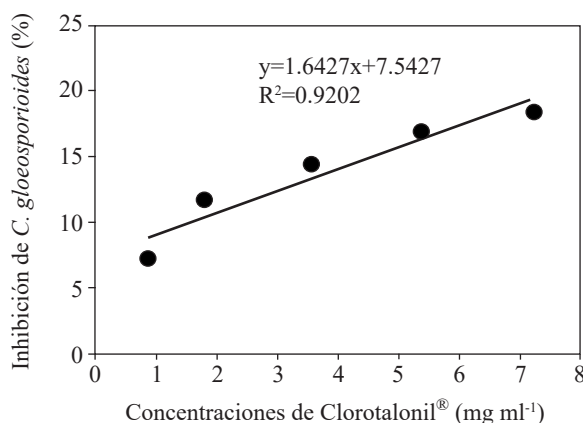


Figura 1. Relación entre la concentración de Clorotalonil® y el grado de inhibición del desarrollo de *C. gloeosporioides*.

Figure 1. Relation between the concentration of Clorotalonil® and the degree of inhibition of the development of *C. gloeosporioides*.

Análisis de resultados

Para analizar el diámetro de la colonia, la velocidad de crecimiento, inhibición del crecimiento y equivalentes de Clorotalonil, se realizó un análisis de varianza y posteriormente un contraste de medias por Tukey ($p < 0.05$). El programa estadístico utilizado fue Infostat 2015. Todos los tratamientos tuvieron nueve repeticiones.

En los tratamientos con miel, se encontró una relación entre la concentración de este compuesto y el tamaño alcanzado de la colonia del hongo ($r = -0.87$, $p < 0.05$), es decir, que el diámetro de la colonia fue menor a medida que aumentó la concentración de la miel. A partir del noveno día (Figura 2), en las concentraciones de 25 y 50% de miel, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en

Analysis of results

To analyze the diameter of the culture, its growth rate and inhibition, and equivalents of Chlorothalonil, an analysis of variance was carried out, followed by a mean comparison using Tukey's test ($p < 0.05$). The statistical program used was Infostat 2015. All treatments had nine repetitions.

In the treatments with honey, a relation was found between the honey concentration and the size reached by the fungal culture ($r = -0.87$, $p < 0.05$) i.e., the diameter of the culture decreased as the concentration of honey increased. Starting on day 9 (Figure 2), in the concentrations of 25 and 50% of honey, significant differences were observed ($p < 0.05$) in the diameter of the culture amongst the different types and concentration of honey applied.

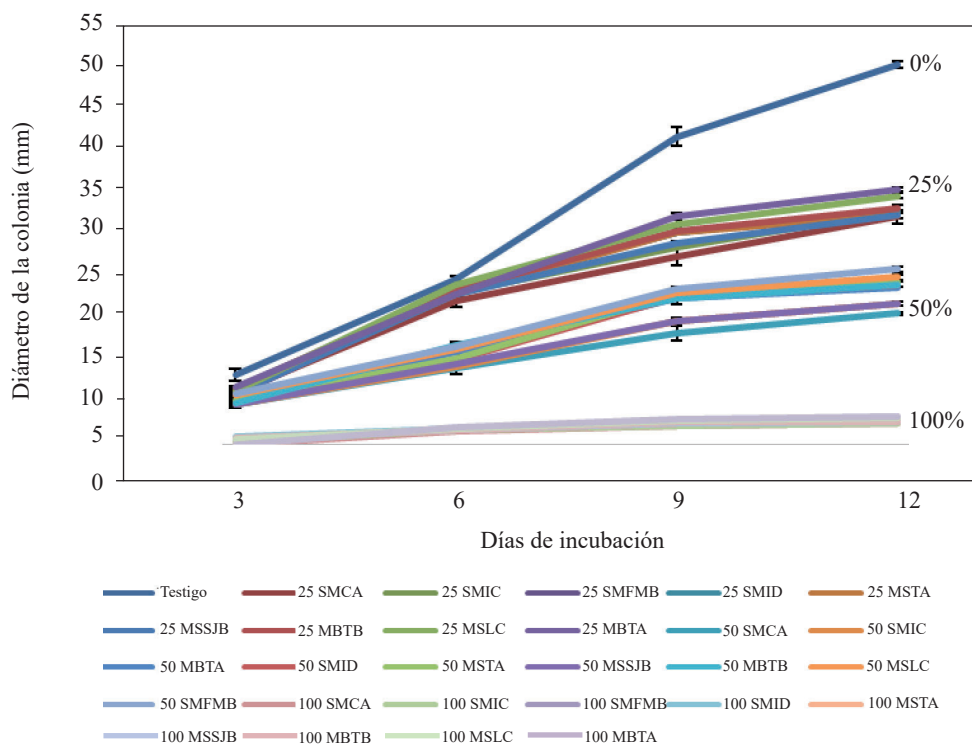


Figura 2. Cinética de crecimiento de *C. gloesporioides* en diferentes concentraciones de mieles de abeja (concentraciones de miel: 25%, 50% y 100%).

Figure 2. Growth kinetics of *C. gloesporioides* in different concentrations of honey (honey concentrations: 25%, 50% and 100%).

el diámetro de la colonia entre las mieles aplicadas. En promedio, el diámetro máximo alcanzado por la colonia del hongo independientemente del tipo de miel, fue de 31.1, 20.4 y 3.2 mm para las concentraciones 25, 50 y 100%, respectivamente, a diferencia del testigo, que fue de 50 mm (Figura 2).

La velocidad de crecimiento (μ) típica estuvo en el rango de 0.020 a 0.023 h^{-1} , con las concentraciones de miel de 25 y 50%, a diferencia del testigo que fue de 0.025 h^{-1} . A la concentración de 100% de miel, el rango fue de 0.004 h^{-1} a 0.008 h^{-1} . En general, la velocidad de crecimiento de la colonia de *C. gloeosporioides* en las mieles, fue 40% menos que en el testigo (Cuadro 1).

En la actividad inhibidora del desarrollo de la colonia de *C. gloeosporioides*, se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre las mieles de los diferentes tipos de abeja encontrando, que independientemente de la concentración de miel, las provenientes de *S. mexicana* (Smca y Smic) inhibieron en un 95.2% el desarrollo de la colonia de *C. gloeosporioides*, mientras que, la miel proveniente de *M. solani* (Mssjb, y Msta), *M. becheii* (Mbtb) y de *S. mexicana* (Smid y Smfmb) la acción inhibitoria fue de 94% a 95%. Las mieles con porcentajes menores de inhibición fueron *M. solani* (Mslc) y *M. becheii* (Mbta), con valores correspondientes de 93.87 y 93.53%, respectivamente. Aún así, la inhibición fue alta.

Por último, la actividad antifúngica de las mieles relacionadas en equivalentes de Chlorotalonil® (eC) estuvo también asociada a la concentración de miel ($r=0.98$, $p < 0.05$). La concentración máxima relacionada a eC con acción inhibitoria sobre *C. gloeosporioides*, la presentaron las mieles de *S. mexicana* (Smca y Smic) con valores de 62.5 mg ml^{-1} , 72.7 mg ml^{-1} y 62.5 mg ml^{-1} , 72.6 mg ml^{-1} , respectivamente.

El tiempo transcurrido para el crecimiento de la colonia de *C. gloeosporioides*, sin miel, fue de 12 días para alcanzar el diámetro interno de la caja Petri

On average, the maximum diameters reached by the fungal cultures, regardless of the honey type, were 31.1, 20.4 and 3.2 mm for concentrations 25, 50 and 100%, respectively, unlike the control, which was 50 mm (Figure 2).

Typical growth rate (μ) was in the range of 0.020 to 0.023 h^{-1} , with honey concentrations of 25 and 50%, unlike in the control, where it was 0.025 h^{-1} . At a concentration of 100% of honey, the range was between 0.004 h^{-1} and 0.008 h^{-1} . In general, the growth rate of the culture of *C. gloeosporioides* in honey was 40% less than in the control (Cuadro 1).

For inhibition activity of *C. gloeosporioides*, highly significant differences were found ($p < 0.0001$) between the honey from different bees, and it was also found that regardless of the concentration of honey, those coming from *S. mexicana* (Smca and Smic) inhibited the development of the *C. gloeosporioides* by 5.2%, while in honey from *M. solani* (Mssjb and Msta), *M. becheii* (Mbtb) and from *S. mexicana* (Smid and Smfmb) inhibition action was between 94% and 95%. The honey with the lowest inhibition values were *M. solani* (Mslc) and *M. becheii* (Mbta), with valued of 93.87 and 93.53%, respectively. However, inhibition was still high.

Finally the anti-fungal activity of the related honey in equivalents of Chlorotalonil® (eC) was also related to the concentration of honey ($r=0.98$, $p < 0.05$). The highest concentration related to eC with inhibition action on *C. gloeosporioides* was displayed by honey from *S. mexicana* (Smca and Smic) with values of 62.5 mg ml^{-1} , 72.7 mg ml^{-1} y 62.5 mg ml^{-1} , 72.6 mg ml^{-1} , respectively.

The time taken for the growth of the *C. gloeosporioides* culture without honey to reach the inner diameter of the Petri dish was 12 days (Figure 2). Unlike the treatments with honey, the growth of the control displayed a sigmoidal shape.

The reduction in mycelial growth of the fungus could be related to the bioactive components of

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de mieles de abeja sobre la velocidad de crecimiento e inhibición micelial de *C. gloeosporioides* y su comparación con equivalentes Clorotalonil®.**Table 1. Effect of the use of honey on the speed of growth and mycelial inhibition of *C. gloeosporioides* and its comparison with Clorotalonil® equivalents.**

| Tratamiento | Concentración (%) | Velocidad de crecimiento (h ⁻¹) | Inhibición micelial (%) | Equivalentes de Clorotalonil® (mg ml ⁻¹) |
|-------------|-------------------|---|-------------------------|--|
| Testigo | 0 | 0.025 a* | 0 | 0 |
| SMCA | 25 | 0.023 bc | 40.4 i* | 29.2 f* |
| | 50 | 0.020 e | 66.1 c | 44.8 b |
| | 100 | 0.006 h | 95.2 a** | 62.5 a** |
| SMIC | 25 | 0.023 bc | 39.0 jkl | 28.3 f |
| | 50 | 0.020 e | 63.6 d | 43.3 c |
| | 100 | 0.004 i | 95.2 a** | 62.5 a |
| SMFMB | 25 | 0.023 bc | 38.5 kl | 28.0 f |
| | 50 | 0.021 de** | 59.1 e | 40.5 d |
| | 100 | 0.007 g | 94.6 ab | 62.1 a** |
| SMID | 25 | 0.023 bc | 39.0 ijkl | 28.3 f |
| | 50 | 0.021 de** | 58.5 ef | 40.2 d |
| | 100 | 0.008 f | 94.4 ab | 62.1 a |
| MSTA | 25 | 0.024 b | 39.8 ijk | 28.8 f |
| | 50 | 0.021 de | 57.7 fg | 39.5 d |
| | 100 | 0.007 g | 94.0 ab | 61.8 a |
| MSSJB | 25 | 0.023 bc | 40.0 ij | 28.9 f |
| | 50 | 0.020 e | 63.4 d | 43.2 c |
| | 100 | 0.007 g | 94.6 ab | 62.2 a |
| MBTB | 25 | 0.024 b | 38.1 l | 27.8 f |
| | 50 | 0.021 de | 58.3 ef | 40.1 d |
| | 100 | 0.008 f | 94.7 ab | 62.2 a |
| MSLC | 25 | 0.024 b | 34.8 ll | 25.8 g |
| | 50 | 0.022 cd | 56.5 g | 38.9 d |
| | 100 | 0.007 g | 93.8 b | 61.7 a |
| MBTA | 25 | 0.024 b | 33.1 m | 24.7 g |
| | 50 | 0.022 cd | 54.3 h | 37.6 e |
| | 100 | 0.007 g | 93.5 b | 61.5 a |

*p≤0.05. **Letras iguales indican que no hay diferencia entre medias / *p≤0.05. **Same letters indicate no difference between averages.

(Figura 2). A diferencia de los tratamientos que tuvieron miel de abeja, el crecimiento del testigo presentó una forma sigmoideal.

La reducción en el desarrollo micelial del hongo podría asociarse con los componentes bioactivos de la miel, ya que resultados similares se reportaron en el desarrollo de colonias de los hongos *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp al incubarse en presencia de miel de *Apis* (Olaitan *et al.*, 2007). Lira (2003)

honey, since similar results were reported in the development of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp fungal cultures when incubated in the presence of *Apis* honey (Olaitan *et al.*, 2007). Lira (2003) and Jasso *et al.* (2007, 2011) coincided in that the inhibiting effect on the growth of the mycelium of pathogenic fungi for plants lies in the bioactive compounds of the biological products used, as in the case of plants.

y Jasso *et al.* (2007, 2011) coincidieron en que el efecto inhibitorio sobre el desarrollo del micelio de hongos fitopatógenos reside en los componentes bioactivos de los productos biológicos utilizados, tal es el caso de las plantas.

Las mieles de *Scaptotrigona* o *Melipona*, presentaron potencial para ser usado como producto con acción antifúngica al utilizar concentración de 500 μL de miel por cada 100 mL de solución, alcanzando un nivel de inhibición del 95.0%, comparado con los productos comerciales que pueden aplicarse en un amplio rango de concentraciones que van de 0.5 mg kg^{-1} a 500 mg kg^{-1} (Rodríguez *et al.*, 2008; Warnke *et al.*, 2009).

La acción antifúngica observada sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* en presencia de miel de abeja a diferentes concentraciones podría atribuirse a la concentración de fenoles, flavonoides y al valor de pH, los cuales han sido reportadas por Marín *et al.* (2017). La similitud estructural de estos compuestos contenidos en la miel con la reportada por las moléculas químicas comerciales utilizadas para el mismo fin (Pérez-Cárdenas *et al.*, 2013; Gregori, 2005) sugiere que el mecanismo de acción antifúngica observada en las mieles estudiadas en el presente trabajo, podría asociarse en la alteración de la división celular, la permeabilidad de las membranas celulares y el transporte intracelular en el micelio fúngico.

Las mieles de *Scaptotrigona* y *Melipona*, presentaron un potencial en el control del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Además, redujeron la velocidad de crecimiento micelial en un 95%, siendo 40% más eficientes que el fungicida comercial Clorotalonil®. El uso de la miel en el control de hongos patógenos de plantas, podría ser una alternativa de solución dentro de un manejo integrado.

Scaptotrigona or *Melipona* honey showed potential for use as a product with antifungal action when using a concentration of 500 μL of honey for every 100 mL of solution, reaching a level of inhibition of 95.0%, in comparison with commercial products that can be applied across a wide range of concentrations that range from 0.5 mg kg^{-1} to 500 mg kg^{-1} (Rodríguez *et al.*, 2008; Warnke *et al.*, 2009).

The anti-fungal action observed on *C. gloeosporioides* growth in the presence of honey at different concentrations could be due to the concentration of phenols, flavonoids and pH value, which have been reported by Marín *et al.* (2017). The structural similarity of these compounds found in the honey with that shown by the commercial chemical molecules used for the same purpose (Pérez-Cárdenas *et al.*, 2013; Gregori, 2005) suggests that the antifungal mechanism observed on the honey studied in this investigation could be associated with the alteration of cell division, the permeability of cell membranes and the intracellular transportation in the fungal mycelium.

Scaptotrigona and *Melipona* honey showed a potential for the control of the pathogenic fungus *C. gloeosporioides* and also reduces the mycelial growth rate by 95%, which makes it 40% more efficient than the commercial fungicide Clorotalonil®. The use of honey in the control of plant pathogenic fungi could be a solution alternative within a comprehensive management.

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



## LITERATURA CITADA

- Campa SP, Vallejo CS, Corrales MC, Martínez TMA y Vargas AI. 2017. Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:493-508. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1707-1>
- Correa NYM, Palomino GLR y Marino MO. 2015. Actividad antioxidante y antifúngica de piperaceas de la flora colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 20(2). Disponible en línea: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/125/122>
- Fangio M, Jurlina M and Fritz R. 2007. Antimicrobial activity of honey of south east province of Buenos Aires in front of *Escherichia coli*. *Revista Argentina de Microbiología* 39:120-123.
- Gregori VBS y Gregori V. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia* 39:15. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/237767583\\_Estructura\\_y\\_actividad\\_de\\_los\\_antifungicos](https://www.researchgate.net/publication/237767583_Estructura_y_actividad_de_los_antifungicos)
- Jasso RD, Hernández CD, Angulo SJL, Rodríguez GR, Villareal QJA and Lira SRH. 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Fluorensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products* 25:111-116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.08.007>
- Jasso RD, Rodríguez GR, Hernández CD, Aguilar GCN, Saénz GA, Villareal QJA and Moreno ZLE. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahua desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* 34:960-966. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- Lira SRH. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* (D. C.) Coville). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:214-222. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221217>
- Londoño OA, Penieres CJG, García TCG, Carrillo ML, Quintero MML, García VSE, Mendoza SMA y Cruz STA. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha* 21:49-55. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/267271152\\_Estudio\\_de\\_la\\_actividad\\_antifungica\\_de\\_un\\_extracto\\_de\\_propoleo\\_de\\_la\\_abeja\\_Apis\\_mellifera\\_proveniente\\_del\\_estado\\_de\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/267271152_Estudio_de_la_actividad_antifungica_de_un_extracto_de_propoleo_de_la_abeja_Apis_mellifera_proveniente_del_estado_de_Mexico)
- Marín SI, Torres de SR, Grajales CJ, Adriano AML y Albores FV. 2016. Actividad antimicrobiana de mieles de abeja sin aguijón en la region Soconusco, Chiapas, Mexico. Pp:741-743. *In: Reyes de LBO, Pérez AEJ, Arévalo DMA (eds.). Congreso Mesoamericano de Investigación UNACH. Chiapas, México. 653p.*
- Montenegro G, Salas F, Peña RC y Pizarro R. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de *Quillaja saponaria*, especie endémica de Chile. *Phyton*. 78:141-146. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572009000200010](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572009000200010)
- Moussa A, Nouredine D, Saad A, Abdelmelek A and Abdelkader B. 2012. Antifungal activity of four honeys of different types from Algerian honeys against pathogenic yeasts: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:554-557. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60096-3
- Olaitan P, Adeleke O and Ola I. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Science* 3:159-165. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2269714/>
- Pérez VL, Santana Y, García O, Lovaina Y, Pérez MM, Rodríguez JA y Avila R. 2017. Eficacia de fungicidas antioomicetes en la desinfección de hijos de piña MD2 para el control de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur. *Revista de Protección Vegetal* 32:1-13. Disponible en línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522017000200007&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200007&lng=es&nrm=iso)
- Pérez CJE, Hoyos ZAM y Cárdenas HC. 2013. Sensibilidad antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Caldas, Colombia). *Biosalud* 11:26-39. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v11n2/v11n2a04.pdf>
- Pimentel R, Da Costa C, Albuquerque M and Duvoisin J. 2013. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes* manausensis and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:1-13. DOI: 10.1186/1472-6882-13-151
- Ramalivhana JN, Obi CL, Samie A, Iweriebor BC, Uaboi EP, Idiaghe JE and Momba MNB. 2014. Antibacterial activity of honey and medicinal plant extracts against gram negative microorganisms. *African Journal Biotechnology* 13:616- 625. DOI: 10.5897/AJB11.892
- Ramírez GSI, López BO, Espinoza ZS y Wong VA. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:1879-1891. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/99/92>
- Rodríguez TJL, Alcázar FL, Cuesta I, Alastruey IA, Monzón A and Mellado E. 2008. Clinical relevance of resistance of antifungal. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32:111-113. DOI: 10.1016/S0924-8579(08)70010-4
- Vallianou G, Gounari P, Skourtis A, Panagos J and Kazazis C. 2014. Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant properties. *General Medicine* 2:132. DOI: 10.4172/2327-5146.1000132
- Warnker HK, Becker TS, Podschun R, Sivananthan H, Springer N, Russo P, Wiltfang A, Fickenscher H and Sherry E. 2009. The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as promising force to fight hospital-acquired infections. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 37:392-397. DOI: 10.1016/j.jems.2009.03.017

# Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico

## Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México

Cassandra Itzel Mata-Santoyo, Santos Gerardo Leyva-Mir, Moisés Camacho-Tapia, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carretera México-Texcoco Km 38.5, Texcoco, CP. 56230, Estado de México, México; Juan Manuel Tovar-Pedraza, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México; Julio Huerta-Espino, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco Km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, CP. 56250, Estado de México, México; Elizabeth García-León\*, Universidad Interserrana del estado de Puebla Ahuacatlán, Los Llanos Km 1 San Andrés Tlayehualancingo, CP. 73330, Ahuacatlán, Puebla, México. \*Autor para correspondencia: egarcialeon55@gmail.com.

Recibido: 16 de Marzo, 2018.

Aceptado: 19 de Julio, 2018.

Mata-Santoyo CI, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M, Tovar-Pedraza JM, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, García-León E. 2018. Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 432-443.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-3

Primera publicación DOI: 22 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 22, 2018.

**Resumen.** A partir de muestras de trigo de la variedad CIRNO C2008 con síntomas de tizón foliar y provenientes del Sur de Sonora, México, se obtuvieron cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* y cuatro de *Alternaria alternata*. Las especies fúngicas se identificaron mediante caracterización morfológica y análisis de secuencias ITS del DNA

**Abstract.** From samples of wheat cultivar CIRNO C2008 with leaf blight symptoms from southern Sonora, four isolates of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* were obtained. The fungal species were identified by morphological characterization and ITS sequence analysis of rDNA. Thirteen bread wheat (*Triticum aestivum*) and 6 durum wheat (*Triticum durum*) cultivars were inoculated with the eight fungal isolates under greenhouse conditions. The aggressiveness of the isolates was assessed using a severity scale of 1 to 9, with 1 being minimal lesions and 9 being necrosis and generalized chlorosis indicating susceptibility. Cultivars Vicam S70, Kronstad F2004, and Río Bravo C2016 were moderately resistant to *B. sorokiniana*; while Bárcenas S2002, Morocco, Borlaug 100 F2014, Bacanora T88, Luminaria F2012, the advanced line C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343,

ribosomal. En invernadero, se inocularon los ocho aislados en 13 variedades de trigo harinero (*Triticum aestivum*) y 6 de trigo cristalino (*Triticum durum*). La agresividad de los aislados se evaluó con una escala de severidad de 1 a 9, donde 1 fue lesiones mínimas y 9 necrosis y clorosis generalizada que indicó susceptibilidad. Las variedades Vicam S70, Kronstad F2004 y Río Bravo C2016 fueron moderadamente resistentes a *B. sorokiniana*; en contraste, Bárcenas S2002, Morocco, Borlaug 100 F2014, Bacanora T88, Luminaria F2012, la línea avanzada C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343, Nana F2007, Local red, Noio y la línea avanzada JC fueron altamente susceptibles. Adicionalmente, se observó que *A. alternata* es un patógeno secundario que invade las lesiones provocadas por *B. sorokiniana*.

**Palabras clave:** tizón foliar, mancha borrosa, patogenicidad, severidad.

El trigo (*Triticum* spp.) es el cereal más adaptado a las diferentes condiciones climatológicas en el mundo, junto con el maíz (*Zea mays*), y el arroz (*Oryza sativa*) proveen el 75% de los carbohidratos que requiere la alimentación humana. Sin embargo se estima que un 30% de la producción mundial de trigo es afectada por factores bióticos como las plagas y enfermedades que causan graves pérdidas en los rendimientos (Bockus *et al.*, 2010); dentro de sus principales enfermedades se encuentran las causadas por hongos que causan royas, carbonos, tizones foliares y pudriciones radicales (Zillinsky, 1984). Los tizones en trigo son enfermedades foliares que se distribuyen mundialmente y son particularmente agresivos cuando la humedad relativa es alta, la temperatura de 20 °C (Zillinsky, 1984), y una baja fertilidad del suelo (Duveiller y García-Altamirano, 2000).

Nana F2007, Local Red, Noio and JC advanced line were highly susceptible. Additionally, it was observed that *A. alternata* is a secondary pathogen that invades the lesions caused by *B. sorokiniana*.

**Key words:** leaf blight, spot blotch, pathogenicity, severity.

Wheat (*Triticum* spp.) is the cereal with the greatest adaptation to different weather conditions in the world. Along with maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*), it provides 75% of the carbohydrates required for human nutrition. However, it is estimated that around 30% of the world's wheat production is affected by biotic factors such as pests and diseases that cause important losses in yields (Bockus *et al.*, 2010); some of their most important diseases are caused by fungi that cause rust, smut, leaf blight and root rotting (Zillinsky, 1984).

Blights in wheat are diseases that spread across the globe and are particularly aggressive when relative humidity is high, the temperature is around 20 °C (Zillinsky, 1984), and soil fertility is low (Duveiller and García-Altamirano, 2000).

CIRNO C2008 is the main cultivar of durum wheat planted in the north of the country, due to its high yield, which has been over 8% higher than in the commercial cultivar Júpate C2001 (Figuroa *et al.*, 2010). However, it is starting to be replaced by the varieties Quetchehueca Oro C2013 (Fuentes-Dávila *et al.*, 2014) and Baroyeca Oro C2013 (Chávez Villalba *et al.*, 2015) due to its susceptibility to leaf rust and yellow rust.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016), reported *B. sorokiniana* as the causal agent of spot blotch in wheat in the Yaqui Valley, Sonora. However, in other areas of Mexico, Duveiller and Dubin (2002), reported as related to the same disease, fungi such as *Alternaria* spp. and *Pyrenophora tritici-repentis*.

CIRNO C2008, es la principal variedad de trigo cristalino sembrada en el norte del país debido a su alto rendimiento, el cual ha sido superior en 8% a la variedad comercial Júpare C2001 (Figueroa *et al.*, 2010). Sin embargo, está empezando a ser reemplazada con las variedades Quetcheueca Oro C2013 (Fuentes-Dávila *et al.*, 2014) y Baroyeca Oro C2013 (Chávez-Villalba *et al.*, 2015) debido a su susceptibilidad a la roya de la hoja y a la roya amarilla.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016), reportaron a *B. sorokiniana* como agente causal de la mancha borrosa en trigo en el Valle del Yaqui, Sonora. Sin embargo, en otras regiones de México Duveiller y Dubin (2002), reportaron asociados a la misma enfermedad a hongos como *Alternaria* spp. y *Pyrenophora tritici-repentis*.

La estrategia de control de enfermedades causadas por tizones, incluida la mancha borrosa, se basa en un enfoque integrado, donde la resistencia genética es un elemento importante. La resistencia a estas enfermedades por genotipos de alto rendimiento no es satisfactoria (Saari, 1998), se afirma que el tizón foliar es causado por al menos una especie de hongos del género *Alternaria*, pero se desconoce que especies están involucradas y si solo se trata de ese género. Por lo que se plantearon los siguientes objetivos: identificar el agente causal de la enfermedad en muestras provenientes del sur de Sonora y determinar la agresividad del o los patógenos en variedades comerciales y líneas avanzadas de trigo en condiciones de invernadero.

En los ciclos otoño-invierno 2014 y 2015, se recolectaron cincuenta muestras de trigo de la var. CIRNO C2008 en espigamiento y con síntomas de tizón foliar en campos agrícolas y experimentales del sur de Sonora, México. Los síntomas que exhibían las muestras recolectadas fueron: lesiones pequeñas y ovals de color marrón oscuro y con el centro color marrón claro, acompañadas de clorosis en etapas avanzadas (Dickson, 1956).

The strategy to control diseases such as blight, including spot blotch, is based on an integrated approach, where genetic resistance is an important element. Resistance to these diseases by high yielding genotypes is not satisfactory (Saari, 1998); leaf blight is said to be caused by at least one fungal species of the genus *Alternaria*, although what species are involved, or if it is only that genus, is unknown. Therefore, the following goals have been established: identifying the causal agent of the disease in samples from southern Sonora, and to determine the aggressiveness of the pathogen or pathogens in commercial cultivars and advanced wheat lines under greenhouse conditions.

In the 2014 and 2015 autumn-winter cycles, fifty samples were collected of the cv. CIRNO C2008 at heading stage with symptoms of leaf blight in agricultural and experimental fields in the south of the state of Sonora, Mexico. The symptoms displayed by the samples were small, dark maroon colored lesions with a light maroon center, along with chlorosis in advanced stages (Dickson, 1956).

Using a stereoscopic microscope, the tissue was searched for the presence of conidia and transferred to Petri dishes with a potato-dextrose-agar (PDA) medium (Difco®, France).

DNA extraction was performed using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, EE.UU.) using the method reported by the manufacturer. For this, the mycelium with 7 days of growth was carefully detached from a Petri dish, which was deposited in a sterile mortar and macerated with liquid nitrogen. For the PCR we used primers ITS5 and ITS4 (White *et al.*, 1990).

The four isolates of *B. sorokiniana* and the four *A. alternata* isolates were purified and increased, and the conidia were collected directly from the Petri dishes with mycelial growth by scraping with a spatula and adding distilled water. This conidia suspension was filtered through two layers of cheesecloth to eliminate fragments of the fungus



Con un microscopio estereoscópico se buscó la presencia de conidios en el tejido los cuales se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco®, Francia).

La extracción de DNA se realizó usando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, EE.UU.) mediante la metodología reportada por el fabricante. Para ello, se desprendió cuidadosamente el micelio de una caja Petri con crecimiento de 7 días, el cual se depositó en un mortero estéril y se maceró con nitrógeno líquido. Para la PCR se utilizaron los primers ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

Los cuatro aislados de *B. sorokiniana* y los cuatro de *A. alternata* se purificaron e incrementaron y los conidios se recolectaron directamente de las cajas Petri con crecimiento micelial mediante el raspado con una espátula y adición de agua destilada. Esta suspensión de conidios se filtró a través de dos capas de manta de cielo para eliminar fragmentos del hongo y de medio de cultivo, ajustándose a una concentración de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  usando un hematocitómetro, añadiendo además una gota de Tween 20® (Cardona y González, 2008).

Para las pruebas de patogenicidad se sembraron 19 variedades de trigo bajo un diseño experimental completamente al azar, y se tomó la segunda hoja en estado de plántula como base para la evaluación, dentro de las cuales fueron: 13 variedades de trigo harinero y 6 variedades de trigo cristalino. Por cada variedad se sembraron 5 semillas en sustrato esterilizado para evaluar 5 plántulas; se sembraron 8 repeticiones por cada clasificación (harineros y cristalinos) y 3 repeticiones por cada uno de los aislados fúngicos. El experimento se repitió dos veces bajo condiciones de invernadero.

La inoculación se realizó por aspersion de acuerdo a lo descrito por Singh *et al.* (1996) y fue en volúmenes iguales de suspensión de conidios de 15 mL por aislado directo a cada charola de germinación, las cuales posteriormente se trasladaron

and culture medium, adjusted to a concentration of  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  using a hemacytometer, also adding a drop of Tween 20® (Cardona and González, 2008).

For pathogenicity tests, 19 wheat cultivars were planted under a totally randomized experimental design, and the second leaf in a seedling stage was taken as a basis for the evaluation, within which there were 13 cultivars of bread wheat and 6 cultivars of durum wheat. For each cultivar, 5 seeds were planted in a sterilized substrate to evaluate 5 seedlings; 8 repetitions were planted for each classification (bread and durum) along with 3 repetitions for each one of the fungal isolates. The experiment was carried out twice under greenhouse conditions.

Inoculation was carried out by spraying, according to descriptions by Singh *et al.* (1996) and it was in equal volumes of 15 mL conidial suspension for every isolate directly to each germination tray, which were then transferred to a controlled environment incubation chamber with a relative humidity of 100%, with the aid of an ultrasonic HU-820A humidifier (Samsung Electronic®, Korea), and an average temperature of between 19 and 21 °C for 48 h. They were later transported to the greenhouse, where they were kept at a temperature that ranged between 21 and 30 °C for 15 days until signs and symptoms appeared.

Evaluations began five days after inoculation, requiring the use of the severity scale proposed by Perelló *et al.* (1998), where: 1 = free of infections to minimum spots; 2 = 1 to 5%; 3 = 5 to 12%; 4 = 12 to 20%; 5 = 20 to 35%; 6 = 35 to 45%; 7 = 45 to 60%; 8 = 60 to 80%; 9 = over 80% of the foliar area affected with necrosis and generalized chlorosis. The data were converted into percentages and underwent an ANOVA analysis of variance using the program SAS 9.1.3 (SAS Institute®, U.S.A.). In order to stratify the results,



a una cámara de incubación con ambiente controlado con humedad relativa de 100% con ayuda de un humidificador ultrasónico HU-820A (Samsung Electronic®, Corea) y temperatura media de 19 a 21 °C por 48 h. Después se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron hasta la aparición de síntomas y signos a una temperatura que osciló de 21 a 30 °C por 15 días.

Las evaluaciones se iniciaron cinco días después de la inoculación, para lo cual se utilizó la escala de severidad propuesta por Perelló *et al.* (1998) donde: 1 = libre de infección a mínimas manchas; 2 = 1 a 5%; 3 = 5 a 12%; 4 = 12 a 20%; 5 = 20 a 35%; 6 = 35 a 45%; 7 = 45 a 60%; 8 = 60 a 80%; 9 = más del 80% del área foliar afectada con necrosis y clorosis generalizada. Los datos se transformaron a porcentaje y se les realizó análisis de varianza ANOVA con el programa SAS 9.1.3 (SAS Institute®, EUA). Para estratificar los resultados se hizo comparación de medias de las variedades y aislados mediante la prueba de Fisher (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

En el tejido foliar se aislaron hongos anamorficos de los géneros *Bipolaris* y *Alternaria* debido a la forma de los conidios característicos que tiene cada uno de ellos y al tipo de germinación para el caso de *Bipolaris*.

Zillinsky (1984), Duveiller y García-Altamirano (2000), Sharma y Duveiller (2004), y Mehta (2014) coincidieron con que el único agente causal de la enfermedad conocida como “Spot blotch” es *Bipolaris sorokiniana*, sin embargo, en este estudio se detectó la presencia de *A. alternata*, que puede participar como saprófito o potenciador del daño. Singh *et al.* (1996) consideraron sólo a *Alternaria triticina* como el hongo patogénico asociado al tizón foliar. Mientras que Mehta (2014) afirmó que *A. alternata* se asocia a *B. sorokiniana* para provocar el síntoma de punta negra en el grano de trigo, el cual ocasiona el ennegrecimiento del embrión.

De los aislados obtenidos en este estudio, cuatro se identificaron como *B. sorokiniana* y cuatro como

the means were compared isolated using Fisher’s test (LSD) ( $P \leq 0.05$ ).

In the foliar tissue, we isolated anamorphic fungi of the genera *Bipolaris* and *Alternaria* due to the shape of the characteristic conidia that each one has, and to the type of germination for the case of *Bipolaris*.

Zillinsky (1984), Duveiller and García-Altamirano (2000), Sharma and Duveiller (2004), and Mehta (2014) coincided in that the only causal agent of the disease known as spot blotch is *Bipolaris sorokiniana*, although this study found the presence of *A. alternata*, which can participate as a saprophyte or damage enhancer. Singh *et al.* (1996) considered only *Alternaria triticina* as the pathogenic fungus related to leaf blight. Meanwhile, Mehta (2014) claimed that *A. alternata* is related to *B. sorokiniana* to promote the black dot symptom in wheat grain, which causes the blackening of the embryo.

Out of the isolates obtained in this study, four were identified as *B. sorokiniana* and four as *A. alternata*, according to the analysis of the ITS sequences of the ribosomal DNA. The comparison in the BLASTn of the sequences obtained with accession numbers MF036007–MF036010, showed an identity of 99 to 100% with other ITS sequences of *B. sorokiniana* deposited in the database of the GenBank. Meanwhile, the ITS sequences with an accession numbers of MF036011–MF036014 presented 100% of identity with the sequences deposited in the GenBank, which confirmed the result of the morphological identification of the fungal isolates.

Symptoms were clearly observed in inoculated seedlings with the *B. sorokiniana* isolates, where the disease reached levels of severity of 100% in some genotypes 13 days after inoculation. With this, we standardized temperatures for inoculation and development of the infection process of *B. sorokiniana* and *A. alternata* in the greenhouse,

*A. alternata* de acuerdo al análisis de las secuencias ITS del DNA ribosomal. La comparación en el BLASTn de las secuencias obtenidas con números de acceso MF036007–MF036010, mostraron de 99 a 100% de identidad con otras secuencias ITS de *B. sorokiniana* depositadas en la base de datos del GenBank. Entretanto, las secuencias ITS con número de acceso MF036011–MF036014 presentaron 100% de identidad con las secuencias depositadas en el GenBank, lo que confirmó el resultado de la identificación morfológica de los aislados fúngicos.

Los síntomas se observaron claramente en las plántulas inoculadas con los aislados de *B. sorokiniana*, donde la enfermedad alcanzó niveles de severidad del 100% en algunos genotipos a los 13 días después de la inoculación. Con esto, se estandarizaron las temperaturas para la inoculación y desarrollo del proceso de infección de *B. sorokiniana* y *A. alternata* en invernadero, las cuales fueron de 19 a 21 °C y humedad de 100% por 48 h.

En 2013, la precipitación pluvial en el sur de Sonora fue de baja a escasa por lo que la región es caracterizada como un clima seco y la enfermedad era considerada secundaria (INIFAP, 2016). En 2014 y 2015, la humedad relativa de la región fue alta (60 a 100%), por lo que la enfermedad se presentó de manera contundente (Villa-Rodríguez *et al.*, 2016). Por su parte, Dubin y Bimb (1994) señalaron que en las regiones donde el trigo se cultiva en condiciones de poca lluvia, *C. sativus* (anamorf: *B. sorokiniana*) no solo puede causar pudrición de la raíz, sino que también se transmite por semilla, enfermedad que es conocida como punta negra de los cereales. Por lo que el hongo muestra una gran capacidad de adaptación a las condiciones presentes en el sur de Sonora.

Se presentaron diferencias significativas entre los aislados evaluados. El aislado 3 de *B. sorokiniana* fue el más agresivo en comparación con el

which were between 19 and 21 °C with a humidity of 100% for 48 h.

In 2013, rainfall in southern Sonora ranged from low to scarce, and therefore the region has a characteristically dry weather, and the disease was considered secondary (INIFAP, 2016). In 2014 and 2015, the relative humidity of the region was high (60 to 100%), and therefore the disease was overwhelming (Villa-Rodríguez *et al.*, 2016). On the other hand, Dubin and Bimb (1994) pointed out that in regions in which wheat is grown under conditions of scarce rainfall, *C. sativus* (anamorph: *B. sorokiniana*) can not only cause rotting of the root but is also transmitted via the seeds, a disease known as black point in cereals. The fungus, therefore, displays a great ability to adapt to the conditions found in southern Sonora.

Significant differences were observed between the isolates evaluated. Isolate 3 of *B. sorokiniana* was the most aggressive than isolate 4. Meanwhile, isolates 1 and 2 were similar to each other (Table 1). This agrees with findings in studies by Zhong and Steffenson (2001), Chand *et al.* (2003), Ghazvini and Tekauz (2007), in which they indicated the variability of *B. sorokiniana* isolates due to the lack of clear virulence patterns. This leads to suppose that the natural populations could be the result of genetic exchange through the parasexual exchange in the fungus population (Maraite *et al.*, 1998; Duveiller and García-Altamirano, 2000).

Oliveira *et al.* (2002) and Gyawali *et al.* (2012) found high genetic variability between the *B. sorokiniana* isolates in studies using the random amplification of polymorphic DNA, or RAPD, which explains the difference between isolates 3 and 4, observing that isolate 3 caused higher percentages of severity, although there was a large difference between them, since they displayed an average severity of 75% by the isolate 3, and 40% by isolate 4. By contrast, Mann *et al.* (2014)

aislado 4. Mientras que los aislados 1 y 2 fueron similares entre sí (Cuadro 1). Lo anterior concuerda con lo obtenido en los estudios de Zhong y Steffenson (2001), Chand *et al.* (2003), Ghazvini y Tekauz (2007), donde indicaron la variabilidad de aislados de *B. sorokiniana* al no mostrar patrones de virulencia claros. Esto nos permite suponer que las poblaciones naturales podrían ser el resultado de intercambio genético a través de la recombinación parasexual en la población de hongos (Maraite *et al.*, 1998; Duveiller y García-Altamirano, 2000).

Oliveira *et al.* (2002) y Gyawali *et al.* (2012) encontraron variabilidad genética alta entre los aislados de *B. sorokiniana* en estudios usando la am-

reported a low variability between isolates that they evaluated and concluded that there have been no genetic changes in the population of the pathogen in the last 15 years. This could explain the behavior of isolates 1 and 2, which displayed less aggressiveness, with an average of 51 and 53%, respectively.

The four isolates of *B. sorokiniana* turned out to be pathogenic for the 19 wheat cultivars and they also showed statistically significant differences ( $P=0.0001$ ) in terms of aggressiveness. Likewise, under greenhouse conditions, it was possible to differentiate and select genotypes such as highly susceptible, susceptible, moderately

**Cuadro 1. Severidad de la infección de cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* en variedades de trigo harinero y cristalino.**

**Table 1. Severity of the infection of four *Bipolaris sorokiniana* isolates in bread and durum wheat cultivars.**

| Harineros          | Aislado 1            | Aislado 2    | Aislado 3  | Aislado 4  |
|--------------------|----------------------|--------------|------------|------------|
| Kronstad F2004     | 33 stuv <sup>x</sup> | 29 t         | 45 s       | 19.5 s     |
| Urbina S2007       | 58.2 lmnop           | 59.7 ghijklm | 92.5 abcde | 47.8 klmn  |
| Nana F2007         | 29 tuvwx             | 74 ab        | 91 bcde    | 52.5 cdefg |
| Villa Juárez F2009 | 64.5 efghij          | 54 ijklmn    | 94 abcd    | 27.5 opqr  |
| Borlaug 100 F2014  | 63.2 bcdefg          | 55 ijklmn    | 86.2 ab    | 46.5 ghij  |
| Línea avanzada C   | 66.5 defghi          | 64 cdefg     | 94.5 abcd  | 50 defgh   |
| PBW343             | 80 a                 | 72 abcde     | 92 bcde    | 54 abcde   |
| Bacanora T88       | 76 ba                | 73.5 abc     | 95 abc     | 53 cdef    |
| Morocco            | 57.5 jklmn           | 64.5 bcdefg  | 100 a      | 54.5 bcde  |
| Bárceñas S2002     | 65 efghij            | 77.5 a       | 100 a      | 58 bc      |
| Luminaria F2012    | 60 ghijkl            | 72.5 abcd    | 95 abc     | 61.5 b     |
| Maya S2007         | 69 fbdec             | 80 a         | 93.5 abcde | 69.5 a     |
| Vicam S70          | 26.5 uvwx            | 29.5 ts      | 33 t       | 21.6 rs    |
| Cristalinos        | Aislado 1            | Aislado 2    | Aislado 3  | Aislado 4  |
| CIRNO C2008        | 29 fgh               | 27.5 gf      | 68.5 f     | 24 f       |
| Conasist C2015     | 35 ef                | 34 ef        | 66 f       | 29 def     |
| Río bravo C2016    | 24.5 h               | 23.5 g       | 48.5 h     | 32.5 cde   |
| Línea avanzada JC  | 45.5 cd              | 48 cd        | 90 bc      | 43.5 b     |
| Local red          | 84 a                 | 79.5 a       | 100 a      | 60.5 a     |
| Noio               | 53.5 b               | 62 b         | 91.5 b     | 54.5 a     |

<sup>x</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes significativamente de acuerdo con la prueba LSD ( $P\leq 0.05$ ) / <sup>x</sup>Means with the same letter in each column are not significantly different, according to the LSD test ( $P\leq 0.05$ ).

plificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) con lo que se explica la diferencia entre los aislados 3 y 4, observándose que el aislado 3 causó mayores porcentajes de severidad, sin embargo, hubo una gran diferencia entre ellos, ya que mostraron una media de severidad de 75% en el aislado 3, y de 40% en el aislado 4. En contraste, Mann *et al.* (2014) reportaron una variabilidad baja entre los aislados que evaluaron y concluyeron que no hay cambios genéticos en la población del patógeno durante los últimos 15 años. Esto podría explicar el comportamiento de los aislados 1 y 2, los cuales mostraron menor agresividad con una media de 51 y 53%, respectivamente.

Los cuatro aislados de *B. sorokiniana* resultaron ser patogénicos para las 19 variedades de trigo, además que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.0001$ ) en cuanto a agresividad. Asimismo, bajo condiciones de invernadero se pudo diferenciar y seleccionar a los genotipos como: altamente susceptibles, susceptibles, moderadamente susceptibles y moderadamente resistentes. Sin embargo, las plantas inoculadas con *A. alternata* no mostraron diferencias estadísticas significativas, de tal forma que no se pudo caracterizar la severidad de la enfermedad en las distintas variedades de trigo evaluadas.

La evaluación en la presente investigación se realizó tomando como patrón los síntomas característicos de la enfermedad, los cuales son lesiones pequeñas marrón oscuro, de 1–2 mm de longitud, sin un margen clorótico. En los genotipos susceptibles, estas lesiones se extendieron rápidamente para formar manchas ovales alargadas de color marrón claro y oscuro que alcanzaron varios centímetros de longitud antes de la coalescencia resultando en la muerte del tejido. Se apreció una abundante producción de conidios en las lesiones viejas acompañadas de clorosis que se difunde desde el borde de la lesión, esto pudo deberse a la producción

susceptible and moderately resistant. However, plant inoculated with *A. alternata* did not display significant differences, and so it was not possible to characterize the severity of the disease in the different wheat cultivars evaluated.

The evaluation in this investigation was carried out taking as a pattern the characteristic symptoms of the disease, which are small, dark maroon lesions, 1 to 2 mm in length, without a chlorotic margin. In susceptible genotypes, these lesions extend quickly to form light and dark maroon, elongated, oval stains that reach up to several centimeters in length before coalescing, resulting in tissue death. Abundant conidia were produced in the old lesions, along with chlorosis that spreads from the edge of the lesion, which could be caused by the production of toxins, as stated by Mercado-Vergnes *et al.* (2006). These symptoms are produced depending on the type of host, although they coalesce in the same way, regardless of the genotype (Mercado-Vergnes *et al.*, 2006).

All cultivars displayed significant differences to the susceptibility of *B. sorokiniana*, although isolate 3 was observed to be the most aggressive. The resistant cultivars to isolate 3 could be considered in a future experiment on selection for resistance. Meanwhile, isolates 1, 2 and 4 had significant differences in severity with isolate 3.

Based on the Fetch and Steffenson scale (1999), cultivars are considered highly susceptible when their percentage is higher than 90%, establishing the cvs. Bárcenas S2002, Morocco, Bacanora T88, Luminaria F2012, advanced line C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343, and Nana F2007 in this range (Table 1).

No bread wheat cultivars were observed to be resistant to the evaluated isolates of *B. sorokiniana*, although the cvs. Vicam S70 and Kronstad F2004 behaved as moderately resistant. The remaining bread wheat cultivars were moderately susceptible

de toxinas como lo afirmó Mercado-Vergnes *et al.* (2006). Este tipo de síntomas se producen dependiendo del tipo de hospedante, pero llegan a coalescer de la misma forma, independientemente del genotipo (Mercado-Vergnes *et al.*, 2006).

Todas las variedades mostraron diferencias significativas a la susceptibilidad a *B. sorokiniana*, sin embargo, se observó que el aislado 3 fue el más agresivo. Las variedades resistentes al aislado 3 podrían ser consideradas posteriormente en un experimento de selección para resistencia. Entretanto los aislados 1, 2 y 4 tuvieron diferencias significativas de severidad en comparación con el aislado 3.

Con base en la escala de Fetch y Steffenson (1999), se considera a las variedades altamente susceptibles al tener un porcentaje mayor al 90%, estableciendo en este rango a las variedades de trigo harinero Bárcenas S2002, Morocco, Bacanora T88, Luminaria F2012, la línea avanzada C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343 y Nana F2007 (Cuadro 1).

No se observaron variedades de trigo harinero resistentes a los aislados evaluados de *B. sorokiniana*, sin embargo, las variedades Vicam S70 y Kronstad F2004, se comportaron como moderadamente resistentes. El resto de las variedades de trigo harinero fueron moderadamente susceptibles y susceptibles. Los resultados obtenidos se fundamentan con lo mencionado por Da Luz y Bergstrom (1986) y Duveiller y Dubin (2002), quienes observaron variaciones de la agresividad del patógeno y que estas no tienen relación con el genotipo evaluado.

En cuanto a los trigos cristalinos, las variedades altamente susceptibles fueron Local Red, Noio y la línea avanzada JC, mientras que Río Bravo C2016 se consideró como moderadamente resistente. De acuerdo a la escala de Fetch y Steffenson (1999), la variedad CIRNO C2008 se comportó como moderadamente susceptible a *B. sorokiniana*.

and susceptible. The results obtained are based on statements by Da Luz and Bergstrom (1986) and Duveiller and Dubin (2002), who observed variations in the aggressiveness of the pathogen and the fact that they have no relation with the genotype evaluated.

Regarding durum wheat, the cvs. Local Red, Noio and advanced line JC were highly susceptible, while Río Bravo C2016 was considered moderately resistant. According to the Fetch and Steffenson scale (1999), cv. CIRNO C2008 behaved as moderately susceptible to *B. sorokiniana*.

Cultivars Bárcenas S2002 and Morocco reached 100% severity for *Bipolaris sorokiniana*. The cultivar Borlaug 100 F2014 is resistant to leaf rust and yellow rust, as well as a moderate resistance to Karnal bunt and black point, including *B. sorokiniana* and *Alternaria* spp. (Mehta, 2014). According to Valenzuela-Herrera *et al.* (2012), the cv. Villa Juárez F2009 presents the same resistance as Borlaug 100 F2014, and it is considered moderately susceptible to the black point in grains. However, in this investigation, both cultivars were susceptible, showing maximum infection levels of 94 and 86%, respectively, to the infection by *B. sorokiniana*.

Solís-Moya *et al.* (2014) observed that the cvs. Luminaria F2012, Maya S2007 and Urbina S2007 are resistant to linear yellow rust and moderately resistant to leaf rust, although they do not mention resistance to blight, although in this study, these cultivars behave as susceptible to *B. sorokiniana*.

The cv. PBW343 is reported as moderately resistant to leaf rust and yellow rust, but susceptible to Ug99 stem rust and resistant to RTR stem rust in Mexico (Huerta-Espino and Singh, 2000), but in this investigation, it behaved as highly susceptible to *B. sorokiniana*.

The cv. Vicam S70 is considered resistant to spot blotch, but susceptible to yellow rust and leaf



Las variedades Bárcenas S2002 y Morocco alcanzaron el 100% de severidad a *Bipolaris sorokiniana*. La variedad Borlaug 100 F2014 posee resistencia a roya de la hoja y roya amarilla, además de tener una moderada resistencia al carbón parcial y a la punta negra dentro de las cuales se incluye a *B. sorokiniana* y *Alternaria* spp. (Mehta, 2014). Según Valenzuela-Herrera *et al.* (2012), la variedad Villa Juárez F2009 presenta la misma resistencia de Borlaug 100 F2014, y es considerada moderadamente susceptible a la punta negra del grano. Sin embargo, dentro de esta investigación ambas variedades fueron susceptibles mostrando niveles de infección máximos de 94 y 86% respectivamente a la infección por *B. sorokiniana*.

Solís-Moya *et al.* (2014) observaron que las variedades Luminaria F2012, Maya S2007 y Urbina S2007 son resistentes a la roya lineal amarilla y moderadamente resistentes a la roya de la hoja, pero no mencionaron la resistencia a tizones, aunque, en este estudio esas variedades se comportaron como susceptibles a *B. sorokiniana*.

La variedad PBW343 se reporta como moderadamente resistente a la roya de la hoja y roya amarilla, pero susceptible a la roya del tallo raza Ug99 y resistente a la raza RTR de roya del tallo en México (Huerta-Espino y Singh, 2000), pero en esta investigación se comportó como altamente susceptible a *B. sorokiniana*.

La variedad Vicam S70 es considerada como resistente a la mancha borrosa, pero susceptible a la roya amarilla y roya de la hoja, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este experimento, ya que su reacción fue de moderada resistencia a *B. sorokiniana*. Local red es considerada como susceptible a royas del trigo y es utilizado como progenitor en los programas de mejoramiento genético de trigo (Bárcenas-Santana *et al.*, 2016); Sustentando con esto a los resultados obtenidos y clasificando a Local Red como altamente susceptible a

rust, which coincides with the results obtained in this experiment, since its reaction was of moderate resistance to *B. sorokiniana*. Local red is considered susceptible to wheat rusts and was used as a parent in wheat breeding programs (Bárcenas-Santana *et al.*, 2016); this is based on the results obtained and classifying Local Red as highly susceptible to *B. Sorokiniana*. Likewise, the cultivar of durum wheat Noio used experimentally as susceptible to stem rust, but resistant to leaf rust and yellow rust; in this study it behaved as susceptible to *B. sorokiniana*. Within the resistance to *B. sorokiniana* in durum wheat, it was observed that advanced line JC is highly susceptible and Conasist C2015 is moderately resistant.

On the other hand, for the case of isolates of *A. alternata*, a variance analysis was not performed, since most of these had a low percentage of severity according to the scale used, which ranged between 1 and 5%, and were therefore considered as not significant.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016) claimed that variable temperatures with increases of +1 °C in the average temperature and a relative humidity of 60 to 100% in 2014 and 2015 were probably the main driving force behind the epidemic of spot blotch in wheat in southern Sonora.

This study found that the main causal agent of the spot blotch in wheat in southern Sonora was *Bipolaris sorokiniana*. Also, *Alternaria alternata* is a secondary fungus related to the development of the disease caused by *B. sorokiniana*; likewise, quantitative differences were observed in the aggressiveness of the four isolates of *Bipolaris sorokiniana* evaluated in this study.

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

B. sorokiniana, asimismo, la variedad de trigo duro Noio utilizada experimentalmente como susceptible a la roya del tallo, pero resistente a la roya de la hoja y roya amarilla en esta investigación se comportó susceptible a *B. sorokiniana*.

Dentro de la resistencia a *B. sorokiniana* en los trigos cristalinos se observó que la línea avanzada JC es altamente susceptible y Conasist C2015 moderadamente resistente.

Por otra parte, para el caso de los aislados de *A. alternata*, no se realizó un análisis de varianza debido a que la mayoría de estas tuvieron un porcentaje de severidad bajo según la escala utilizada, los cuales estuvieron entre 1 y 5%, considerándose como no significativos.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016) afirmaron que temperaturas variables con incrementos de +1 °C de la temperatura media y humedad relativa del 60 al 100% que se presentaron en 2014 y 2015, fueron probablemente las principales fuerzas impulsoras de la epidemia de mancha borrosa en trigo en el sur de Sonora.

Con el presente estudio se encontró que el principal agente causante de la mancha borrosa del trigo en el sur de Sonora fue *Bipolaris sorokiniana*. Además, *Alternaria alternata* es un hongo secundario asociado al desarrollo de la enfermedad causada por *B. sorokiniana*, de igual forma se observaron diferencias cuantitativas en la agresividad de los cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* evaluados en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Bárceñas SD, Huerta EJ, Sandoval IJS, Villaseñor MHE, Leyva MSG, Mariscal ALA y Michel AA. 2016. Genética de la resistencia a la roya del tallo en genotipos de trigo cristalino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39:379-384. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v39n4/0187-7380-rfm-39-04-00379.pdf>
- Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD and Smiley RW. 2010. Diseases caused by fungi and

fungus-like organisms. *In: Compendium of wheat diseases and pests*. P. 16-84. Disponible en línea: <https://issuu.com/scisoc/docs/43856>

- Cardona R, y González MS. 2008. Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo *Helminthosporium* asociados al cultivo de arroz en Venezuela. *Bioagro* 20:141-145. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/857/85720209.pdf>
- Chand R, Pandey SP, Singh HV, Kumar S and Joshi AK. 2003. Variability and its probable cause in natural populations of spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana* in wheat (*T. aestivum* L.) in *Indian Journal Plant Disease Protection* 110:27-35. Disponible en línea: <https://www.ulmer.de/artikel.dli>
- Chávez VG, Camacho CMA, Figueroa LP, Fuentes DG, Félix FJL y Villa ABA. 2015. Baroyeca Oro C2013: nueva variedad de trigo duro para su cultivo en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:421-425. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263138086017>
- Da Luz WC and Bergstrom GC. 1986. Effect of temperature on tan spot development in spring wheat cultivars differing in resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 8:451-454. <https://doi.org/10.1080/07060668609501786>
- Dickson JG. 1956. *Diseases of field crops*. McGraw-Hill Book Company. New York, USA. Toronto, Canada and London, England. 517 p. Disponible en línea: <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.214971>
- Dubin HJ and Bimb HP. 1994. Studies of soilborne diseases and foliar blights of wheat at the National Wheat Research Experiment Station, Bhairahawa, Nepal. *Wheat Special Report No. 36*. CIMMYT. DF, México. Disponible en línea: https://books.google.com.mx/books?id=wRUXQokNpZwC&printsec=frontcover&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Duveiller E and García AI. 2000. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. *Plant Pathology* 49:235-242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00443.x>
- Duveiller E and Dubin HJ. 2002. *Helminthosporium* leaf blights: Spot blotch and tan spot. *In: Curtis BC, Rajaram S, Gomez MH (eds), Bread Wheat: Improvement and Production, Plant Production and Protection*. Rome, Italy. FAO. 30:285-299. Disponible en línea: <http://repository.cimmyt.org:8080/xmlui/bitstream/handle/10883/1229/64956.pdf>
- Fetch TG and Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease* 83:213-117. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.213>
- Figueroa LP, Félix FJL, Fuentes DG, Valenzuela HV, Chávez VG and Mendoza LJA. 2010. CIRNO C2008, nueva variedad de trigo cristalino con alto rendimiento potencial para el estado de Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:745-749. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n5/v1n5a16.pdf>
- Fuentes DG, Figueroa LP, Camacho CMA, Chávez VG y Félix FJL. 2014. 'Quetchehueca Oro C2013', nueva variedad de trigo cristalino para el noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 399-401. Disponible en línea: <https://>

- www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/37-4/11a.pdf
- Ghazvini H and Tekauz A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease* 91:814-821. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0814>
- Gyawali S, Neate SM, Adhikari TB, Puri KD, Burlakoti RR and Zhong S. 2012. Genetic structure of *Cochliobolus sativus* populations sampled from root and leaves of barley and wheat in North Dakota. *Journal of Phytopathology* 160:637-646. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01956.x>
- INIFAP. 2016. México Estación Meteorológica Block-1201, Cajeme, Sonora. Disponible en línea: <http://clima.inifap.gob.mx/Inmysr/Historicos/Datos?Estado=25&Estacion=26858&Anio=2015&Mes=10> (consultado, octubre 2016)
- Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Van Der Sand ST. 2014. Genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates Using URP-PCR. *Tropical Plant Pathology* 39:163-171. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000200007>
- Maraite H, Zinno DT, Longree H, Daumerie V and Duveiller E. 1998. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A. (eds), Proceedings of the *Helminthosporium* Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot Workshop. El Batán, Mexico, Mexico, DF. CIMMYT. pp. 293-300. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1229/64956.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mehta YR. 2014. *Wheat Diseases and Their Management*. Springer International Publishing Switzerland, Instituto Agronómico de Paraná-IAPAR Londrina, Paraná, Brazil. 265 p. Disponible en línea: <https://www.springer.com/gb/book/9783319064642>
- Mercado VD, Renard ME, Duveiller E, Maraite H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55:485-493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01391.x>
- Oliveira AMR, Matsumura TS, Prestes AM and Van der Sand ST. 2002. Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Genetic and Molecular Research* 1:350-358. Disponible en línea: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol4-1/pdf/gmr0042.pdf>
- Perelló A, Sísterna MN and Cortese P. 1998. Scale for appraising the leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticimaculans*. *Cereal Research Communications* 26:2. Disponible en línea: https://www.jstor.org/stable/23785292?seq=1#page_scan_tab_contents
- Saari EE. 1998. Leaf blight diseases and associated soilborne fungal pathogens of wheat in South and Southeast Asia. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A, (Eds.). *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. Proceedings of an International Workshop Held at CIMMYT. El Batán, México. pp. 37-51. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?id=ISr137u-SAS> Institute. Inc. 2005. SAS Version 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sharma RC and Duveiller E. 2004. Effect of *Helminthosporium* leaf blight on performance of timely and late-seeded wheat under optimal and stressed levels of soil fertility and moisture. *Field Crops Research* 89: 205-218. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.02.002>
- Singh RV, Singh AK and Singh SP. 1996. Distribution of Pathogens Causing Foliar Blight of Wheat in India and Neighboring Countries. Department of Plant Pathology, N.D. University of Agriculture and Technology Kumarganj, Uttar Pradesh, India. pp. 59-62. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=ISr137u>
- Solis ME, Huerta EJ, Villaseñor MHE, Pérez HP, Ramírez RA, Ledesma RL y De La Cruz G M. 2014. Luminaria F2012, nueva variedad de trigo harinero para riego restringido en El Bajío. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:325-330. Disponible en línea: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/art%C3%ADculo_redalyc_263129784013.pdf
- Valenzuela HV, Fuentes DG, Figueroa LP, Chávez VG, Félix FJL y Mendoza LJA. 2012. Villa Juárez F2009, variedad de trigo harinero para el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:1447-1451. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000700014
- Villa RE, Lugo EC, De los Santos VS, Parra CFI and Figueroa LP. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in The Yaqui Valley, Mexico. *Plant Disease* 100:11, 2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetic. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). Academic Press, New York, USA. pp. 315-322. Disponible en línea: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhong S and Steffenson BJ. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91:469-476. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2001.91.5.469>
- Zillinsky FJ. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. México, D.F., México, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 141 p. Disponible en línea: <http://repository.cimmyt.org>

Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality

Efecto de *Trichoderma* spp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate

María Fernanda Ruiz-Cisneros, José de Jesús Ornelas-Paz, Guadalupe Isela Olivas-Orozco, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, David Roberto Sepúlveda-Ahumada, Daniel Alonso Pérez-Corral, Claudio Rios-Velasco*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo- CIAD; AC., Cuauhtémoc, C.P. 31570, Chihuahua, México; Miguel Ángel Salas-Marina, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas- UNICACH, Villacorzo, C.P. 29000, Chiapas, México; Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo- UMSNH, C.P. 58880, Michoacán, México. *Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 16 de Abril, 2018.

Aceptado: 16 de Agosto, 2018.

Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Pérez-Corral DA, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA, Fernández-Pavía SP. 2018. Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 444-456.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1804-5

Primera publicación DOI: 04 de Septiembre, 2018.

First DOI publication: September 04, 2018.

Resumen. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tres especies de *Trichoderma* cuando se aplican solas y cuando se confrontan con tres fitopatógenos, sobre el crecimiento y calidad del fruto de jitomate. El sustrato de las plantas se inoculó con *Trichoderma* spp. solas y en confrontación con *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*. En planta, se determinó la altura y peso, longitud y peso de raíces, contenido

Abstract. The objective of this study was to determine the effect of three *Trichoderma* species when applied alone and when are confronted with three phytopathogens on plant growth and tomato fruit quality. The substrate of the plants was inoculated with *Trichoderma* spp. alone and together in confrontation with *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*. In plant, the height and weight, length and weight of roots, total chlorophyll content in leaves, and yield were determined. Fruits were characterized by color, weight, size, total soluble solids (TSS), titratable acidity, firmness and bromatological composition. Plants inoculated with *Trichoderma* showed significant increases in most of the variables evaluated, where *T. longibrachiatum* significantly promoted the growth plants (height \geq 13%) and yield (14%), obtaining fruits with higher titratable acidity and lower TSS content. Pathogens decreased yield (23%). Diameter, firmness and protein content in fruits increased with the

total de clorofila en hojas y rendimiento. Los frutos se caracterizaron por color, peso, tamaño, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, firmeza y composición bromatológica. Las plantas inoculadas con *Trichoderma*, mostraron incrementos significativos en la mayoría de las variables de respuesta evaluadas, donde *T. longibrachiatum* promovió significativamente el crecimiento de la planta (altura $\geq 13\%$) y el rendimiento (14%), obteniendo frutos con mayor acidez titulable y menor contenido de SST. Los patógenos redujeron el rendimiento (23%). El diámetro, firmeza y contenido de proteína en frutos, se incrementó con la inoculación de *Trichoderma*. El color y fibra en frutos no resultaron afectados por los tratamientos. Las cepas de *Trichoderma*, mostraron potencial para mejorar la calidad del fruto.

Palabras clave: antagonistas, fitopatógenos, SST, firmeza, análisis bromatológico.

Las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicon* L.) son susceptibles a diversos patógenos, dentro de los cuales, destacan algunos hongos causantes de enfermedades que bloquean los haces vasculares de las plantas, evitando el flujo normal de agua y nutrientes, lo cual se refleja en un crecimiento reducido, baja producción de frutos, entre otros (Yadeta y Thomma, 2013; Shafique *et al.*, 2016). Los fungicidas químicos son los más usados para el control de estos patógenos con resultados satisfactorios, con algunas limitantes como la inducción del desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, muerte de microorganismos benéficos, contaminación de suelos agrícolas y otros efectos negativos (Shafique *et al.*, 2016). Para atender estas limitantes, se ha propuesto como método alternativo el control biológico, mediante el uso de hongos y bacterias antagonistas. En el grupo de los

inoculation of *Trichoderma*. Color and fiber in fruits were not affected by treatments. *Trichoderma* strains showed potential to improve fruit quality.

Key words: antagonists, phytopathogens, TSS, firmness, bromatological analysis.

Tomato plants (*Solanum lycopersicon* L.) are susceptible to diverse pathogens, among which some fungi stand out for their ability to cause diseases that block vascular bundles of the plants, preventing the normal flow of water and nutrients, which is reflected in reduced growth, low fruit production, among other (Yadeta and Thomma, 2013; Shafique *et al.*, 2016). Chemical fungicides are usually applied to control these pathogens with satisfactory results, with some limitations such as the development of pathogen-induced resistance, death of beneficial microorganisms, pollution of agricultural soils and other negative effects (Shafique *et al.*, 2016). To address these limitations, the use of antagonistic fungi and bacteria has been proposed as an alternative biological control method. Within the group of fungi, *Trichoderma* genus stands out due to its broad ecological plasticity, versatile metabolism, easy reproduction and antagonistic capacity (Sharma and Gothwal, 2017). Therefore, the use of *Trichoderma* strains could reduce the effects of diseases caused by multiple tomato phytopathogens when food sources are reduced by the competition for space and/or nutrients, production of antimicrobial compounds, direct parasitism and stimulation of plant defense mechanisms. *Trichoderma* strains also promote plants growth, improve fruit quality and crops yields through phytohormones production and promotion of the availability of phosphates and other minerals necessary for plants metabolism (Sharma and Gothwal, 2017). This

hongos destaca el género *Trichoderma*, debido a su amplia plasticidad ecológica, metabolismo versátil, adaptabilidad, fácil reproducción y capacidad antagonística (Sharma y Gothwal, 2017). Por lo que, mediante el uso de cepas de *Trichoderma* se podrían reducir los efectos de enfermedades causadas por múltiples fitopatógenos en jitomate, a través de la reducción de las fuentes de alimento por la competencia de espacio y/o nutrientes, producción de compuestos antimicrobianos, parasitismo directo y estimulación de los mecanismos de defensa de la planta. Adicionalmente, promueven el crecimiento de la planta, mejoran la calidad de frutos y potencializan el rendimiento en los cultivos mediante la producción de fitohormonas y promoción de la disponibilidad de fosfatos y otros minerales necesarios para el metabolismo de las plantas (Sharma y Gothwal, 2017). Razones por las cuales, algunas cepas de *Trichoderma* se utilizan como biofertilizantes y fitoestimuladores (Colla *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2017). Además, existen diversos estudios donde se han evaluado *in vitro* cepas de *Trichoderma* con excelentes resultados respecto a su capacidad antagonística y promoción del crecimiento de algunas variables agronómicas tales como sistema radicular, altura de planta, productividad, entre otras (Pelagio-Flores *et al.*, 2017). Sin embargo, hay pocos estudios, donde se analicen los potenciales efectos de estos microorganismos sobre la calidad del fruto y su capacidad para aminorar los efectos indirectos de hongos fitopatógenos hacia los frutos. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar el efecto de tres especies de *Trichoderma* cuando se aplican solas o cuando se confrontan con tres hongos fitopatógenos sobre el crecimiento y calidad del fruto de jitomate.

Se usaron tres especies de *Trichoderma*: *T. harzianum* (Th), *T. asperellum* (Ta), aislados de huertos de manzano de Chihuahua, México y *T. longibrachiatum* (Tl), una cepa aislada de suelo de

is the reason why some *Trichoderma* strains are used as biofertilizers and phytostimulants (Colla *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2017). Several studies have been conducted with excellent results to evaluate *Trichoderma* strains *in vitro* with excellent results regarding their capacity as antagonists and growth promoters of some agronomic variables such as root system, plant height, productivity, among other (Pelagio-Flores *et al.*, 2017). However, only a few studies have analyzed the potential effect of these microorganisms on fruit quality or their ability to reduce the indirect effects of phytopathogenic fungi on fruits. Therefore, the objective of the study was to determine the effect of three *Trichoderma* species on tomato growth and quality, when applied alone or confronted with three phytopathogenic fungi.

Three *Trichoderma* species were used: *T. harzianum* (Th) and *T. asperellum* (Ta) that were isolated from apple orchards in Chihuahua, Mexico, and *T. longibrachiatum* (Tl) and a strain isolated from soil in Brazilian soil, along with three phytopathogenic fungi: *Alternaria solani* (As), *Fusarium oxysporum* (Fo) and *Phytophthora infestans* (Pi) were isolated from tomato crops in Mexico. The pathogenicity of phytopathogenic fungi *in planta* and the antagonistic effect of *Trichoderma* species *in vitro* were confirmed by previous studies. Tomato seeds of cv. Merlice were purchased from DeRuiter™ (Monsanto Holland), and *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) pollinator from Koppert Mexico, S.A. de C.V., Querétaro, Mexico. The experiment was conducted in a greenhouse in Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico. The seeds were germinated on 200-cavity trays and then transplanted to black plastic bags containing a mixture of autoclaved substrate prepared using loamy soil: vermiculite (Termolita, S.A. de C.V., Nuevo León, Mexico): peat moss (Lambert Peat Moss Inc., Quebec, Canada) at a 1:1:1 ratio. Fertilizer was applied every 30 days

Brasil y tres hongos fitopatógenos: *Alternaria solani* (As), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Phytophthora infestans* (Pi), aislados de cultivos de jitomate, en México. La patogenicidad *in planta* de los fitopatógenos y el efecto antagonista *in vitro* de las especies de *Trichoderma* se confirmaron con estudios previos. Las semillas de jitomate cv. Merlice, se adquirieron de DeRuiter™ (Monsanto Holland) y los polinizadores *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae), de Koppert México, S.A. de C.V., Querétaro, México. El experimento se realizó en un invernadero en Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Las semillas de jitomate se germinaron en charolas de 200 cavidades y luego se trasladaron en bolsas negras de plástico que contenían una mezcla de sustrato autoclaveado, compuesta de suelo franco: vermiculita (Termolita, S.A. de C.V., Nuevo León, México): peat moss (Lambert Peat Moss Inc., Quebec, Canadá) en una proporción 1:1:1. Las plantas se fertilizaron cada 30 días después del trasplante (ddt), durante el ciclo de producción 2016. La polinización se llevó a cabo por una colmena de abejorros *Bombus terrestris*.

Los hongos (antagonistas y fitopatógenos) se crecieron por 5 d en caldo nutritivo (BD Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) y *Phytophthora infestans* en jugo de vegetales V8 (jugo V8, adicionado con CaCO₃ (3 g/L; Sigma-Aldrich). Los cultivos de los microorganismos se mantuvieron a 28 °C por 5 d en agitación constante (180 rpm). Los microorganismos se aplicaron individualmente al sustrato de 150 plántulas a los 8 ddt, bajo un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones (plantas) por cada tratamiento. Se aplicaron al sustrato, 3.9-7.8×10⁷ conidias del antagonista y 5.8-10.4×10⁷ conidias del fitopatógeno. Se usaron 30 plantas para monitorear los efectos de los antagonistas y 30 para patógenos (T2-T7; Cuadro 1), 90 plantas se usaron para las pruebas de confrontación entre antagonistas y patógenos (T8-T16;

after transplanting (ddt) during the 2016 production cycle. Pollination was achieved by a *Bombus terrestris* beehive hive.

Fungi (antagonistic and phytopathogens) were grown for 5 d in a nutrient broth (BD Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.), and *Phytophthora infestans* in V8 vegetable juice (V8 juice to which CaCO₃ was added (3 g/L; Sigma-Aldrich). The cultures of the microorganisms were maintained at 28 °C for 5 d in constant shaking (180 rpm). The microorganisms were individually applied to substrate of 150 seedlings at 8 ddt using a completely randomized design with 10 replications (plants) per treatment. Conidia of the antagonist (3.9-7.8×10⁷) and conidia of the phytopathogen (5.8-10.4×10⁷) were inoculated in the substrate. Thirty plants were used to monitor the antagonists effects and 30 plants for the pathogens effects, (T2-T7; Table 1), 90 plants for confrontation tests between antagonists and pathogens (T8-T16; Table 1) and 10 plants without inoculum as a control (T1; Table 1). In the confrontation treatments, the corresponding pathogen was applied at 18 ddt (10 d after inoculating the first antagonists). The levels of antagonists in the substrate were maintained with three inoculum applications at 20-day intervals. The plants were evaluated from April to October in the 2016 production cycle.

Chlorophyll was estimated in 10 leaves per plant, four times every 20 ddt, with a Spad 502DL Plus chlorophyll meter (Konica Minolta Brand, USA). At the end of the production cycle, plant height and weight (fresh and dry), root length and weight (fresh and dry) and stem diameter were evaluated. The number of fruits per plant was also recorded. Tomatoes were harvested at the red ripening stage of physiological maturity and stored at 4 °C for 3 d until they were analyzed. Fruits were evaluated for weight, diameter (polar and equatorial), color, total soluble solids (TSS; °Brix), titratable acidity and

Cuadro 1. Tratamientos y concentración (conidias/mL) de microorganismos inoculados en el sustrato de plantas de jitomate.

Table 1. Treatments and concentration (conidia/mL) of microorganisms inoculated in substrate of tomato plants.

| Código | Tratamiento ^x | | conidias/mL de los microorganismos: | |
|--|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| | Antagonistas | Fitopatógenos | Antagonistas | Fitopatógenos |
| T1 | Control | s/f | — | — |
| T2 | <i>Trichoderma asperellum</i> (Ta) | s/f | 2.9×10 ⁶ | — |
| T3 | <i>T. harzianum</i> (Th) | s/f | 3.9×10 ⁶ | — |
| T4 | <i>T. longibrachiatum</i> (Tl) | s/f | 5.2×10 ⁶ | — |
| T5 | s/a | <i>Fusarium oxysporum</i> (Fo) | — | 1.3×10 ⁶ |
| T6 | s/a | <i>Alternaria solani</i> (As) | — | 3.9×10 ⁶ |
| T7 | s/a | <i>Phytophthora infestans</i> (Pi) | — | 2.6×10 ⁶ |
| Juntos en confrontación (antagonistas vs patógenos) | | | | |
| T8 | <i>T. asperellum</i> | <i>F. oxysporum</i> | 2.9×10 ⁶ | 3.9×10 ⁶ |
| T9 | <i>T. asperellum</i> | <i>A. solani</i> | 2.9×10 ⁶ | 2.6×10 ⁶ |
| T10 | <i>T. asperellum</i> | <i>P. infestans</i> | 2.9×10 ⁶ | 1.3×10 ⁶ |
| T11 | <i>T. harzianum</i> | <i>F. oxysporum</i> | 3.9×10 ⁶ | 3.9×10 ⁶ |
| T12 | <i>T. harzianum</i> | <i>A. solani</i> | 3.9×10 ⁶ | 2.6×10 ⁶ |
| T13 | <i>T. harzianum</i> | <i>P. infestans</i> | 3.9×10 ⁶ | 1.3×10 ⁶ |
| T14 | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>F. oxysporum</i> | 5.2×10 ⁶ | 3.9×10 ⁶ |
| T15 | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>A. solani</i> | 5.2×10 ⁶ | 2.6×10 ⁶ |
| T16 | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>P. infestans</i> | 5.2×10 ⁶ | 1.3×10 ⁶ |

^x s/a: sin antagonistas; s/f: sin fitopatógenos / s/a: without antagonists; s/f: without phytopathogens.

Cuadro 1) y 10 plantas sin inóculo, como testigo (T1; Cuadro 1). En los tratamientos de confrontación se aplicó el patógeno correspondiente a los 18 ddt (10 d después de la primera inoculación de los antagonistas). Los niveles de los antagonistas en el sustrato se mantuvieron con tres aplicaciones de inóculo, a intervalos de 20 d. Las plantas se evaluaron de abril a octubre del ciclo de producción 2016.

La clorofila se estimó en 10 hojas por planta cuatro veces cada 20 ddt, usando un medidor de clorofila Spad 502DL Plus (Konica Minolta Brand, EUA). Al final del ciclo de producción, se evaluó la altura y peso (fresco y seco) de la planta, longitud y peso (fresco y seco) de raíz y diámetro de tallo. También se registró el número de frutos producido por planta. Los jitomates se cosecharon en el estado rojo de madurez fisiológica y se mantuvieron por 3 d a 4 °C hasta su análisis. Los frutos se

firmness. Color (L^* , a^* and b^*) was measured using a Minolta CR300 colorimeter. The °Brix values were determined using a PAL-1 digital refractometer (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan). The titratable acidity was expressed as the % of citric acid (NMX-F-102-S-1978) by taking 50 mL of tomato pulp diluted 25 times and tritrated with 0.1 N of NaOH, using 0.5% phenolphthalein as a color indicator. Firmness was evaluated using 50 tomatoes of each treatment, recording the maximum force (N), a puncture test was conducted using a Ta-XTPlus texture analyzer (Surrey, UK), starting at 30 cm/min and 15 cm distance. For the bromatological analysis, mashed tomato subsamples (from 1 to 10 g, depending on the parameter measured) were prepared using 20 tomatoes randomly taken from each treatment in order to measure moisture, ashes, protein ($N \times 6.25$), fat and total fiber, according to

evaluaron para peso, diámetro (polar y ecuatorial), color, sólidos solubles totales (SST; °Brix), acidez titulable y firmeza. El color (L^* , a^* y b^*) se midió usando un colorímetro Minolta CR300. Los valores de °Brix se determinaron usando un refractómetro digital PAL-1 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japón). La acidez titulable se expresó como % de ácido cítrico (NMX-F-102-S-1978), tomando 50 mL de pulpa de jitomate diluída 25 veces, titulada con 0.1 N de NaOH, usando fenolftaleína al 0.5% como indicador de color. Para la firmeza, se evaluaron 50 frutos de cada tratamiento, registrando la fuerza máxima (N) mediante una prueba de punción, usando un analizador de textura Ta-XTPlus (Surrey, RU), iniciando a 30 cm/min, a una distancia de 15 cm. Para el análisis bromatológico, se obtuvieron submuestras de puré (de 1 a 10 g, dependiendo de la determinación) a partir de 20 frutos tomados al azar de cada tratamiento y se sometieron a mediciones de humedad, cenizas, proteína ($N \times 6.25$), grasas y fibras totales, de acuerdo con los métodos oficiales (925.10, 923.03, 991.20 y 920.35) de la AOAC (2002).

El experimento constó de 16 tratamientos (Cuadro 1), cada uno con 10 plantas de jitomate, distribuidos mediante un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados usando el software SAS versión 9.0 para el análisis de varianza (ANVA) y la separación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ($p=0.05$). Las mediciones en frutos, se determinaron por triplicado y los datos obtenidos se sometieron a un ANVA y una prueba de separación de medias de Tukey ($p=0.05$), ambos se calcularon por separado.

Los tres aislados de *Trichoderma* promovieron el crecimiento vegetal en al menos una de las variables de respuesta evaluadas (Figuras 1 y 2), obteniendo el mayor peso fresco y seco en raíz (210.9 a 264.5 y 47.5 a 52.4 g, respectivamente) y longitud de raíz (Figura 1). *Trichoderma longibrachiatum*,

the official methods of analysis (925.10, 923.03, 991.20 and 920.35) of AOAC (2002).

The experiment included 16 treatments (Table 1) with 10 tomato plants each, arranged in a completely randomized design. Data were analyzed using the SAS version 9.0 program and then subjected to an analysis of variance (ANOVA) and media separation using Tukey's test ($p=0.05$). Fruit measurements were taken by triplicate, and the obtained data were subjected to an ANOVA and media separation using Tukey's test ($p=0.05$). Both were individually calculated.

The three *Trichoderma* isolates promoted plant growth in at least one of the evaluated response variables (Figures 1 and 2) and increased root fresh and dry weight (210.9 to 264.5, and 47.5 to 52.4 g, respectively) and root length (Figure 1). *Trichoderma longibrachiatum* showed the highest values for these variables and a significant increase in height (1.56 m, Figure 1) of 20 cm more than that of the controls. These results were in agreement with the existing literature (Pelagio-Flores *et al.*, 2017). These positive effects confirm *Trichoderma*'s capacity as a plant growth and root biomass promoter, which could be due to its capacity to solubilize phosphates, micronutrients and mineral cations important for plants metabolism (Tucci *et al.*, 2011). In contrast, when inoculated with *F. oxysporum*, *P. infestans* and *A. solani*, most of the phytopathogens exhibited less response variability (Figure 1), especially in plant height, since the plants were 14, 27 and 33 cm shorter than the control plants and also had shorter roots (28, 27 and 29 cm, respectively; Figure 1), while *Trichoderma* strains produced a positive effect on the stem diameter and enhanced chlorophyll accumulation in leaves. Like the rest of the treatments, except for those where *As* and *TlvsPi* were used, *Trichoderma* strains significantly increased yield (Figure 2). *Trichoderma longibrachitum* produced the highest

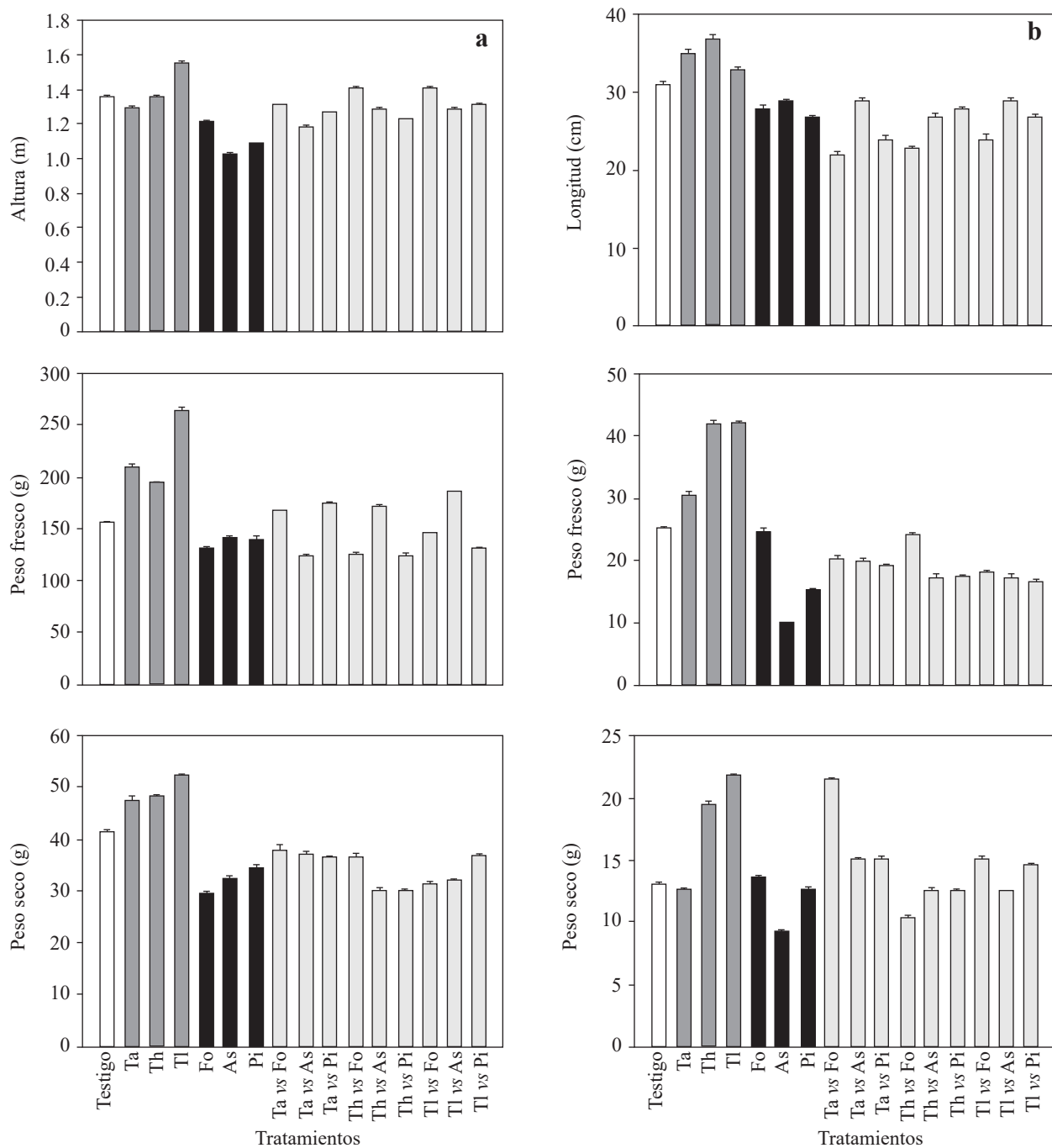


Figura 1. Variables de crecimiento (altura, longitud, peso fresco y seco) estimadas en plantas de jitomate cv. Merlice, influenciadas por la inoculación de especies de *Trichoderma* y microorganismos fitopatógenos solos y juntos en confrontación: a) plantas; b) raíces. Ta: *T. asperellum*; Th: *T. harzianum*, Tl: *T. longibrachiatum*, Fo: *F. oxysporum*, Pi: *P. infestans*, As: *A. solani*. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

Figure 1. Growth variables (height, length, fresh and dry weight) estimated in cv. Merlice tomato plants influenced by inoculation of *Trichoderma* species and phytopathogenic microorganisms, alone and together in confrontation: a) plants; b) roots. Ta: *T. asperellum*; Th: *T. harzianum*, Tl: *T. longibrachiatum*, Fo: *F. oxysporum*, Pi: *P. infestans*, As: *A. solani*. Data are shown as means \pm standard error.

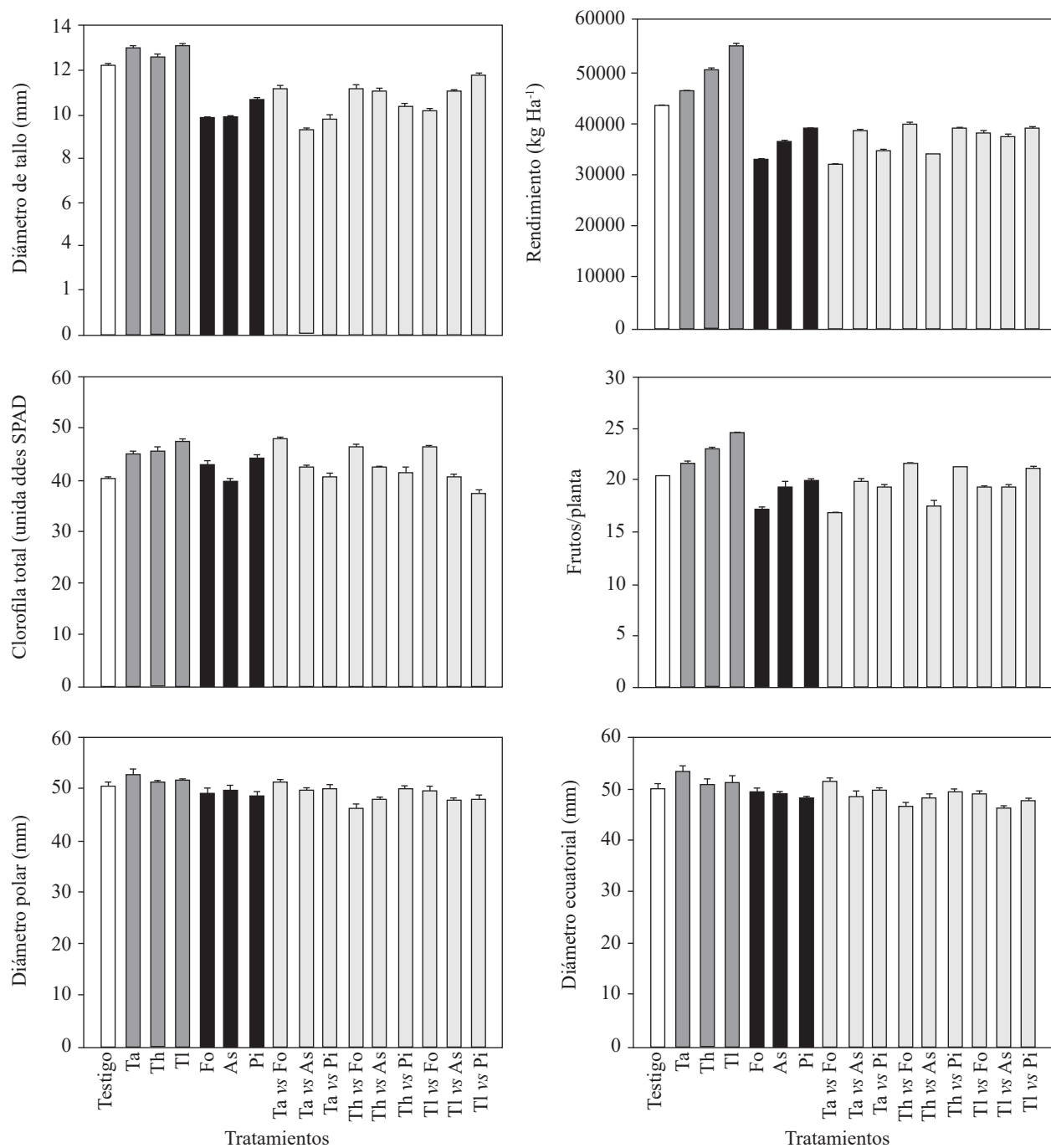


Figura 2. Variables agronómicas (diámetro de tallo, clorofila total, rendimiento, número de frutos) y diámetro (polar y ecuatorial) de frutos de plantas de jitomate cv. Merlice influenciados por la inoculación de especies de *Trichoderma* y microorganismos fitopatógenos solos y juntos en confrontación. Ta: *T. asperellum*; Th: *T. harzianum*, Tl: *T. longibrachiatum*, Fo: *F. oxysporum*, Pi: *P. infestans*, As: *A. solani*. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

Figure 2. Agronomic variables (stem diameter, total chlorophyll, yield, number of tomatoes) and diameter (polar and equatorial) of cv. Merlice tomato fruits influenced by inoculation of *Trichoderma* species and phytopathogenic microorganisms, alone and together in confrontation. Ta: *T. asperellum*; Th: *T. harzianum*, Tl: *T. longibrachiatum*, Fo: *F. oxysporum*, Pi: *P. infestans*, As: *A. solani*. Data are shown as means \pm standard error.

mostró los valores más altos en estas variables y un incremento significativo en la altura de la planta (1.56 m, Figura 1), con 20 cm más que las plantas testigo. Dichos resultados son consistentes con la literatura existente (Pelagio-Flores *et al.*, 2017). Estos efectos positivos, reafirman la capacidad de *Trichoderma* como promotor del crecimiento vegetal y biomasa radicular, lo cual pudiera deberse a su capacidad para solubilizar fosfatos, micronutrientes y cationes minerales útiles para el metabolismo de las plantas (Tucci *et al.*, 2011). Contrariamente, la mayoría de los fitopatógenos redujeron estas variables de respuesta (Figura 1). Principalmente en altura de la planta, siendo 14, 27 y 33 cm más bajos que las plantas testigo, respectivamente, al ser inoculados con *F. oxysporum*, *P. infestans* y *A. solani* y con las raíces más cortas (28, 27 y 29 cm, respectivamente; Figura 1). Las cepas de *Trichoderma* tuvieron un efecto positivo en el diámetro de tallo y promovieron la acumulación de clorofila en hojas. Al igual que el resto de los tratamientos, excepto para los tratamientos con *As* y *ThvsPi*. También, las cepas de *Trichoderma* incrementaron significativamente el rendimiento (Figura 2). *Trichoderma longibrachitum* mostró el mayor rendimiento con 240 g más por planta, que las plantas testigo. Esto pudo deberse a la capacidad que tiene este género para producir fitohormonas tales como auxinas, citocininas y giberelinas (Domínguez *et al.*, 2016). En particular el ácido indolacético (AIA) que estimula el crecimiento vegetal e incrementa el crecimiento radicular (Tucci *et al.*, 2011). Molla *et al.* (2012) demostraron que la aplicación de *Trichoderma* en plantas de jitomate, aumentó el rendimiento de frutos de 3 a 11%, resultados similares a los encontrados en nuestro estudio (8 a 27%) y consistentes con los reportados por Tucci *et al.* (2011) y Domínguez *et al.* (2016). En campo, se ha documentado el incremento de la productividad de cultivos hasta en 300% con la aplicación de *Trichoderma* (Khan *et*

yield with 240 g more per plant than the control plants. This could be due to the capacity of the genus to produce phytohormones such as auxins, cytokinins and gibberellins (Domínguez *et al.*, 2016), specially indoleacetic acid (IAA) that stimulates plant growth and increases root growth (Tucci *et al.*, 2011). Molla *et al.* (2012) demonstrated that when *Trichoderma* was inoculated in tomato plants, fruit yield increased 3-11%. These results are similar to the results of our study (8 to 27%) and are in agreement with those reported by Tucci *et al.* (2011) and Domínguez *et al.* (2016). In the field, crop productivity increases up to 300% have been documented when using *Trichoderma* (Khan *et al.*, 2017). The yield of plants treated with *F. oxysporum* and *A. solani* alone was significantly lower compared with that of the controls, except for *P. infestans*, and ranged between 33,000 and 39,000 kg Ha⁻¹, where plants treated with *F. oxysporum* had the lowest yields (200 g less than the control; Figure 2). For the rest of treatments (confrontations), the yields were lower than those of the control plants, except for *TavsFo*, *ThvsPi* and *ThvsPi* treatments, but varied among them (Figure 2). Fruits from plants treated with *Trichoderma* strains were larger than those from the plants of rest of the treatments (Figure 2). Plants inoculated with *T. asperellum* produced larger fruits. However, in some confrontation treatments no difference in size with respect to the control was observed. In contrast, plants inoculated with the pathogens alone and together in confrontation with *Trichoderma* strains produced small fruits. This could be due to a poor assimilation of nutrients as a result of the disease induced by the pathogens. On the other hand, the low density of the pathogen used in our study may have reduced the protective effect against pathogens on the tomato plants (Sharma and Gothwal, 2017).

al., 2017). El rendimiento en plantas tratadas con los fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. solani* solos, fue significativamente bajo en comparación con los testigos, excepto *P. infestans*, fluctuando de 33,000 a 39,000 kg Ha⁻¹, donde las plantas tratadas con *F. oxysporum* mostraron los rendimientos más bajos (200 g menos que el testigo; Figura 2). En el resto de los tratamientos (confrontaciones), los rendimientos fueron menores a las plantas testigo, excepto en los tratamientos *TavsFo*, *ThvsPi* y *TlvsPi*, pero variables entre sí (Figura 2). El tamaño de los frutos de plantas tratadas con las cepas de *Trichoderma* fue mayor que el resto de los tratamientos (Figura 2). Las plantas inoculadas con *T. asperellum* produjeron los frutos más grandes. Sin embargo, en algunos tratamientos de confrontación, no se observó diferencia en tamaño con respecto al testigo. En contraste, las plantas inoculadas con los patógenos solos y juntos en confrontación con las cepas de *Trichoderma*, produjeron frutos pequeños. Esto pudo deberse a una deficiente asimilación de nutrientes, como consecuencia de la enfermedad inducida por dichos patógenos. Por otra parte, las densidades bajas de antagonistas usadas en nuestro estudio, pudieron ser la causa del reducido efecto de protección de las plantas de jitomate frente a los patógenos (Sharma y Gothwal, 2017).

En general, los SST no mostraron una tendencia clara, donde los frutos cosechados de plantas inoculadas con cepas de *Trichoderma* mostraron el menor contenido de °Brix (3.5-4.0). Contrariamente, los frutos de plantas inoculadas con el patógeno *A. solani*, obtuvieron mayor contenido de SST (Cuadro 2), posiblemente debido a una mayor velocidad de hidrólisis de carbohidratos, lo cual puede tener implicaciones para los jitomates en su vida de anaquel en el mercado (Tigist *et al.*, 2013). Mientras que el incremento de la acidez titulable en frutos de plantas tratadas con *Trichoderma*, pudo deberse a su madurez y a la variabilidad en el peso, ya que

Overall, the TSS did not show a clear tendency, where the fruits harvested from plants inoculated with *Trichoderma* strains had the lowest °Brix content (3.5-4.0). By contrast, fruits of plants inoculated with *A. solani* had a higher TSS content (Table 2), possibly due to a faster rate of carbohydrate hydrolysis, a fact that may have implications for shelf life of tomatoes in the market (Tigist *et al.*, 2013), while the increase in titratable acidity of fruits from plants treated with *Trichoderma* may be due to maturity and weight variability, because fruits larger in size tend to become more acid (Tigist *et al.*, 2013). Fruit firmness ranged from 20.9 to 51.6 N. The application of *T. harzianum* increased fruit firmness 1.2 times compared with that of the control plants, which can be attributed to the induction of phytohormones biosynthesis when the plant's defense mechanisms were activated, mainly ethylene, a chemical compound responsible for the expression of plants maturity genes (Shafique *et al.*, 2016; Table 2). According to Colla *et al.* (2015), firm fruits are more resistant to microorganisms' attacks. In our study, the evaluated microorganisms did not modify the color of the fruit (Table 2).

The bromatological composition of the studied fruits was within the parameters reported in the literature (Pinela *et al.*, 2012). Fruits moisture content ranged from 96.3 to 98.9 %. Moisture of tomatoes from plants treated with *Trichoderma* was similar to that of the control. However, fruits from plants inoculated with the pathogens alone and in confrontation showed an increase in moisture content (Table 3). The high level of moisture content in plants inoculated with the phytopathogens alone and in confrontation may be due to water stress induced by the pathogens, which may have inhibited both plants and fruits normal transpiration (Yadeta and Thomma, 2013). The protein content ranged from 0.33 to 0.72 % (Table 3). Tomatoes from plants treated with *Trichoderma*

Cuadro 2. Sólidos solubles totales (°Brix), acidez titulable (% ácido cítrico), firmeza y color de frutos por los parámetros del Sistema CIELAB *L*, *a* y *b* de frutos de jitomate de plantas cv. Merlice influenciados por la inoculación de especies de *Trichoderma* y microorganismos fitopatógenos solos y juntos en confrontación.

Table 2. Total soluble solids (°Brix), titratable acidity (citric acid %), firmness and fruit color indicated by the CIELAB System parameters, *L*, *a* and *b* of fruits of cv. Merlice tomato plants, influenced by inoculation of *Trichoderma* species and phytopathogenic microorganisms, alone and together in confrontation.

| Código | Tratamiento | ^x SST (°Brix) | Acidez Titulable | Firmeza (N) | <i>L</i> | <i>a</i> | <i>b</i> |
|--|--|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| T1 | Testigo | 4.4 ± 0.1 ^{abc} | 0.34 ± 0.02 ^{ab} | 37.4 ± 0.4 ^{abcde} | 49.2 ± 1.2 ^a | 14.4 ± 0.9 ^{ab} | 19.2 ± 0.9 ^{ab} |
| T2 | <i>T. asperellum</i> | 3.5 ± 0.2 ^c | 0.41 ± 0.02 ^a | 28.2 ± 0.3 ^{bcde} | 48.8 ± 0.5 ^a | 15.2 ± 0.4 ^a | 18.8 ± 1.1 ^{ab} |
| T3 | <i>T. harzianum</i> | 3.7 ± 0.2 ^{bc} | 0.41 ± 0.01 ^a | 45.2 ± 0.4 ^{ab} | 49.4 ± 0.3 ^a | 14.5 ± 0.7 ^{ab} | 21.4 ± 0.8 ^a |
| T4 | <i>T. longibrachiatum</i> | 4.0 ± 0.2 ^{abc} | 0.40 ± 0.02 ^a | 20.9 ± 0.4 ^c | 50.4 ± 0.9 ^a | 14.7 ± 0.5 ^{ab} | 21.3 ± 1.3 ^a |
| T5 | <i>F. oxysporum</i> | 4.3 ± 0.3 ^{abc} | 0.24 ± 0.002 ^b | 23.3 ± 0.2 ^{cde} | 48.9 ± 0.8 ^a | 14.6 ± 0.7 ^{ab} | 20.2 ± 1.3 ^a |
| T6 | <i>A. solani</i> | 4.8 ± 0.3 ^a | 0.39 ± 0.02 ^a | 36.2 ± 0.3 ^{abcde} | 50.7 ± 0.7 ^a | 15.0 ± 0.9 ^{ab} | 22.5 ± 1.0 ^a |
| T7 | <i>P. infestans</i> | 4.5 ± 0.3 ^{ab} | 0.32 ± 0.04 ^{ab} | 51.6 ± 1.4 ^a | 49.1 ± 0.2 ^a | 14.5 ± 0.5 ^{ab} | 21.1 ± 1.5 ^a |
| Juntos en confrontación (antagonistas vs patógenos) | | | | | | | |
| T8 | <i>T. asperellum</i> vs <i>F. oxysporum</i> | 4.1 ± 0.3 ^{abc} | 0.32 ± 0.04 ^{ab} | 50.4 ± 1.2 ^a | 49.8 ± 0.9 ^a | 13.5 ± 1.4 ^{ab} | 19.0 ± 0.9 ^{ab} |
| T9 | <i>T. asperellum</i> vs <i>A. solani</i> | 4.5 ± 0.4 ^{ab} | 0.34 ± 0.04 ^{ab} | 44.7 ± 0.3 ^{ab} | 50.0 ± 1.0 ^a | 14.2 ± 0.6 ^{ab} | 21.0 ± 0.7 ^a |
| T10 | <i>T. asperellum</i> vs <i>P. infestans</i> | 4.2 ± 0.3 ^{abc} | 0.31 ± 0.01 ^{ab} | 39.2 ± 0.2 ^{abcd} | 49.3 ± 1.1 ^a | 14.5 ± 1.2 ^{ab} | 19.8 ± 1.4 ^{ab} |
| T11 | <i>T. harzianum</i> vs <i>F. oxysporum</i> | 4.2 ± 0.3 ^{abc} | 0.31 ± 0.04 ^{ab} | 20.4 ± 0.1 ^c | 49.5 ± 1.1 ^a | 14.1 ± 1.0 ^{ab} | 21.2 ± 1.2 ^a |
| T12 | <i>T. harzianum</i> vs <i>A. solani</i> | 4.4 ± 0.4 ^{abc} | 0.39 ± 0.02 ^a | 37.0 ± 0.3 ^{abcde} | 46.9 ± 1.0 ^{ab} | 15.8 ± 0.5 ^a | 18.9 ± 1.8 ^{ab} |
| T13 | <i>T. harzianum</i> vs <i>P. infestans</i> | 4.1 ± 0.5 ^{abc} | 0.34 ± 0.03 ^{ab} | 29.1 ± 0.4 ^{bcde} | 50.1 ± 1.2 ^a | 15.6 ± 1.6 ^a | 21.4 ± 1.2 ^a |
| T14 | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>F. oxysporum</i> | 4.5 ± 0.3 ^{ab} | 0.31 ± 0.03 ^{ab} | 21.6 ± 0.1 ^{cde} | 49.8 ± 1.0 ^a | 13.2 ± 0.6 ^{bc} | 21.6 ± 1.1 ^a |
| T15 | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>A. solani</i> | 3.9 ± 0.2 ^{abc} | 0.25 ± 0.02 ^b | 40.5 ± 0.7 ^{abc} | 40.8 ± 1.2 ^b | 11.4 ± 1.0 ^c | 17.8 ± 1.5 ^b |
| T16 | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>P. infestans</i> | 4.4 ± 0.1 ^{abc} | 0.39 ± 0.008 ^a | 32.5 ± 0.3 ^{bcde} | 50.6 ± 1.8 ^a | 14.7 ± 1.4 ^{ab} | 21.8 ± 0.7 ^a |

^xMedias con la misma literal entre columnas, son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.05$). ± Error estándar / Means with the same literal between columns are statistically equal, according to Tukey's test ($p=0.05$). ± standard error.

frutos de mayor tamaño, tienden a tener una mayor acidez (Tigist *et al.*, 2013). La firmeza en frutos fue variable, oscilando entre 20.9 y 51.6 N. La aplicación de *T. harzianum* incrementó la firmeza de los frutos por 1.2 veces, comparado con aquellos de las plantas testigo, lo que puede atribuirse a la inducción de la biosíntesis de fitohormonas, mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta, principalmente etileno, responsable de la expresión de genes de maduración en plantas (Shafique *et al.*, 2016; Cuadro 2). De acuerdo con Colla *et al.* (2015), los frutos firmes son más resistentes al ataque de microorganismos. En nuestro estudio, el color de los frutos no se vio modificado por los microorganismos evaluados (Cuadro 2).

La composición bromatológica de los frutos de nuestro estudio, se encuentra dentro de lo reportado

and the pathogens alone had higher protein content than those of the control plants. The tomato fat content ranged from 0.03 to 0.15 % (Table 3). This variable was lower in fruits from plants treated with *Trichoderma* and higher in fruits from plants treated with *F. oxysporum*. Regarding raw fiber, fruits from all the treatments had a similar content (1.2 a 1.8), with no significant differences (Table 3). Pinela *et al.* (2012) reported an ash content higher than the content found in our study, where 0.38 was the highest value, and a lower fat content ranging from 0.03 to 0.17 %, values that are similar to those of our study. The decrease of agronomic variables in plants and fruit quality parameters caused by the phytopathogens may be largely attributed to the deficient assimilation of nutrients by the diseased plants (Pusztahelyi *et al.*, 2015).

en la literatura (Pinela *et al.*, 2012). El contenido de humedad en los frutos fluctuó de 96.3 a 98.9 %. La humedad contenida en jitomates de plantas tratadas con *Trichoderma*, fue similar al testigo. Sin embargo, en frutos de plantas inoculadas con los patógenos solos y en confrontación, el contenido de humedad se vio incrementada (Cuadro 3). El alto contenido de humedad en plantas inoculadas con fitopatógenos solos y en confrontación pudo deberse al estrés hídrico en las plantas inducido por estos patógenos, que pudieron inhibir la transpiración normal de las plantas y frutos (Yadeta y Thomma, 2013). El contenido de proteína fluctuó de 0.33 a 0.72 % (Cuadro 3). Los jitomates de plantas tratadas con *Trichoderma* y patógenos solos, contenían más proteína que aquellos de las plantas testigo. El

The *Trichoderma* species used in this study had a positive effect on tomato plants because they improved height, biomass, chlorophyll, yield and fruit quality variables under greenhouse conditions. Based on these results, the evaluated *Trichoderma* strains would be a good alternative to promote plant growth and improve fruit quality attributes in horticultural crops.

ACKNOWLEDGMENTS

The author María Fernanda Ruiz Cisneros thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship awarded for her Doctorate in Science studies.

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

**Cuadro 3. Análisis bromatológico de jitomates cv. Merlice influenciados por la inoculación de especies de *Trichoderma* y microorganismos fitopatógenos solos y juntos en confrontación.**

**Table 3. Bromatological analysis of cv. Merlice tomatoes influenced by inoculation of *Trichoderma* species and phytopathogenic microorganisms, alone and together in confrontation.**

| Código                                                     | Tratamiento                                      | Humedad (%)              | Composición bromatológica (g/100 g pf) <sup>x</sup> |                             |                             |                         |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                                                            |                                                  |                          | Ceniza (%)                                          | Proteína (%)                | Grasa (Lípidos) (%)         | Fibra (%)               |
| T1                                                         | Testigo                                          | 96.8 ± 0.1 <sup>ab</sup> | 0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>                            | 0.35 ± 0.09 <sup>d</sup>    | 0.08 ± 0.001 <sup>bcd</sup> | 1.2 ± 0.01 <sup>a</sup> |
| T2                                                         | <i>T. asperellum</i>                             | 96.7 ± 0.1 <sup>ab</sup> | 0.03 ± 0.004 <sup>c</sup>                           | 0.43 ± 0.05 <sup>cd</sup>   | 0.06 ± 0.002 <sup>bcd</sup> | 1.6 ± 0.08 <sup>a</sup> |
| T3                                                         | <i>T. harzianum</i>                              | 96.3 ± 0.2 <sup>b</sup>  | 0.02 ± 0.004 <sup>c</sup>                           | 0.60 ± 0.1 <sup>abc</sup>   | 0.05 ± 0.008 <sup>bcd</sup> | 1.3 ± 0.06 <sup>a</sup> |
| T4                                                         | <i>T. longibrachiatum</i>                        | 96.8 ± 0.1 <sup>ab</sup> | 0.03 ± 0.003 <sup>c</sup>                           | 0.44 ± 0.07 <sup>cd</sup>   | 0.03 ± 0.005 <sup>d</sup>   | 1.6 ± 0.08 <sup>a</sup> |
| T5                                                         | <i>F. oxysporum</i>                              | 97.1 ± 0.3 <sup>ab</sup> | 0.38 ± 0.06 <sup>a</sup>                            | 0.70 ± 0.15 <sup>ab</sup>   | 0.15 ± 0.002 <sup>a</sup>   | 1.6 ± 0.05 <sup>a</sup> |
| T6                                                         | <i>A. solani</i>                                 | 97.7 ± 0.1 <sup>ab</sup> | 0.08 ± 0.01 <sup>bc</sup>                           | 0.33 ± 0.02 <sup>d</sup>    | 0.04 ± 0.001 <sup>cd</sup>  | 1.8 ± 0.02 <sup>a</sup> |
| T7                                                         | <i>P. infestans</i>                              | 97.4 ± 0.2 <sup>ab</sup> | 0.10 ± 0.03 <sup>b</sup>                            | 0.72 ± 0.06 <sup>a</sup>    | 0.06 ± 0.001 <sup>bcd</sup> | 1.3 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| <b>Juntos en confrontación (antagonistas vs patógenos)</b> |                                                  |                          |                                                     |                             |                             |                         |
| T8                                                         | <i>T. asperellum</i> vs <i>F. oxysporum</i>      | 98.5 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.002 <sup>c</sup>                           | 0.41 ± 0.08 <sup>cd</sup>   | 0.05 ± 0.003 <sup>bcd</sup> | 1.5 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| T9                                                         | <i>T. asperellum</i> vs <i>A. solani</i>         | 98.5 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.003 <sup>c</sup>                           | 0.34 ± 0.08 <sup>d</sup>    | 0.09 ± 0.009 <sup>b</sup>   | 1.3 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| T10                                                        | <i>T. asperellum</i> vs <i>P. infestans</i>      | 98.6 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 0.04 ± 0.006 <sup>c</sup>                           | 0.38 ± 0.1 <sup>cd</sup>    | 0.04 ± 0.002 <sup>cd</sup>  | 1.4 ± 0.08 <sup>a</sup> |
| T11                                                        | <i>T. harzianum</i> vs <i>F. oxysporum</i>       | 98.4 ± 0.2 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.004 <sup>c</sup>                           | 0.43 ± 0.02 <sup>cd</sup>   | 0.07 ± 0.001 <sup>bcd</sup> | 1.7 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| T12                                                        | <i>T. harzianum</i> vs <i>A. solani</i>          | 98.6 ± 0.8 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.003 <sup>c</sup>                           | 0.42 ± 0.12 <sup>cd</sup>   | 0.06 ± 0.002 <sup>bcd</sup> | 1.8 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| T13                                                        | <i>T. harzianum</i> vs <i>P. infestans</i>       | 98.7 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.005 <sup>c</sup>                           | 0.49 ± 0.08 <sup>bcd</sup>  | 0.05 ± 0.002 <sup>bcd</sup> | 1.6 ± 0.06 <sup>a</sup> |
| T14                                                        | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>F. oxysporum</i> | 98.9 ± 0.0 <sup>a</sup>  | 0.02 ± 0.008 <sup>c</sup>                           | 0.39 ± 0.06 <sup>cd</sup>   | 0.08 ± 0.002 <sup>bc</sup>  | 1.7 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| T15                                                        | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>A. solani</i>    | 98.7 ± 0.0 <sup>a</sup>  | 0.04 ± 0.001 <sup>c</sup>                           | 0.42 ± 0.02 <sup>cd</sup>   | 0.06 ± 0.001 <sup>bcd</sup> | 1.4 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| T16                                                        | <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>P. infestans</i> | 98.2 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.004 <sup>c</sup>                           | 0.55 ± 0.12 <sup>abcd</sup> | 0.04 ± 0.001 <sup>cd</sup>  | 1.3 ± 0.08 <sup>a</sup> |

<sup>x</sup>pf: Peso fresco / <sup>x</sup>pf: Fresh weight. Medias con la misma literal entre columnas, son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p=0.05$ ). ± Error estándar / Means with the same letter between columns are statistically equal, according to Tukey's test ( $p=0.05$ ). ± Standard error.



contenido de grasa en los jitomates fluctuó de 0.03 a 0.15 % (Cuadro 3). Esta variable fue menor en frutos de plantas tratadas con *Trichoderma* y mayor en los frutos obtenidos de plantas tratadas con *F. oxysporum*. En cuanto a fibra cruda, los frutos de todos los tratamientos mostraron un contenido similar (1.2 a 1.8) sin diferencia significativa (Cuadro 3). Pinela *et al.* (2012), reportaron un contenido de cenizas superior a los encontrados en nuestro estudio donde el valor más alto fue de 0.38 y un bajo contenido de grasa fluctuando de 0.03 a 0.17 %, similares a los de nuestro estudio. La reducción en gran medida de las variables agronómicas evaluadas en las plantas y de los parámetros de calidad del fruto debido a los fitopatógenos, podría atribuirse a la deficiente asimilación de nutrientes por parte de las plantas enfermas (Pusztahelyi *et al.*, 2015).

Las especies de *Trichoderma* empleadas en este trabajo, tuvieron un efecto positivo en plantas de jitomate al mejorar las variables de altura, biomasa, clorofila, rendimiento y calidad del fruto en condiciones de invernadero. Con base en estos resultados, las cepas de *Trichoderma* evaluadas pueden ser una buena alternativa para usarse como promotores del crecimiento vegetal y mejoradores de los atributos de calidad del fruto en cultivos hortícolas.

#### AGRADECIMIENTOS

La autora María Fernanda Ruiz Cisneros, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de Doctorado en Ciencias.

#### LITERATURA CITADA

AOAC. 2002. Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists. 17a Ed. Washington, D.C., USA.

Colla G, Roupael Y, Di Mattia E, El-Nakhel C and Cardarelli M. 2015. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:1706-1715. <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6875>

Domínguez S, Rubio MB, Cardoza RE, Gutiérrez S, Nicolás C, Bettioli W, Hermosa R and Monte E. 2016. Nitrogen Metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase *amdS* gene. *Frontiers in Microbiology* 7:1182. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01182>

Khan MY, Haque MM, Molla AH, Rahman MM and Alam MZ. 2017. Antioxidant compounds and minerals in tomatoes by *Trichoderma*-enriched biofertilizer and their relationship with the soil environments. *Journal of Integrative Agriculture* 16:691-703. [https://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61350-3](https://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61350-3)

Molla AH, Haque MM, Haque MA and Ilias GNM. 2012. *Trichoderma*-enriched biofertilizer enhances production and nutritional quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and minimizes NPK fertilizer use. *Agricultural Research* 1:265-272. <https://dx.doi.org/10.1007/s40003-012-0025-7>

NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma mexicana. Dirección general de normas. Disponible en línea: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-102-S-1978.PDF>

Pelagio-Flores R, Esparza-Reynoso S, Garnica-Vergara A, López-Bucio J and Herrera-Estrella A. 2017. *Trichoderma*-Induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science* 8:822. <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>

Pinela J, Barros L, Carvalho AM and Ferreira ICFR. 2012. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology* 50:829-834. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.045>

Pusztahelyi T, Holb IJ and Pócsi I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science* 6:573. <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>

Shafique HA, Sultana V, Ehteshamul-Haque S and Athar M. 2016. Management of soil-borne diseases of organic vegetables. *Journal of Plant Protection Research* 56:221-230. <https://dx.doi.org/10.1515/jppr-2016-0043>

Sharma PK and Goyalwal R. 2017. *Trichoderma*: A potent fungus as biological control agent. Pp:113-125. In: Singh J., Seneviratne G. (eds) *Agro-Environmental Sustainability*. Springer, Cham. [https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2\\_6](https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_6)

Tigist M, Workneh TS and Woldetsadik K. 2013. Effects of variety on the quality of tomato stored under ambient conditions. *Journal of Food Science and Technology* 50:477-486. <https://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0378-0>

Tucci M, Ruocco M, de Masi L, de Palma M and Lorito M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology* 12:341-354. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>

Yadeta KA and Thomma BP. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4:1-12. <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>

# Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens

## Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos

**Zormy Nacary Correa-Pacheco**, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yautepec, C.P. 62731, Morelos. México; **Silvia Bautista-Baños\***, **Mónica Hernández-López**, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yautepec, C.P. 62731, Morelos. México; **Miguel Ángel Marquina-Valle**, Instituto Tecnológico de Zacatepec. Calzada Tecnológico 27, Plan de Ayala, Zacatepec de Hidalgo, C.P. 62780, Morelos. México. \*Autor para correspondencia: sbautis@ipn.mx.

**Recibido:** 13 de Marzo, 2018.

**Aceptado:** 19 de Agosto, 2018.

Correa-Pacheco ZC, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Marquina-Valle MA. 2018. Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 457-467.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1803-2

Primera publicación DOI: 04 de Septiembre, 2018.  
First DOI publication: September 04, 2018.

**Resumen.** En el control de microorganismos fitopatógenos, existen nuevas propuestas de nanomateriales que incluyen aquellas con quitosano y aceites esenciales, los cuales pueden aplicarse solo o en nanoformulaciones. Seis aislamientos fúngicos se sometieron a diferentes tratamientos para evaluar su efecto en el crecimiento micelial y germinación de las esporas. Se observó una inhibición total (100%) en la mayoría de los hongos cuando se incubaron en medio nutritivo adicionado con nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo al 5%; solamente o en cubiertas

**Abstract.** For controlling phytopathogenic microorganisms, there exist new proposals of nanomaterials including those from chitosan and essential oils, which may be applied alone or in coating nanoformulations. Six fungal isolates were subjected to different nanoparticles treatments in order to evaluate their effect on mycelial growth and spore germination. It was observed a total growth inhibition (100%) in most fungi when they were incubated on nutrient media amended with nanoparticles of chitosan loaded with thyme essential oil at 5%, applied either alone or in nanostructured coatings. As for the spore germination tests, a notable inhibition (50 % and 100%) was observed at 1% concentration of thyme essential oil depending on the isolate. When fungi were grown on individually treatments, germination was delayed by 6 h but completely stopped when incubated on coated nanoformulations. Compared to the lime essential oil, it was the thyme essential oil which provided a remarkable control of the tested fungi.

**Key words:** nanomaterials, chitosan, essential oils.

nanoestructuradas. Dependiendo del aislamiento, hubo una inhibición notable (50% y 100%) en la germinación con el aceite esencial de tomillo 1%. Cuando los hongos crecieron en los tratamientos individuales, la germinación se retrasó 6 h pero se inhibió completamente cuando se incubaron en las nanoformulaciones. Comparado con el aceite esencial de limón, fue el aceite esencial de tomillo el que proporcionó un control remarcable en los hongos evaluados.

**Palabras clave:** nanomateriales, quitosano, aceites esenciales.

Como agentes antimicrobiales, actuando de manera individual o combinada, el quitosano y los aceites esenciales (AE) han demostrado su capacidad fungicida contra varios hongos poscosecha (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014). Como otra medida de control alternativa, la nanotecnología ha abierto nuevos caminos por medio del uso de nanopartículas, ya que debido a su gran área superficial relativa a la masa, pueden ser altamente reactivas. Según Foladori (2009), la fuerza de la nanotecnología reside principalmente en hacer productos más eficientes y multifuncionales, ahorrando así materias primas. Las nanopartículas de quitosano, ya sea de forma individual o en combinación con otros compuestos, pueden integrarse en cubiertas que pueden contener compuestos antimicrobiales tales como los AE (Sotelo *et al.*, 2015; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). En estudios anteriores, Saharan *et al.* (2013) reportaron un mejor efecto inhibitorio al aplicar nanopartículas de quitosano a una concentración de 0.1% en *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*. Yien *et al.* (2012) también reportaron un efecto inhibitorio en *Fusarium solani*, con las nanopartículas de quitosano de peso molecular bajo y alto en

As antimicrobial agents, acting individually or combined, chitosan and essential oils (EO) have demonstrated their fungicidal performance against various postharvest fungi (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014). As another alternative control measure, nanotechnology has opened new avenues through the use of nanoparticles that due to their large surface area relative to the mass, they can be highly reactive. According to Foladori (2009) the strength of nanotechnology lies mainly in making more efficient and multifunctional products, thereby saving raw materials. Chitosan nanoparticles individually or in combinations with other compounds, eventually can be integrated into coating formulations that may contain antimicrobial compounds such as EO (Sotelo *et al.*, 2015; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). In previous studies, Saharan *et al.* (2013) reported a better inhibitory effect by applying the chitosan nanoparticles at concentration of 0.1%, on *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. Yien *et al.* (2012) also reported an inhibitory effect for the low and high molecular weight chitosan nanoparticles in a range of minimum concentrations from 0.86-1.2 mg mL<sup>-1</sup> and 0.5-1.2 mg mL<sup>-1</sup>, respectively on *Fusarium solani*, while Beyki *et al.* (2014) conducted a study on the effect against *Aspergillus flavus* using an 800 ppm concentration of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil encapsulated in chitosan nanogels with cinnamic acid. The aim of this research was to evaluate the fungal growth of various pathogenic fungi treated with chitosan nanoparticles, based chitosan-essential oil nanoparticles and chitosan-essential oil coating nanoformulations.

The studied isolates were *A. alternata* obtained from infected figs, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. fragariae* from fruit of papaya and soursop and custard apple, respectively, and *Rhizopus stolonifer* from papaya and strawberry. The lime and

un rango de concentraciones mínimas de 0.86-1.2 mg mL<sup>-1</sup> y 0.5-1.2 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que, Beyki *et al.* (2014) estudiaron el efecto contra *Aspergillus flavus* mediante la aplicación de una concentración de 800 ppm de aceite esencial de menta piperita (*Mentha piperita*) encapsulado en nanogeles de quitosano con ácido cinámico. El objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento fúngico de varios hongos patógenos tratados con nanopartículas de quitosano, nanopartículas de quitosano-aceite esencial y cubiertas nanoformuladas de quitosano-aceite esencial.

Los aislados evaluados fueron: *A. alternata*, que se obtuvo de de higos infectados, *Colletotrichum gloeosporioides* de papaya y guanábana, *C. fragariae* de chirimoya y *Rhizopus stolonifer* de papaya y fresa. Los aceites esenciales de limón y tomillo se obtuvieron de Essential Oils-Essencefleur (grado terapéutico) y el aceite de canola, de una marca registrada. El quitosano (peso molecular medio, desacetilación = 89%) se obtuvo de Sigma-Aldrich. Las nanopartículas de quitosano y de limón y tomillo se sintetizaron de la siguiente manera: soluciones de quitosano a concentraciones de 0.05% (w/v) se disolvieron en ácido acético glacial (1% v/v) (Fermont Chemicals Inc.) y agua destilada. Se agregaron 2.5 mL de la solución de quitosano al limón y tomillo en concentraciones de 1, 3, 5% (w/v) previamente disueltos en etanol (40 mL) (Fermont Chemicals Inc.) usando una bomba peristáltica (Bio-Rad, EP-1 Econo Pump) y revolviendo de manera moderada. La solución obtenida se colocó en un evaporador giratorio (Rotary Evaporator RE 300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) a 40 °C y 50 rpm. El volumen final de nanopartículas fue de 2 mL. Los tratamientos independientes fueron: nanopartículas de quitosano al 0.05% (ChNp 0.05%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón al 1%, (Ch-LEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) y 5% Ch-LEO-Np 5%), nano-

white thyme essential oils were supplied by Essential Oils-Essencefleur (therapeutic degree) and canola oil from a trademark. Chitosan (Medium molecular weight, deacetylation = 89%) was obtained from Sigma-Aldrich. Chitosan and lime and thyme essential oils nanoparticles, were synthesized as follows: chitosan solutions at concentrations of 0.05% (w/v) were dissolved in glacial acetic acid (1% v/v) (Fermont Chemicals Inc.) and distilled water. 2.5 mL of chitosan solution was added to lime and thyme at concentrations of 1, 3, 5 % (w/v) previously dissolved in methanol (40 mL) (Fermont Chemicals Inc.) by using a peristaltic pump (Bio-Rad, EP-1 Econo Pump) under moderate stirring. The obtained solution was placed in a rotary evaporator (Rotary Evaporator RE 300, BM 500 Water Bath, Yamato CF 300) at 40 °C and 50 rpm. The final volume of nanoparticles was 2 mL. The independent treatments were: chitosan nanoparticles at 0.05% (ChNp 0.05%), chitosan-lime essential oil nanoparticles at 1%, (Ch-LEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) and 5% Ch-LEO-Np 5%), chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) and 5% (Ch-TEO-Np 5%), and controls [control-Potato Dextrose Agar (C-PDA) and methanol (Meth) and canola oil at 0.1 % (CO 0.1 %)]. The nanostructured coatings were: 98.6% chitosan + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1), 89.6% chitosan + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2), 49.6% chitosan + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3), 46.6% chitosan + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4), 44.6% chitosan + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) and control-PDA (COAT6) (Correa-Pacheco *et al.*, 2017). All formulations contained glycerol at 0.3% (J.T.Baker®) and canola oil at 0.1%. Treatments (0.5 ml) were uniformly dispersed in the PDA culture medium. Disks of 5 mm in diameter of each strain (4-14 days old) were placed separately in the center of the Petri dishes containing the treatment and incubated at 20-25 °C



partículas de quitosano y aceite esencial de tomillo al 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-LEO-Np 3%) y 5% (Ch-TEO-Np 5%), y controles [control-Papa Dextrosa Agar (C-PDA) y metanol (Meth) y aceite de canola al 0.1 % (CO 0.1 %)]. Las cubiertas nanoestructuradas consistieron en: 98.6% quitosano + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1), 89.6% quitosano + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2), 49.6% quitosano + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3), 46.6% quitosano + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4), 44.6% quitosano + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) y control-PDA (COAT6) (Correa-Pacheco *et al.*, 2017). Todas las formulaciones contenían glicerol al 0.3% (J.T.Baker®) y aceite de canola al 0.1%. Los tratamientos (0.5 ml) se esparcieron de manera uniforme en el medio de cultivo PDA. Discos de 5 mm de diámetro de cada aislado (4-14 días de edad) se colocaron por separado en el centro de las placas de Petri con el tratamiento y se incubaron a 20-25 °C, hasta que los hongos alcanzaron su desarrollo máximo (4-14 días). El crecimiento micelial radial de los hongos se midió (cm) en 5 placas Petri (8 cm de diámetro) por tratamiento al final del periodo de incubación, con un calibrador vernier Truper, que fue de 14 días para *A. alternata*, 10 para las especies de *Colletotrichum* y cuatro para *R. stolonifer*. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Se llevó a cabo un experimento adicional para evaluar el proceso de germinación durante periodos de incubación de 0, 6, 8 y 10 h. Para esto se colocaron alícuotas de esporas de 30 ml de una concentración de  $10^5$  en 6 discos de PDA con el tratamiento individual o con las formulación de las cubiertas. La germinación se detuvo cuando se adicionó lactofenol-safranina. Las observaciones se llevaron a cabo con el uso de un microscopio óptico Nikon ALPHAPHOT-2YS2-H con un lente 40X. Los datos para cada periodo de incubación se expresaron como porcentaje de germinación. Los tratamientos se arreglaron

until fungi reached its maximum development (4-14 days). Radial mycelial growth of the fungi was measured (cm) in 5 Petri dishes (8 cm of diameter) per treatment at the end of incubation period, with a Truper vernier caliper, which was 14 days for *A. alternata*, 10 for all *Colletotrichum* species and four days for *R. stolonifer*. The results were expressed as percentage inhibition of mycelial growth. An additional experiment was carried out to evaluate the germination process during a given 0, 6, 8 and 10 h incubation periods. For this, spore aliquots of 30 ml of a  $10^5$  concentration were placed onto 6 PDA discs containing the individual treatment or the coating formulation. Germination was stopped by adding lactophenol-safranin. Observations were carried out using a Nikon ALPHAPHOT-2YS2-H optical microscope with a 40X objective. Data for each incubation period was expressed as percentage germination. Treatments were arranged in a completely randomized design. Mean and standard deviations were also calculated. Data of the final mycelial growth and germination were subjected to ANOVA and means comparison by Tukey test at  $p \leq 0.05$  at the end of the incubation period. For both variables, the square root transformation was carried out to fulfil the ANOVA assumptions of homogeneity and data normal distribution. The statistical software used was Sigmaplot v.13.

The final mycelial inhibition and germination showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ) among individual treatments and nanoformulations. Overall, the isolates response, showed growth differences and spore survival according to the treatment applied and isolate. In this study, in all tested fungi, mycelial growth was considerably affected by the application of chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1, 3 and 5 % (Ch-TEO-Np 1%, Ch-TEO-Np 3% and Ch-TEO-Np 5%). In addition, at the last two concentrations; 3% and 5%, inhibition reached 100% and therefore, there were no spore



en un diseño completamente aleatorio. También se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Los datos del crecimiento micelial y germinación finales se sometieron a un ANOVA y la prueba Tukey de comparación de medias a  $p \leq 0.05$ , al final del periodo de incubación. Para ambas variables, se realizó una transformación de la raíz cuadrada para cumplir las suposiciones del ANOVA de homogeneidad y distribución normal de los datos. El software estadístico que se utilizó fue Sigmaplot v.13.

La inhibición micelial final y la germinación presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos individuales y las nanoformulaciones. En general, la respuesta de los aislados presentaron diferencias en el crecimiento y la sobrevivencia de las esporas, según el tratamiento aplicado y el aislado. En este estudio, en todos los hongos estudiados, el crecimiento micelial se afectó de forma considerable por la aplicación de nanopartículas de quitosano-aceite esencial de tomillo al 1, 3 y 5 % (Ch-TEO-Np 1%, Ch-TEO-Np 3% and Ch-TEO-Np 5%). Además, en las últimas dos concentraciones, 3% y 5%, la inhibición alcanzó el 100% y por lo tanto, no hubo formación de esporas (Cuadro 1). En cuanto a las cubiertas nanoestructuradas, la inhibición del crecimiento micelial en todos los aislados fue evidente en aquellos tratamientos en los que el porcentaje de nanopartículas de quitosano-aceite esencial 5%, aumentó en 50, 53 y 55% (COAT3, COAT4 y COAT5). En general, a medida que el aceite esencial de tomillo aumentó, la inhibición fúngica se incrementó, siendo más sensibles aquellos tratados con COAT3 en *C. fragariae*, seguido por ambos aislados de *R. stolonifer* (Cuadro 2). Para todos los aislados, se observó que el número de esporas germinadas aumentó con el tiempo de incubación. Con respecto a los aislados no tratados, no existió un patrón definido con los tratamientos restantes. Sin embargo, en *C. fragariae* el proceso de germinación se retrasó hasta la

formación (Table 1). As for the tested nanostructured coatings, mycelial growth inhibition in all isolates was evident in those where the percentage of nanoparticles of chitosan-thyme essential oil 5%, increased by 50, 53 and 55% (COAT3, COAT4 and COAT5). Overall as the thyme essential oil increased, the fungal inhibition increased, being the most sensitive those treated with COAT3 on *C. fragariae*, followed by both isolates of *R. stolonifer*. (Table 2). For all isolates, it was observed that the number of germinated spores increased as the incubation time increased. With respect to the untreated isolates, there was not a defined pattern with the remaining treatments. However, in *C. fragariae* the process of germination was able to be delayed until the 6<sup>th</sup> h of incubation in most treatments (Figure 1). For *C. gloeosporioides* (soursop) and *R. stolonifer* (papaya) most treatments promoted their germination after 6 h of incubation. As for the nanostructured coatings, at the highest percentage of nanoparticles (55%), a total inhibition was obtained in the isolates *A. alternata*, both *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* and *C. fragariae* during the whole 10 h incubation period (Figure 2).

In general, the results of our research coincide with those previously published by Zahid *et al.* (2013) and Correa-Pacheco *et al.* (2017) in which the effective control of *C. gloeosporioides* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and avocado (*Persea americana*) and treated with chitosan nanoemulsions resulted from the low molecular weight chitosan 1%, and nanostructured formulations chitosan-thyme essential oil 1-5 %, respectively, in terms of inhibition of mycelia and conidial germination of the fungus compared to the untreated control. In other research carried out by Khalili *et al.* (2015) it was demonstrated a better efficacy of thyme EO when encapsulated in chitosan and benzoic acid – made nanogels, in comparison with free thyme EO, against *A. flavus*. In those studies,

**Cuadro 1. Resumen del efecto de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de aceites esenciales sobre la inhibición micelial al final del periodo de incubación.**

**Table 1. Summary of the effect of chitosan nanoparticles and chitosan-essential oils nanoparticles on mycelial inhibition at the end of the incubation period.**

| Individual treatments | Mycelial inhibition (%)   |                                    |                                     |                                     |                               |                                   |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|                       | <i>A. alternata</i> (fig) | <i>C. gloeosporioides</i> (papaya) | <i>C. gloeosporioides</i> (soursop) | <i>C. fragariae</i> (custard apple) | <i>R. stolonifer</i> (papaya) | <i>R. stolonifer</i> (strawberry) |
| ChNp 0.05%            | 0 <sup>a*</sup>           | 0 <sup>a*</sup>                    | 0 <sup>a*</sup>                     | 1.6 <sup>a*</sup>                   | 0 <sup>a*</sup>               | 0 <sup>a*</sup>                   |
| Ch-LEO-Np 1%          | 0 <sup>a</sup>            | 24.5 <sup>c</sup>                  | 0 <sup>a</sup>                      | 1.6 <sup>a</sup>                    | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |
| Ch-LEO-Np 3%          | 0 <sup>a</sup>            | 28.1 <sup>c</sup>                  | 0 <sup>a</sup>                      | 3.4 <sup>b</sup>                    | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |
| Ch-LEO-Np 5%          | 2.4 <sup>a</sup>          | 50.0 <sup>d</sup>                  | 10.8 <sup>b</sup>                   | 6.5 <sup>b</sup>                    | 33.5 <sup>b</sup>             | 2.4 <sup>a</sup>                  |
| Ch-TEO-Np 1%          | 40.3 <sup>b</sup>         | 45.3 <sup>d</sup>                  | 54.4 <sup>c</sup>                   | 52.7 <sup>c</sup>                   | 74.0 <sup>c</sup>             | 71.7 <sup>c</sup>                 |
| Ch-TEO-Np 3%          | 100 <sup>e</sup>          | 100 <sup>e</sup>                   | 100 <sup>d</sup>                    | 100 <sup>d</sup>                    | 100 <sup>d</sup>              | 100 <sup>d</sup>                  |
| Ch-TEO-Np 5%          | 100 <sup>e</sup>          | 100 <sup>e</sup>                   | 100 <sup>d</sup>                    | 100 <sup>d</sup>                    | 100 <sup>d</sup>              | 100 <sup>d</sup>                  |
| C-PDA                 | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>                     | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |
| Meth                  | 0 <sup>a</sup>            | 5.2 <sup>b</sup>                   | 1.7 <sup>a</sup>                    | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |
| CO 0.1%               | 0 <sup>a</sup>            | 35.6 <sup>cd</sup>                 | 0 <sup>a</sup>                      | 4.7 <sup>b</sup>                    | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |

\*Promedios seguidos de la misma letra no representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) determinadas por la prueba múltiple de Tukey. Valores  $p$  después de la transformación raíz cuadrada / \*Means followed by the same letter are not significant different ( $p \leq 0.05$ ) determined by Tukey's multiple test.  $p$  values after square root transformation.

Etiquetas de los tratamientos: Nanopartículas de quitosano 0.05% (ChNp 0.05%); nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón 1%, (Ch-LEO-Np 1%); 3% (Ch-LEO-Np 3%), 5% (Ch-LEO-Np 5%); nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-TEO-Np 3%), 5% (Ch-TEO-Np 5%); Control-Papa-Dextrosa-Agar (C-PDA); metanol (Meth) y aceite de canola 0.1% (CO 0.1%) / Treatment labels: Chitosan nanoparticles 0.05% (ChNp 0.05%); Chitosan-lime essential oil nanoparticles 1%, (Ch-LEO-Np 1%); 3% (Ch-LEO-Np 3%), 5% (Ch-LEO-Np 5%); Chitosan-thyme essential oil nanoparticles 1% (Ch-TEO-Np 1%), 3% (Ch-TEO-Np 3%), 5% (Ch-TEO-Np 5%); Control-Potato-Dextrose-Agar (C-PDA); methanol (Meth) and canola oil 0.1% (CO 0.1%).

**Cuadro 2. Resumen del efecto de las cubiertas nanoestructuradas a base de quitosano-aceites esenciales, sobre la inhibición micelial al final del periodo de incubación.**

**Table 2. Summary of the effect of coating nanoformulations based on chitosan-essential oils on mycelial inhibition at the end of the incubation period**

| Treatments | Mycelial inhibition (%)   |                                    |                                     |                                     |                               |                                   |
|------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|            | <i>A. alternata</i> (fig) | <i>C. gloeosporioides</i> (papaya) | <i>C. gloeosporioides</i> (soursop) | <i>C. fragariae</i> (custard apple) | <i>R. stolonifer</i> (papaya) | <i>R. stolonifer</i> (strawberry) |
| COAT1      | 0 <sup>a*</sup>           | 0 <sup>a*</sup>                    | 0 <sup>a*</sup>                     | 0 <sup>a*</sup>                     | 0 <sup>a*</sup>               | 0 <sup>a*</sup>                   |
| COAT2      | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>                     | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |
| COAT3      | 19.2 <sup>b</sup>         | 17.7 <sup>b</sup>                  | 30.0 <sup>b</sup>                   | 85.0 <sup>b</sup>                   | 72.5 <sup>b</sup>             | 62.0 <sup>b</sup>                 |
| COAT4      | 70.2 <sup>c</sup>         | 65.0 <sup>c</sup>                  | 92.0 <sup>c</sup>                   | 100 <sup>c</sup>                    | 100 <sup>c</sup>              | 62.4 <sup>b</sup>                 |
| COAT5      | 100 <sup>d</sup>          | 100 <sup>d</sup>                   | 100 <sup>d</sup>                    | 100 <sup>c</sup>                    | 100 <sup>c</sup>              | 100 <sup>c</sup>                  |
| COAT6      | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>                     | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                      | 0 <sup>a</sup>                | 0 <sup>a</sup>                    |

\* Promedios seguidos de la misma letra no representan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) determinadas por la prueba múltiple de Tukey. Valores  $p$  después de la transformación raíz cuadrada / \*Means followed by the same letter are not significant different ( $p \leq 0.05$ ) determined by Tukey's multiple test.  $p$  values after square root transform.

Etiquetas de los tratamientos: 98.6% quitosano + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1); 89.6% quitosano + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2); 49.6% quitosano + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3); 46.6% quitosano + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4); 44.6% quitosano + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) y control (COAT6) / Treatment labels: 98.6% chitosan + 1% Ch-TEO-Np 5% (COAT1); 89.6% chitosan + 10% Ch-TEO-Np 5% (COAT2); 49.6% chitosan + 50% Ch-TEO-Np 5% (COAT3); 46.6% chitosan + 53% Ch-TEO-Np 5% (COAT4); 44.6% chitosan + 55% Ch-TEO-Np 5% (COAT5) and control (COAT6).

6<sup>o</sup> hora de incubación en la mayoría de los tratamientos (Figura 1). Para *C. gloeosporioides* (guanábana) y *R. stolonifer* (papaya) la mayoría de los tratamientos promovieron su germinación después de 6 h de incubación. Con respecto a las cubiertas nanoestructuradas, en el más alto porcentaje de nanopartículas (55%), se obtuvo una inhibición total en los aislados de *A. alternata*, en ambos aislados de *C. gloeosporioides*, así como en *R. stolonifer* y *C. fragariae* durante las 10 h de incubación (Figura 2).

En general, los resultados de nuestra investigación coinciden con lo que anteriormente publicó Zahid *et al.* (2013) y Correa-Pacheco *et al.* (2017), donde el control efectivo de *C. gloeosporioides* aislado de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) y aguacate (*Persea americana*), tratado con nanoemulsiones de quitosano, preparadas con quitosano de bajo peso molecular al 1%, y formulaciones nanoestructuradas de quitosano-aceite esencial de tomillo al 1-5%, respectivamente, en términos de inhibición micelial y germinación conidial del hongo, en comparación con el control sin tratamiento. En otra investigación llevada a cabo por Khalili *et al.* (2015), se demostró una mayor eficacia del AE de tomillo encapsulado en quitosano y ácido benzoico convertido en nanogeles, en comparación con el AE de tomillo contra *A. flavus*. En dichos estudios, la mejor concentración fungicida de 300 mg L<sup>-1</sup> bajo condiciones herméticas, fue suficiente para inhibir de forma significativa el número de colonias fúngicas, mientras que a 700 mg L<sup>-1</sup>, la vida de anaquel de los jitomates tratados se prolongó hasta un mes. En esta investigación, el principal efecto fungicida provino en su mayoría del AE de tomillo y su concentración. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores. Por ejemplo, Barrera-Necha *et al.* (2009) y Sellamuthu *et al.* (2013) expusieron la actividad antifúngica del AE de tomillo *in vitro* y en la fruta del aguacate contra *C. gloeosporioides*. En otros reportes, también se reportó un notable efecto

the best fungicidal concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> under sealed conditions was enough to inhibit significantly the number of fungal colonies, while at 700 mg L<sup>-1</sup>, the shelf life of the treated tomatoes was extended up to one month. In this research, the major fungicidal effect seems to be mostly from the thyme essential oil and its concentration, results that agree with various other researchers. For example, Barrera-Necha *et al.* (2009) and Sellamuthu *et al.* (2013) stated the antifungal activity of thyme EO *in vitro* and on avocado fruit against *C. gloeosporioides*. In other reports, a noticeable fungicidal effect was also reported on *A. flavus*, *A. alternata* and *F. oxysporum* with low concentrations (1.0-8-0 µg mL<sup>-1</sup>) from two different species of the genus *Thymus*: *T. kotschyanus* and *T. daenensis* (Mohammadi *et al.*, 2014) while the minimal concentration of 62.5 µg mL<sup>-1</sup> was exhibited on *A. flavus* to avoid spore germination with this same EO species (Pekmezovik *et al.*, 2015). The above finding results clearly state the traditional results of the thyme EO either alone or incorporated with other substances; however, a problem for most EO and their respective major compounds is their high volatility when applied alone. As stated by Correa-Pacheco *et al.* (2017) 'to overcome the volatility aspect of EO, the incorporation of nanomaterials and antimicrobials, including EO into edible coatings will give new properties to the nanostructured coating, in addition, their synergistic effects can improve'.

The development of new fungi-control treatments with environmentally friendly compounds by employing nanotechnology can offer effective and more reliable means for controlling microorganism. In this research chitosan-thyme EO nanoparticles at the highest concentrations (5%), tested either independently or integrated in a formulation (50, 53 and 55 %) gave a notable *in vitro* growth control on the evaluated fungi, but it is necessary to study their effects of *in situ* control assessments.

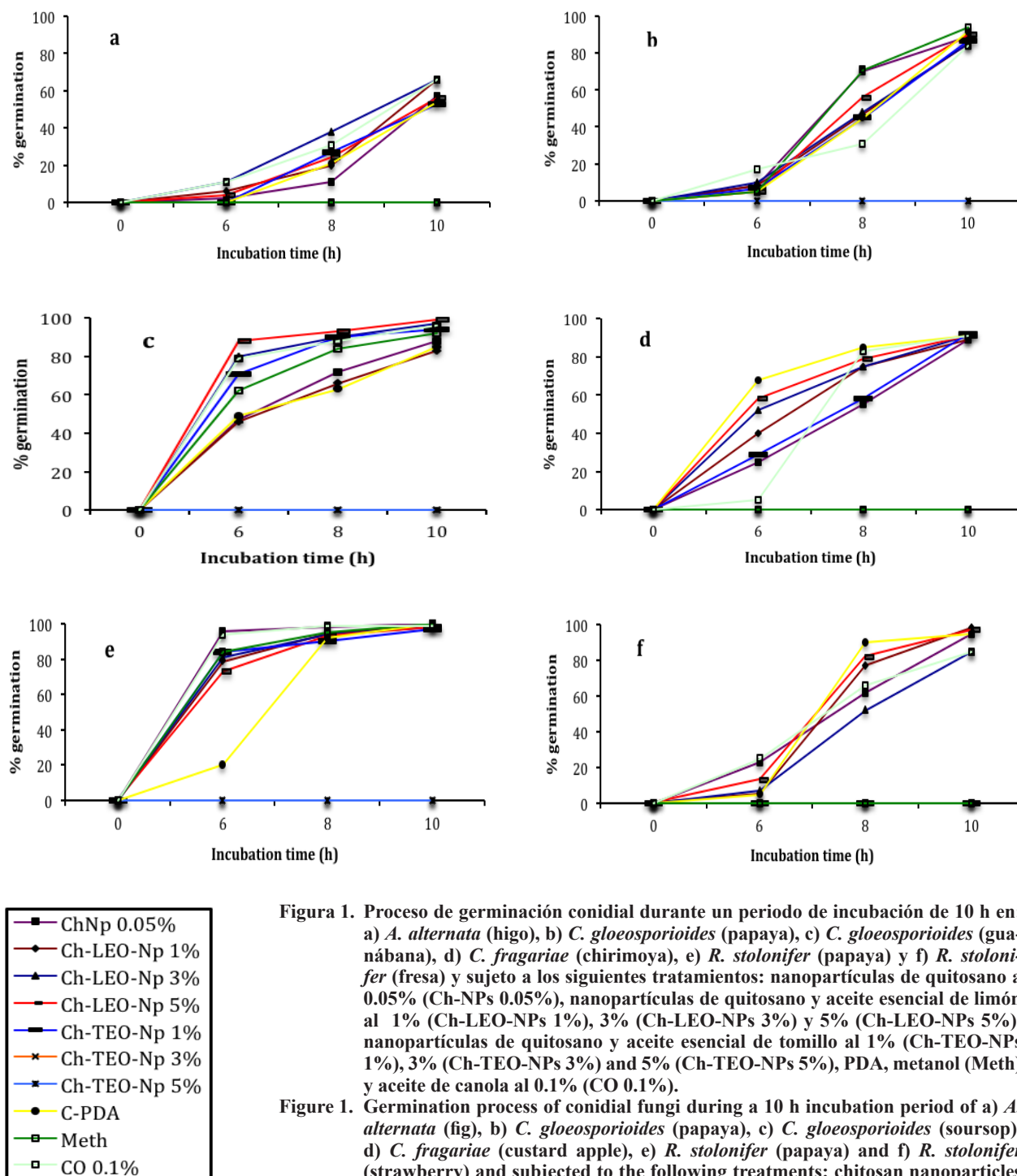


Figura 1. Proceso de germinación conidial durante un periodo de incubación de 10 h en: a) *A. alternata* (higo), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (guanábana), d) *C. fragariae* (chirimoya), e) *R. stolonifer* (papaya) y f) *R. stolonifer* (fresa) y sujeto a los siguientes tratamientos: nanopartículas de quitosano a 0.05% (Ch-NPs 0.05%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de limón al 1% (Ch-LEO-NPs 1%), 3% (Ch-LEO-NPs 3%) y 5% (Ch-LEO-NPs 5%), nanopartículas de quitosano y aceite esencial de tomillo al 1% (Ch-TEO-NPs 1%), 3% (Ch-TEO-NPs 3%) and 5% (Ch-TEO-NPs 5%), PDA, metanol (Meth) y aceite de canola al 0.1% (CO 0.1%).

Figure 1. Germination process of conidial fungi during a 10 h incubation period of a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (sour sop), d) *C. fragariae* (custard apple), e) *R. stolonifer* (papaya) and f) *R. stolonifer* (strawberry) and subjected to the following treatments: chitosan nanoparticles at 0.05% (Ch-NPs 0.05%), chitosan-lime essential oil nanoparticles at 1% (Ch-LEO-NPs 1%), 3% (Ch-LEO-NPs 3%) and 5% (Ch-LEO-NPs 5%), chitosan-thyme essential oil nanoparticles at 1% (Ch-TEO-NPs 1%), 3% (Ch-TEO-NPs 3%) and 5% (Ch-TEO-NPs 5%), PDA, methanol (Meth) and canola oil at 0.1% (CO 0.1%).

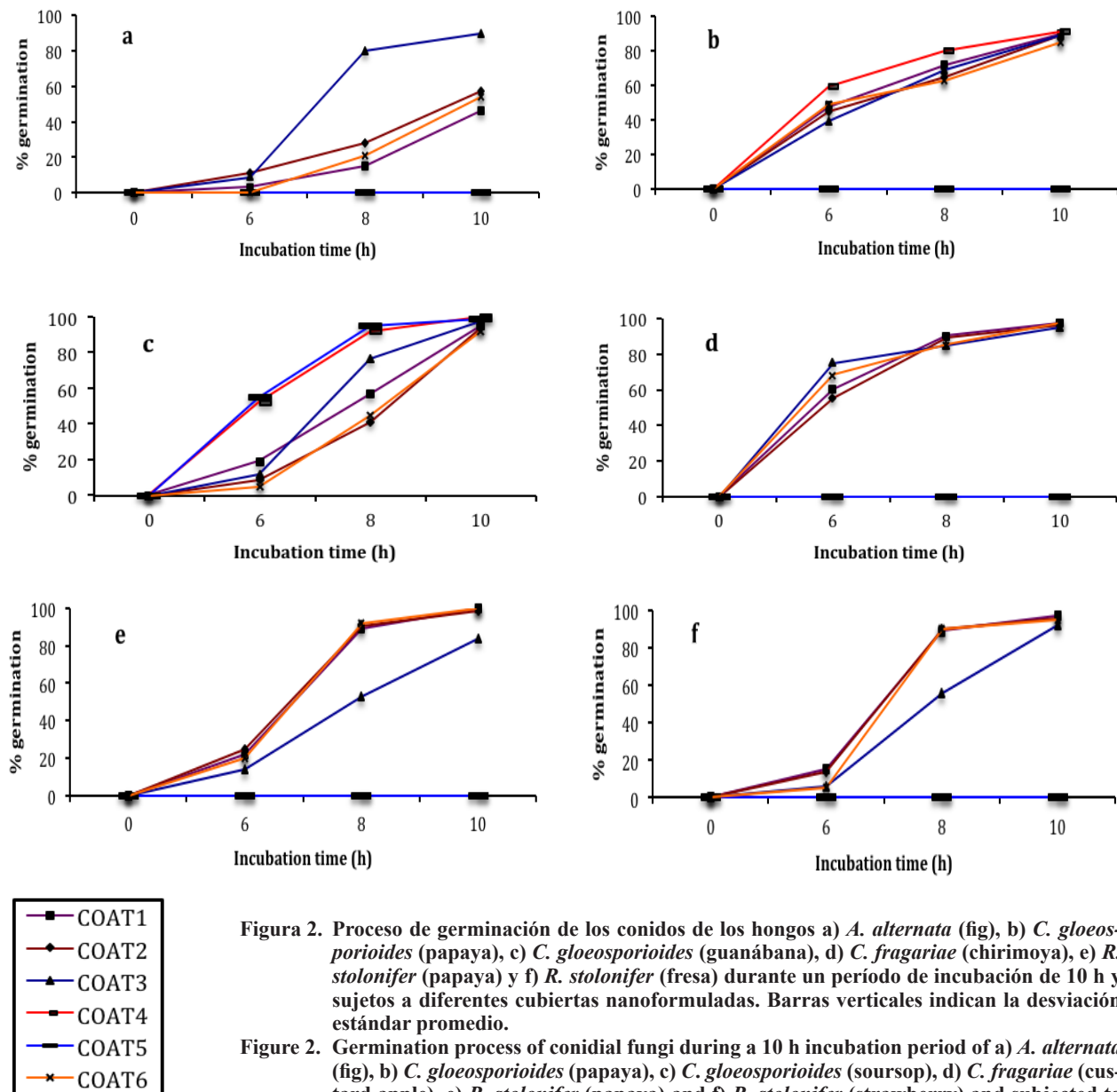


Figura 2. Proceso de germinación de los conidios de los hongos a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (guanábana), d) *C. fragariae* (chirimoya), e) *R. stolonifer* (papaya) y f) *R. stolonifer* (fresa) durante un periodo de incubación de 10 h y sujetos a diferentes cubiertas nanoformuladas. Barras verticales indican la desviación estándar promedio.

Figure 2. Germination process of conidial fungi during a 10 h incubation period of a) *A. alternata* (fig), b) *C. gloeosporioides* (papaya), c) *C. gloeosporioides* (soursop), d) *C. fragariae* (custard apple), e) *R. stolonifer* (papaya) and f) *R. stolonifer* (strawberry) and subjected to different coating nanoformulations. Vertical bars indicate mean standard deviations.

antifúngico en *A. flavus*, *A. alternata* y *F. oxysporum* con bajas concentraciones ( $1.0-8-0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de dos diferentes especies del género *Thymus*: *T. kotschyanus* y *T. daenensis* (Mohammadi *et al.*, 2014) mientras que, la concentración mínima de  $62.5 \mu\text{g}$

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


mL⁻¹ se presentó en *A. flavus* para evitar la germinación de esporas con estas mismas especies de AE (Pekmezovic *et al.*, 2015). Los resultados de las investigaciones anteriores demuestran con claridad los resultados tradicionales del AE de tomillo, ya sea solo o incorporado en otras sustancias; sin embargo, un problema para la mayoría de los AE y sus principales componentes respectivos, es su alta volatilidad al ser aplicados solos. Como expusieron Correa-Pacheco *et al.* (2017) 'para superar el aspecto de volatilidad de los AE, la incorporación de nanomateriales y antimicrobiales incluyendo los AE en cubiertas comestibles, dará nuevas propiedades a la cubierta nanoestructurada, además, de que sus efectos sinérgicos pueden mejorar'.

El desarrollo de nuevos tratamientos para el control de hongos con compuestos amigables con el ambiente mediante el uso de la nanotecnología puede ofrecer medios efectivos y más confiables para el control de microorganismos. En esta investigación, las nanopartículas de quitosano-AE de tomillo en las más altas concentraciones (5%), probadas, individualmente o integradas en una formulación (50, 53 o 55 %), presentaron un control notable en el crecimiento *in vitro* sobre los hongos evaluados, aunque aún es necesario estudiar sus efectos *in situ*.

LITERATURA CITADA

- Barrera-Necha LL, Garduño-Pizaña G and García-Barrera J. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hensen. Plant Pathology Journal 8:17-21. Disponible en línea: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/ppj/2009/17-21.pdf>
- Beyki M, Zhavesh S, Khalili TS, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Mansour B, Bayat Tabatabaei M and Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products 54:310-319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Marquina-Valle MA and Hernández-López M. 2017. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* and on cv Hass and fruit quality. Journal of Phytopathology 165:297-305. DOI: 10.1111/jph.12562
- Foladori G. 2009. La gobernanza de las nanotecnologías. Sociológica 24:125-153. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-01732009000300006
- Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhavesh S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, Bayat M and Tabatabaei M. (2015) Encapsulation of *Thyme essential* oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. LWT-Food Science and Technology 60:502-508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
- Mohammadi A, Nazari H, Imani S and Amrollahi H. 2014. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants Activite's antifongiques et composition chimique de quelques plantes médicinales. Journal of Mycologie Médicale 24:e1-e8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.02.006>
- Pekmezovic M, Rajkovic K, Barac A, Senerovic' L and Arsic Arsenijevic V. 2015. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. Biochemical Engineering Journal 99:131-137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.024>
- Saharan V1, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS and Pal A. 2013. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their *in vitro* evaluation against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Macromolecules 62:677-683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Sellamuthu P, Sivakumar D and Soundy P. 2013. Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. Journal of Food Safety 33:86-93. DOI: 10.1111/jfs.12026
- Sivakumar D and Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Crop Protection 64:27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sotelo BME, Bautista BS, Aldana LL, Solorza FJ, Jiménez AA, Barrera NLL, Valverde AG y Plascencia JM. 2015. La nanotecnología en el control de microorganismos patógenos e insectos de importancia económica. In: C. Laréz VC, Koteich KS y López GF eds. Nanotecnología: fundamentos y aplicaciones. Comisión de Publicaciones del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Caracas Venezuela 307-321.
- Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, Gómez and Gómez Y. 2017. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. International Journal of Biological Macromolecules 103:409-414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>

- Yien L, Mohammad N, Sarwar A and Katas H. 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials* 2012:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698>
- Zahid N, Alderson P, Ali A, Maqbool M and Manickam S. 2013. In vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides* by using chitosan loaded nanoemulsions. *Acta Horticulturae* 1012:769-774. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.1012.104

Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa

Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa

Rubén Félix-Gastélum*, **Glenda Judith Lizárraga-Sánchez**, Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Bulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, CP. 81223, México; **Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza**, **Karla Yeriana Leyva-Madrigal**, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Bulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave, Sinaloa, CP. 81101, México; **Gabriel Herrera-Rodríguez**, Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. Lázaro Cárdenas, PTE. 315, Colonia Centro, Los Mochis Sinaloa, CP. 81200, México; **Silvia Espinoza-Matías**, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Delegación Coyoacán. CDMX, CP. 04510. *Autor para correspondencia: ruben.felix@udo.mx.

Recibido: 09 de Marzo, 2018.

Aceptado: 03 de Julio, 2018.

Félix-Gastélum R, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madrigal KY, Herrera-Rodríguez G, Espinoza-Matías S. 2018. Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 468-478.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-1

Primera publicación DOI: 07 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 07, 2018

Resumen. Las enfermedades de origen fungoso constituyen una limitante en la producción de maíz en Sinaloa, México. En ciclos agrícolas recientes, una enfermedad foliar ha ocurrido en niveles epidémicos en la región costera del Norte de Sinaloa. Los síntomas de la enfermedad se asemejan a los causados por *Exserohilum turcicum* previamente

Abstract. Fungal diseases constitute an important maize production constraint in Sinaloa, Mexico. In recent growing seasons, a severe foliar epiphytotic disease has occurred in the northern coastal region of this state. The symptoms of the disease resembled those caused by *Exserohilum turcicum*, reported in the high humid valleys in the states of the central plateau of Mexico and other parts of the world with temperate to subtropical climate. The objective of this research was to confirm the identity of *E. turcicum* associated to maize leaf blight and to assess the disease severity in 17 maize hybrids in commercial fields. Variation in color and colony morphology of the fungal isolates was observed in various media. The maize leaf extract agar was the most favorable medium for fast mycelial growth of the fungal isolates. The isolates collected were used in pathogenicity tests, where they exhibited a variation in pathogenicity on the commercial maize

reportados en los valles altos en estados de la Mesa Central de México y otras partes del mundo con clima subtropical o templado. El objetivo de ésta investigación fue confirmar la identidad de *E. turcicum* asociado al tizón foliar del maíz y evaluar la severidad de la enfermedad en 17 híbridos de maíz en lotes comerciales. Variación en color y morfología de los aislados se observó en diferentes medios. El medio extracto de maíz-agar fue el más favorable para el desarrollo micelial de los aislados. En pruebas de patogenicidad, los aislados exhibieron variación en patogenicidad en el híbrido comercial de maíz DK-3000. Los postulados de Koch se cumplieron mediante el re-aislamiento del patógeno de las plantas inoculadas. Aun cuando el teleomorfo (*Setosphaeria turcica*) no se observó, estudios morfométricos y moleculares confirmaron la identidad de *E. turcicum* como agente causal del tizón del maíz. Los híbridos de maíz mostraron una severidad diferencial de la enfermedad, lo cual estuvo relacionado con periodos prolongados de alta humedad relativa. Estudios futuros deberían enfocarse a la determinación de las *formae specialis* importantes para la implementación de un programa de mejoramiento genético para el control de la enfermedad.

Palabras clave: hongo, patogenicidad, severidad, anamorfo, identificación, morfología.

En ciclos agrícolas recientes, una severa enfermedad foliar atacó a varios híbridos de maíz en niveles epifíticos en las regiones costeras del norte de Sinaloa en los meses entre noviembre y enero, que incluyeron periodos diarios con humedad relativa $\geq 90\%$ por 13-17 h, y una temperatura diaria promedio de entre 18 y 26 °C. Los síntomas de la enfermedad se desarrollaron inicialmente en las hojas inferiores, causando lesiones ovaladas, largas, elípticas,

híbrido DK-3000. Koch's postulates were fulfilled by re-isolation of the pathogen from inoculated plants. Although the teleomorph (*Setosphaeria turcica*) was not observed, morphometric and molecular studies indicated that *E. turcicum* is the causal agent of maize leaf blight. Differential disease severity occurred in maize hybrids and was highly dependent on prolonged periods of high relative humidity. Future research should focus on determining the *formae specialis* crucial for maize breeding programs to achieve genetic resistance against the disease.

Key words: fungus, pathogenicity, severity, anamorph, identification, morphology.

In recent growing seasons, a severe foliar epiphytic disease occurred in several maize hybrids in the northern coastal regions of Sinaloa during the months of November through January, including periods of relative humidity $\geq 90\%$ for 13-17 h, and an average daily temperature between 18 and 26 °C. The symptoms of the disease developed initially in the lower leaves causing oval, long, elliptical, grayish-green or tan necrotic lesions of different sizes. Later, symptoms spread to the middle and upper leaves of the plants. Although yield losses are yet to be estimated, personal observations by the author indicate the disease has destroyed up to 65% of the foliage of some commercial maize hybrids grown in the northern coastal region of the state. Although maize leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* (*Et*) is one of the most important foliar diseases in maize grown in Mexico, at the present time, there is not enough scientific evidence on the etiology of the disease, although maize growers and field advisors have shown interest in determining its etiology. Consequently, the main goal of the present study

verde grisáceo o marrones de diferentes tamaños. Más tarde, los síntomas alcanzaron a las hojas medias y superiores de las plantas. Si bien todavía están por determinarse las pérdidas de rendimiento, observaciones personales del autor indican que la enfermedad ha destruido hasta 65% del follaje de algunos híbridos comerciales de maíz sembrados en la región costera del norte del estado. Aunque el tizón foliar del maíz causado por *Exserohilum turcicum* (*Et*) es una de las enfermedades foliares más importantes en el maíz sembrado en México, hoy en día no existe suficiente evidencia científica acerca de la etiología de la enfermedad, aunque los productores de maíz y asesores de campo demuestran interés en determinar su etiología. En consecuencia, el objetivo principal del presente estudio fue confirmar la identidad del agente causal del tizón foliar del maíz a nivel de especie, con base en datos morfológicos y moleculares del anamorfo.

Quince muestras sintomáticas fueron colectadas del mismo número de campos de maíz en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, entre el 16 de diciembre de 2013 y el 15 de enero de 2014. Una muestra de cada campo consistió en cinco hojas sintomáticas recolectadas de las esquinas y el centro de cada campo (n=25). Fragmentos de hojas sintomáticas (5-6 cm de longitud) fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 2 min, lavados por 3 min en agua destilada estéril y secados con papel de filtro Whatman Núm. 1. Los fragmentos fueron colocados en una cámara húmeda por 48 h a 25 °C. De los conidios formados en el tejido de las hojas se obtuvieron cultivos monospóricos a través de su transferencia con una aguja de disección a placas de Petri con papa dextrosa y agar (PDA), bajo un microscopio de disección.

Se evaluó el crecimiento micelial de ocho aislados monoconidiales del hongo en los siguientes medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA),

was to confirm the identity of the causal agent of maize leaf blight at the species level, based on morphometric and molecular data of the anamorpha.

Fifteen symptomatic samples were collected from the same number of maize fields in the municipalities of Ahome and El Fuerte, Sinaloa, from December 16, 2013 through January 15, 2014. One sample from each field consisted in five symptomatic leaves collected from the corners and center of each field (n=25). Fragments of symptomatic leaves (5-6 cm long) were disinfested in a 0.5% sodium hypochlorite solution for 2 min, washed for 3 min in sterile distilled water and dried on Whatman No. 1 filter paper. Fragments were placed in a moist chamber, for 48 h at 25 °C. From conidia formed on the leaf tissue, monosporic cultures were obtained through direct transference of them with a dissecting needle to Petri plates with potato dextrose agar (PDA), under a dissecting microscope.

Mycelial growth of eight fungal monoconidial isolates were evaluated on the following culture media: potato dextrose agar (PDA), Czapek-Dox agar (CDA), glucose peptone agar (GPA) and Richard's synthetic agar (RSA), and maize leaf extract agar (CLEA) (Dhingra and Sinclair, 1985). After eight days of incubation, under 14-h light/10-h dark regime at 25 °C, the surface color of the fungal colonies in the different culture media were in the olivaceous and dark grayish-olive colors.

All isolates presented light olive pigmentation on the back of the colony in CDA and RSA, but no pigmentation was observed in other media. The radial mycelial growth rate of the isolates on CLEA ranged from 3.7 to 4.9 mm/day and was significantly ($P \leq 0.05$) greater than the growth on the other media. There was a significant interaction ($P < 0.0001$) between the medium and the isolate on radial mycelial growth, indicating that growth

Czapek-Dox Agar (CDA), glucose peptona agar (GPA), agar sintético de Richard's (ASR) y extracto de hoja de maíz agar (EHMA) (Dhingra y Sinclair, 1985). Después de ocho días de incubación, bajo un régimen de luz por 14 h y 10 h de oscuridad a 25 °C, el color de la superficie de las colonias del hongo en los diferentes medios de cultivo variaron de oliváceo y verde olivo grisáceo.

Todos los aislados presentaron una pigmentación de color verde oliva claro en el reverso del cultivo en CDA y ASR, aunque no se observó pigmentación en otros medios. La tasa de crecimiento micelial radial de los aislados en EHMA fue de entre 3.7 y 4.9 mm/día y fue significativamente ($P \leq 0.05$) mayor al crecimiento en los otros medios. Hubo una interacción significativa ($P < 0.0001$) entre los medios de cultivo y el crecimiento radial de los aislados, indicando que las tasas de crecimiento de los aislados dependieron del medio. En PDA, los aislados produjeron de 1 a 3 conidios en la punta del conidióforo (Figura 1). Los conidios eran curvos, ahusados y alargados, con un promedio de cinco septas y una longitud de 44 a 110 μm (promedio de 85.3 μm) de 10 a 21 μm de ancho (promedio de 14.8 μm). No se observaron diferencias en la morfología entre aislados de *Et* obtenidos de hojas sintomáticas del maíz, y las características fueron consistentes con reportes previos (Tang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

Para observar los conidios bajo el microscopio electrónico, se cortaron fragmentos de 3.5 cm^2 de una colonia de un aislado (*Et3*) en PDA de 8 días de edad y se sumergieron en una solución (FAA: 10% formaldehído, 5% ácido acético, 50% dilución de etanol 96%, y 35% agua). Después de 48 h, las muestras fueron lavadas con agua de la llave por 10 minutos y enseguida fueron deshidratadas incrementando las concentraciones de etanol. Las muestras fueron deshidratadas hasta un punto crítico con CO_2 en una desecadora BAL-TEC CPD030.

rates of the isolates were medium-dependent. On PDA, isolates produced between 1-3 conidia at the tip of the conidiophore (Figure 1). Conidia were curved, spindle and elongated, with an average of five septa, and ranged 44 - 110 μm in length (85.3 μm average) and 10 - 21 μm in width (14.8 μm average). No differences in morphology were observed among the *Et* isolates obtained from symptomatic maize leaves, and the characteristics were consistent with previous reports (Tang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

For the observation of conidia under the electron microscope, fragments of 3.5 cm^2 of an 8-days-old PDA culture of a maize blight fungal isolate (*Et3*) were cut and immersed in a fixing solution (FAA: 10% formaldehyde, 5% acetic acid, 50% dilution of ethanol 96%, and 35% water). After 48 h, samples were washed with tap water for 10 min and immediately dehydrated by increasing concentrations of ethanol. Samples were dehydrated to a critical point with CO_2 in a desiccant glass BAL-TEC CPD030. Samples were mounted in aluminum sample holders over a conductive carbon strand, and covered with a fine gold layer in an ionizer Denton Vacuum Desk II (Hofstra Group, Ltd. Co; Boston MA, USA). Finally, electron-micrographs of conidia were taken under a scanning electron microscope JEOL JSM-53110 LV (Bozzola and Russell, 1999). Following these procedures, images revealed smooth conidia with a protruding hilum (Figure 1).

For the pathogenicity tests, eight monoconidial fungal isolates were grown on PDA at 24 °C in darkness for 9 days. Three mL of sterile distilled water were added to the colonies and the mycelium with conidia were dislodged from the medium using an inoculation loop; 0.2 mL of the conidial suspensions were evenly distributed over a Petri dish 90 mm in diameter containing PDA medium, and incubated at the same temperature. The

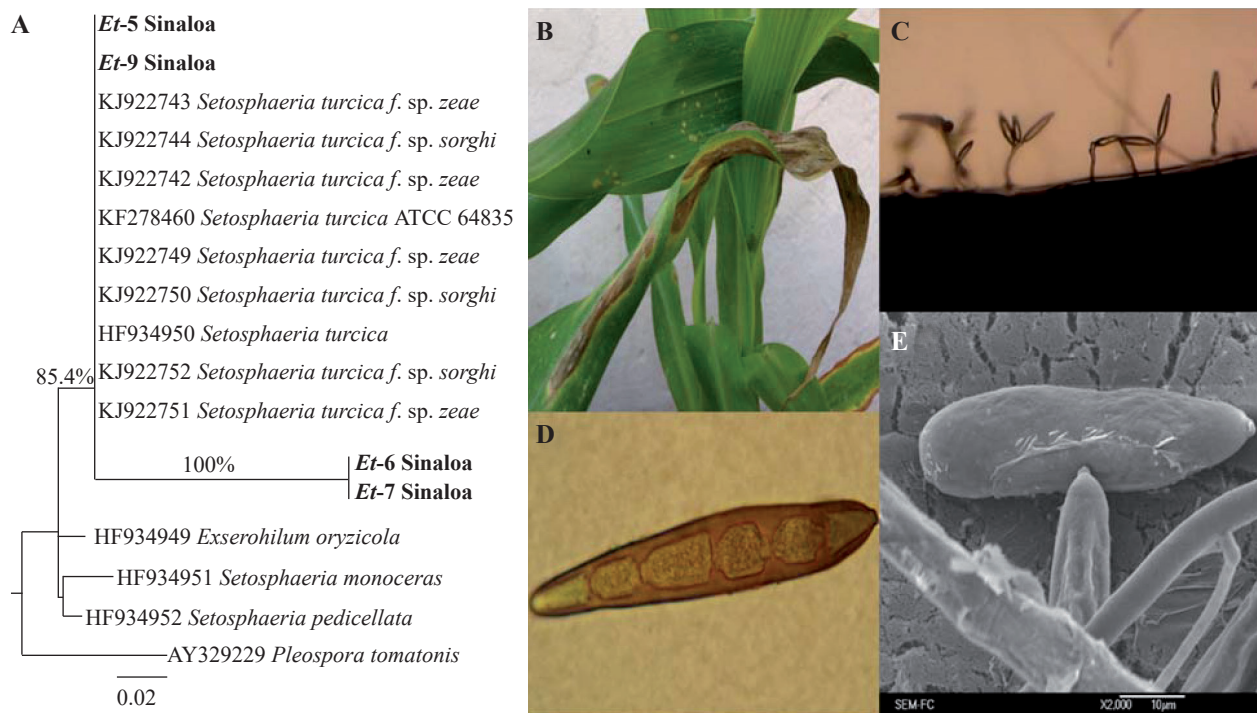


Figura 1. Análisis filogenético de aislados asociados al tizón foliar del maíz de Sinaloa. A) Árbol de verosimilitud (Log likelihood= -1276.64) basado en el traductor interno de espacios (ITS) de cuatro aislados de *Exserohilum* (*Setosphaeria* se refiere al telomorfo of *Exserohilum*). El árbol fue construido con Mega 6.06 (bootstrap = 1000), usando el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con sitios invariados (+I). Los aislados caracterizados en este estudio aparecen en negritas. La secuencia correspondiente de *Pleospora tomatonis* fue usada como un grupo externo *Et*=*E. turcicum*. Numero de acésion en la base de datos de las secuencias precede el nombre científico de los organismos. Los valores de bootstrap se muestran como porcentajes. La barra de escala indica le número esperado de sustituciones de aminoácidos.

Morfología de *E. turcicum* del maíz (aislado *Et-2*). B) Lesiones de forma elíptica del tizón foliar del maíz en el híbrido DK-300 inoculado artificialmente con *E. turcicum* en invernadero. C) Mono conidióforo recto o curvo con uno a tres conidios. D) Conidio con forma de mazo, con célula basal protuberante en el punto de conexión. E) Micrografía con microscopio electrónico de barrido de un conidio liso con un hilum protuberante en un cultivo de 8 días en PDA.

Figure 1. Phylogenetic analysis of isolates associated to maize leaf blight from Sinaloa. A) Maximum-likelihood tree (Log likelihood= -1276.64) based on the internal transcribed spacer (ITS) of four *Exserohilum* isolates (*Setosphaeria* refers to the telomorfo of *Exserohilum*). The tree was constructed with Mega 6.06 (bootstrap = 1000), using the Jukes-Cantor (JC) substitution model with invariant sites (+I). The isolates characterized in this study are in boldface. The corresponding sequence of *Pleospora tomatonis* was used as an out group. *Et*=*E. turcicum*. Database accession numbers of the sequences precedes the scientific names of organisms. Bootstrap values are shown as percentages. The scale bar indicates the expected number of amino acid substitutions.

Morphology of *E. turcicum* from maize (isolate *Et-2*). B) Elliptical-shaped lesions of maize leaf blight on maize hybrid DK-300 artificially inoculated with *E. turcicum* in the greenhouse. C) Conidiophore single straight or bent bearing one to three conidia. D) Conidium club-shaped with basal cell swollen at the point of attachment. E) Scanning electron micrograph of a smooth conidium showing a protruding hilum in 8-day culture on PDA.

Las muestras fueron montadas en portaobjetos de aluminio sobre una tira de carbón conductivo y cubiertas con una fina capa de oro en un ionizador

inoculated dishes were sealed with sealing film (Parafilm®) and placed upside down at 24 °C in the dark for 9 days. Conidia were scraped from the

Denton Vacuum Desk II (Hofstra Group, Ltd. Co; Boston MA, USA). Finalmente, se tomaron fotografías de conidios bajo un microscopio electrónico JEOL JSM-53110 LV (Bozzola and Russell, 1999). Mediante estos procedimientos, las imágenes revelaron conidios lisos con un hilum prominente (Figure 1).

Para las pruebas de patogenicidad, se cultivaron ocho aislados monoconidiales del hongo en PDA a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Se agregaron tres mL de agua destilada estéril a los cultivos y el micelio y los conidios fueron desprendidos del medio usando un asa bacteriológica; enseguida se distribuyeron 0.2 mL de las suspensiones conidiales sobre una placa de Petri con PDA de un diámetro de 90 mm e incubadas a la misma temperatura. Las placas inoculadas fueron selladas con película selladora (Parafilm®) y colocadas invertidas a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Los conidios fueron raspados de la superficie del medio usando una espátula esterilizada y la suspensión de conidios fue filtrada a través de dos capas de malla quesera esterilizada para remover el micelio. Se probó la patogenicidad de ocho aislados fúngicos monoconidiales asociados con el tizón foliar del maíz en el híbrido comercial de maíz DK-3000, que presentó una alta incidencia de la enfermedad en el ciclo agrícola previo. Se ajustó cada suspensión de conidios a una concentración de 2×10^4 conidios/mL con agua destilada estéril y fueron asperjadas sobre cuatro plantas de maíz en estado de desarrollo VS5-6. Las plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril. Después de la inoculación, las plantas fueron colocadas en bolsas de plástico negras para asegurar una humedad relativa (HR) del 100% por 48 h e incubadas a una temperatura de entre 12 y 15 °C. Las plantas inoculadas y las testigo se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones (4 macetas 25 x 20 cm, cada una con una planta). Después, las plantas se sometieron

surface of the medium using a sterile spatula and the conidial suspension was filtered through two layers of sterile cheese cloth to remove mycelium. Eight monoconidial fungal isolates associated with maize leaf blight were tested on the maize commercial hybrid DK-3000, which showed high incidence of the disease in the previous growing season. Each conidial suspension was adjusted to a concentration of 2×10^4 conidia/mL with sterile distilled water and sprayed on four maize plants at the VS5-6 developmental stage. Control plants were sprayed with sterile distilled water. After inoculation, plants were placed in black plastic bags to ensure 100% relative humidity (RH) for 48 h and incubated at 12-15 °C. Inoculated and control plants were arranged in a completely randomized block design with four replications (4 pots 25 x 20 cm, each with one plant). Afterwards, plants were subjected to 100% RH for five consecutive days for 12 h daily. The pathogenicity of the isolates was determined 14 days after inoculation, considering the percentage of foliage area diseased (FAD) of plants in the various replications. The experiment was conducted twice in a greenhouse. Greenhouse temperature ranged 8 - 26 °C and 12 - 30 °C in the first and second experiment, respectively. In order to standardize data, percentages of FAD were arcsin transformed. The transformed data were analyzed using ANOVA and the mean separation was achieved following Tukey's test (Little and Hills, 1973). To fulfill Koch's postulates, by the end of the experimental periods, the fungus was isolated from inoculated plants and its identity confirmed using morphological identification of twenty conidia per isolate. All eight isolates of *Et* tested were pathogenic on the maize hybrid DK-3000. Variation in virulence was detected among the isolates. Ten days after inoculation, maize leaves showed typical lesions and blight symptoms similar to those observed under field conditions (Figure 1).

a una HR de 100% por cinco días consecutivos por 12 h al día. La patogenicidad de los aislados fue determinada 14 días después de la inoculación, considerando el porcentaje de área foliar afectada (AFA). El experimento se realizó dos veces en un invernadero. La temperatura del invernadero fluctuó entre 8 y 26 °C, y 12 y 30 °C en el primer y segundo experimento, respectivamente. Para estandarizar los datos, los porcentajes de AFA fueron transformados usando la función de arcoseno. Los datos transformados fueron analizados usando ANOVA y la separación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Little y Hills, 1973). Para cumplir el postulado de Koch, al concluir los de los periodos experimentales, el hongo fue aislado de las plantas inoculadas y su identidad fue confirmada por medio de la identificación morfológica de veinte conidios por aislado. Los ocho aislados de *Et* probados fueron patogénicos en el híbrido de maíz DK-3000. Se detectó variación en virulencia entre los aislados. Diez días después de la inoculación, las hojas de maíz presentaban lesiones típicas y síntomas de tizón foliar similares a los observados en campo (Figura 1). El AFA en las plantas inoculadas varió entre 9.5 y 54.1% y entre 9.0 y 26.9%, con diferencias significativas ($P=0.05$) entre aislados en el primer y segundo experimento, respectivamente. Las plantas control asperjadas con agua destilada estéril permanecieron asintomáticas a lo largo del estudio.

Para la caracterización molecular, la región ITS rDNA fue amplificada usando los primers universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL con un template de ADN de 1 ng, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cebadores sentido y anti-sentido y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brazil, Cat. No. 11615-050). El termociclador se programó para la desnaturalización inicial a 95 °C

FAD in inoculated plants varied from 9.5 to 54.1% and from 9.0 to 26.9%, with significant differences ($P=0.05$) among isolates, in the first and second experiment, respectively. Control plants sprayed with sterile distilled water remained asymptomatic during the study.

For molecular characterization, the ITS rDNA region was amplified using the universal primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). PCR was performed in a 25 µL volume containing 1 ng DNA template, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each dNTP, 0.4 µM of forward and reverse primers, and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil, Cat. No. 11615-050). The thermocycler was programmed for initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C, annealing at 54 °C, extension at 72 °C, each for 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis (1% w/v in 0.5 X TAE) and visualized by ethidium bromide staining. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Cat. No. 28106) and quantified using a Nanodrop 2000. PCR products were sequenced in both directions with an ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems, USA). Sequences were edited in CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) and compared to sequences in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST-N software and the Megablast algorithm. All sequences were deposited in GenBank under the following accession numbers KT253948-KT253952. MEGA 6.06 was used for alignment and phylogenetic analysis. Sequences were aligned together with reference sequences of *Exherohilum/Setosphaeria* species (Tang *et al.*, 2015), using the MUSCLE alignment program. Multiple alignments were subjected to a DNA substitution model analysis in MEGA, to select

por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, anillado a 54 °C, extensión a 72 °C, cada uno por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% w/v en 0.5 X TAE) y visualizados por tinción de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados con el equipo de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Cat. No. 28106) y cuantificados usando un Nanodrop 2000. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA). Las secuencias fueron editadas en CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) y comparados con las secuencias en el NCBI (Centro Nacional para la Investigación Biotecnológica) usando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast. Todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso KT253948-KT253952. Para la alineación y el análisis filogenético se usó el MEGA 6.06. Las secuencias fueron alineadas con las secuencias de referencia de especies *Exherohilum/Setosphaeria* (Tang *et al.*, 2015), usando el programa de alineación MUSCLE. Múltiples alineaciones fueron sujetas a un análisis de modelo de sustitución de ADN en MEGA para seleccionar el modelo que mejor se ajustara a los datos. Se creó un árbol filogenético usando el modelo Jukes-Cantor (JC) y el modelo de verosimilitud (ML). La variación de la tasa entre sitios fue modelado por una proporción de sitios invariantes (I). El apoyo de la topología del árbol fue evaluado por 1000 réplicas bootstrap.

Secuencias de *S. turcica* (teleomorfo de *Et*) y de diferentes especies de *Setosphaeria/Exserohilum* (*E. oryziphila*, *S. monoceras*, *S. pedicellata*) fueron usadas para llevar a cabo el análisis filogenético. Las secuencias de *S. turcica* incluyeron aislados obtenidos del maíz (HF934950, KF278460; secuencia del cultivo de referencia, ATCC64835), algunos de éstos fueron identificados como *formae*

the model that best fits the data. A phylogenetic tree was constructed using the Jukes-Cantor (JC) model and the maximum likelihood (ML) method. The rate variation among sites was modeled by a proportion of invariant sites (I). Tree topology support was assessed by 1 000 bootstrap replicates.

Sequences from *S. turcica* (teleomorph of *Et*) and from different species of *Setosphaeria/Exserohilum* (*E. oryziphila*, *S. monoceras*, *S. pedicellata*) were used to conduct the phylogenetic analysis. *S. turcica* sequences included isolates obtained from maize (HF934950, KF278460; reference culture sequence, ATCC64835), some of these identified as *formae specialis zaeae* (all KJ Genbank numbers except for KJ922752) and from sorghum identified as *formae specialis sorghi* (KJ922752) (Tang *et al.*, 2015). The maximum likelihood phylogenetic tree generated with the ITS rDNA sequences showed that the isolates from Sinaloa are closely related to *S. turcica* sequences obtained from maize and sorghum (Tang *et al.*, 2015). These sequences are clearly separated from other *Exherohilum/Setosphaeria* species (Figure 1). Isolates *Et-6* and *Et-7* were different from the rest of *Et* sequences included, but still grouped within *S. turcica*.

Cultural and morphometric characteristics of conidia, colony morphology, and sequencing of the ITS rDNA region of the anamorph indicated that *E. turcicum* [(Pass.) (Leonard and Suggs)] (syn. *Helminthosporium turcicum* Pass.) is the causal agent of the maize leaf blight in Sinaloa, as reported in other maize growing areas in the world (Shi *et al.*, 2017). The analysis performed does not allow to discriminate at the *formae specialis* level. Recent studies have demonstrated the utility of universally primed polymerase chain reaction (UP-PCR) technology to characterize the genetic diversity and phylogenetic relationships among the *formae specialis* of *Et* (Tang *et al.*, 2015). In future, this approach would be useful in the process of discriminating the existence of *formae specialis* in Sinaloa.

specialis zae (todos los números KJ Genbank excepto por KJ922752) y de sorgo identificadas como *formae specialis sorghi* (KJ922752) (Tang *et al.*, 2015). El árbol filogenético de verosimilitud generado con las secuencias ITS rDNA demostraron que los aislados de Sinaloa guardan estrecha relación con secuencias de *S. turcica* obtenidas de maíz y sorgo (Tang *et al.*, 2015). Estas secuencias están claramente separadas de otras especies *Exherohilum/Setosphaeria* (Figura 1). Los aislados *Et-6* y *Et-7* fueron diferentes del resto de las secuencias *Et* incluidas, aunque igualmente agrupadas dentro de *S. turcica*.

Las características de las colonias y la morfometría de los conidios, y la secuenciación de la región ITS rDNA del anomorfo indicaron que *E. turcicum* [(Pass.) (Leonard y Suggs)] (syn. *Helminthosporium turcicum* Pass.) es el agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa, tal como se ha reportado en otras áreas productoras de maíz del mundo (Shi *et al.*, 2017). El análisis llevado a cabo no permite discriminar al nivel del *formae specialis*. Estudios recientes han demostrado la utilidad de la reacción en cadena de polimerasa cebada universalmente (UP-PCR) para caracterizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre los *formae specialis* de *Et* (Tang *et al.*, 2015). En el futuro, este enfoque será útil en el proceso de discriminación de la existencia de *formae specialis* en Sinaloa.

La severidad del tizón foliar de maíz fue evaluado en 115 parcelas comerciales que variaban desde el estado de espigamiento hasta grano masoso en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa en la temporada de cultivo 2013-2014. Las parcelas inspeccionadas iban desde las 10 hasta las 50 ha. Cada parcela fue muestreada en las 4 esquinas y en el centro para la severidad de la enfermedad; diez plantas fueron extraídas de cada punto de muestreo y una hoja fue tomada al azar de las plantas, para un total de 150 hojas por cada parcela. El porcentaje

The severity of maize leaf blight was assessed in 115 commercial fields ranging from tasseling through kernel dough stage in the municipalities of Ahome and El Fuerte, Sinaloa in the 2013-2014 growing season. The fields inspected ranged from 10 to 50 ha. Each field was sampled in the 4 corners and the center for disease severity; ten plants were taken from each sampling point and one leaf was taken randomly from the plants totaling 150 leaves per field. The average percentage of foliar area diseased (FAD) was determined using a scale ranging 0-4, where 0=No detectable lesion, 1=a few lesions on the leaves ($\leq 5\%$), 2= several small and large lesions on many leaves (5.1-10%), 3=lesions on many leaves (10.1-15%), 4=many enlarged lesions (15.1-20%) Ten symptomatic leaves from each field were placed in an ice chest (8-10 °C) and taken to the laboratory to determine whether *E. turcicum* was associated to the disease. The presence of the fungus on symptomatic tissue was confirmed by the observation of conidia under the stereo and compound microscopes.

The disease severity, reflected as percent FAD, varied according to hybrids and locations. Hybrid P3254W showed the highest disease severity, particularly in the sectors of Despensa-Bolsa de Tosalibampo No. 2, Olas Altas-Bachomobampo, San Isidro-Grullas Derecha, Ahome-Grullas Izquierda and Concheros-9 de Diciembre, with percentage FAD of 17.3, 13.3, 9.0, 7.6 and 3.5%, respectively. The same hybrid presented a reduced disease severity in sectors Aguila Azteca-El Guayabo, El Fuerte, 5 de Mayo-Sufragio, Santa Rosa-Los Tercos with AFA of 3.2, 0.8, 0.4, 0.0 %, respectively. Hybrids XR56 and Máximo exhibited AFA of 11.0% in sector Olas Altas-Bachomobampo. Where hybrid P3254W presented highest disease severity. The hybrids DK 2030, Sultán, Gorila, DK.2038, N1R01, P3254W, XR47, Garañón, MN1078, Caribú, DK3000, Máximo, DK

promedio de área foliar afectada (AFA) fue determinado usando una escala del 0 al 4, donde 0= ninguna lesión detectable, 1= algunas lesiones en las hojas ($\leq 5\%$), 2= varias lesiones pequeñas y grandes en muchas hojas (5.1-10%), 3= lesiones en muchas hojas (10.1-15%), 4= muchas lesiones grandes (15.1-20%). Diez hojas sintomáticas de cada parcela fueron colocadas en una hielera (8-10 °C) y llevadas al laboratorio para determinar si *E. turcicum* estaba asociada a la enfermedad. La presencia del hongo en tejido sintomático fue confirmada por la observación de conidios bajo el microscopio estereoscópico y compuesto.

La severidad de la enfermedad, reflejada como porcentaje de AFA, varió con los híbridos y las ubicaciones. El híbrido P3254W presentó la severidad más alta, particularmente en los sectores de Despensa-Bolsa de Tosalibampo No. 2, Olas Altas-Bachomobampo, San Isidro-Grullas Derecha, Ahome-Grullas Izquierda y Concheros-9 de Diciembre, con porcentajes de AFA de 17.3, 13.3, 9.0, 7.6 y 3.5%, respectivamente. El mismo híbrido presentó una severidad reducida de la enfermedad en los sectores Águila Azteca-El Guayabo, El Fuerte, 5 de Mayo-Sufragio, Santa Rosa-Los Tercos con un AFA de 3.2, 0.8, 0.4, 0.0 %, respectivamente. Los híbridos XR56 y Máximo presentaron un AFA de 11.0% en el sector Olas Altas-Bachomobampo, donde el híbrido P3254W presentó la mayor severidad. Los híbridos DK 2030, Sultán, Gorila, DK.2038, N1R01, P3254W, XR47, Garañón, MN1078, Caribú, DK3000, Máximo, DK 2036, Máximo y DS2301 presentaron un porcentaje promedio de AFA de entre 0.0 y 4.6 %. Los episodios diarios acumulados, en horas, con la humedad relativa (HR) $\geq 90\%$ en el sector Despensa-Bolsa de Tosalibampo No2 del 16 de diciembre de 2013 al 1 de enero de 2014, donde el híbrido P3254W mostró la mayor severidad de tizón foliar, alcanzó las 317 hr mientras que en el sector 5, de Mayo-Sufragio,

2036, Máximo and DS2301 exhibited an average percentage FAD ranging from 0.0 to 4.6% of AFA. The accumulated daily episodes, in hours, with relative humidity (RH) $\geq 90\%$ in sector Despensa-Bolsa de Tosalibampo No2 from December 16, 2013, through January 01, 2014, where the hybrid P3254W showed the highest severity of foliar blight, reached 317 hr, while in sector 5, de Mayo-Sufragio such time periods were of 184 hr and the same hybrid showed 0.4% FAD. In general, a gradual decrement of maize blight was observed, regardless of the hybrid, as distance from the shoreline and elevation increased, from 4 to 100 km and from 0 to 80 masl, respectively.

CONCLUSIONS

The identity of *E. turcicum*, consistently associated to the maize leaf blight disease in Sinaloa, was confirmed by morphometric measurements of conidia, colony morphology, molecular techniques and pathogenicity tests. The present study establishes the starting point for future research dealing with the pathogenic variation of *Et* which is crucial in breeding programs to obtain resistant maize hybrids for the management of the disease.

The high dependence of the pathogen with high relative humidity was evident since the severity of the disease in the most susceptible hybrid was conspicuous in sectors with prolonged periods of relative humidity $\geq 90\%$, but decreased with the decrements of periods with lower humidities.

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

dichos periodos de fueron de 184 hr y el mismo híbrido presentó un AFA de 0.4%. En general, se observó una reducción gradual de tizón foliar del

maíz, independientemente del híbrido a medida que aumentaba la distancia a partir de la costa y la elevación de 4 a 100 km y de 0 a 80 msnm, respectivamente.

## CONCLUSIONES

La identidad de *E. turcicum*, consistentemente asociado al tizón foliar del maíz en Sinaloa, fue confirmado mediante medidas morfométricas de los conidios, morfología de las colonias, técnicas moleculares y pruebas de patogenicidad. El presente estudio establece el punto de partida para investigaciones futuras orientadas a la variación patogénica de *Et*, que es fundamental en programas de mejoramiento para obtener híbridos de maíz resistentes para el manejo de la enfermedad.

La alta dependencia del patógeno de la humedad relativa alta fue evidente, ya que la severidad de la enfermedad en el híbrido más susceptible fue

conspicuo en sectores con periodos prolongados de humedad relativa  $\geq 90\%$ , aunque se redujo paralelamente con la reducción de periodos con humedad relativa a dichos niveles.

## LITERATURA CITADA

- Bozzola JJ and Russell LD. 1999. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers. London, UK. 670 p.
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 355p.
- Little TM and Hills FJ. 1973. Agricultural Experimentation and Analysis. John Wiley and Sons, New York, USA. 350p.
- Shi NN, Du YX, Ruann HC, Yang XJ, Dai YL, Gan L, Chen FR and Liu XZ. 2017. First report of northern corn leaf blight caused by *Setosphaeria turcica* on Corn (*Zea mays*) in Fujian Province, China. Plant Disease 101:831. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-0942-PDN>
- Tang L, Gao ZG, Yao Y and Liu X. 2015. Identification and genetic diversity of formae speciales of *Setosphaeria turcica* in China. Plant Disease 99:482-487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0570-RE>