

Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Producción de metabolitos secundarios inducida por quitosano en extractos vegetales de *Piper auritum* y actividad fungicida *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

¹María del Socorro Fernández, ¹Flavio Hernández-Ochoa, ²Oscar Carmona-Hernández, ³Mauricio Luna-Rodríguez, ¹Facultad de Biología, ²Posgrado en Ciencias Agropecuarias. ³Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C. P. 91090, Xalapa, Veracruz, México; **Carolina Barrientos-Salcedo**, Facultad de Bioanálisis Veracruz, Universidad Veracruzana, Iturbide s/n, Centro, C. P. 91700. Veracruz, Veracruz, México; **Hugo Asselin**, School of Indigenous Studies, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, Rouyn-Noranda, Canada; **José Armando Lozada-García***

* Corresponding author: alozada@uv.mx

Recibido: 22 de Junio, 2020.

Aceptado: 22 de Septiembre, 2020.

Fernández M del S, Hernández-Ochoa F, Carmona-Hernández O, Luna-Rodríguez M, Barrientos-Salcedo C, Asselin H and Lozada-García JA. 2021. Chitosan induced the production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-6>

Primera publicación DOI: 13 de Octubre, 2020.

First DOI publication: October 13, 2020.

Abstract. The effect of chitosan addition on the production of secondary metabolites of *Piper auritum* ethanolic extracts was tested, as well as the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium*

Resumen. Se probó el efecto del quitosano sobre la producción de metabolitos secundarios de extractos etanólicos de *Piper auritum*, así como la actividad fungicida *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Las plantas de *P. auritum* se dividieron en seis parcelas y se añadió quitosano comercial a la mitad de ellas. Se midieron las concentraciones de flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides y ácido salicílico en extractos etanólicos de *P. auritum* y la actividad antifúngica se midió con la concentración efectiva media (CE50). Las concentraciones totales de flavonoides, fenoles y terpenos fueron más altas con el tratamiento con quitosano (sin quitosano 12.8 *versus* con quitosano 12.4 µg equivalente de quercetina por mg, 12.6 *versus* 2.3 µg equivalente de ácido tánico por 10 mg y 16.3 *versus* 11.6 mg equivalente de mentol por

oxysporum f. sp. *vanillae*. *Piper auritum* plants were divided into six parcels and commercial chitosan was added to half of them. The concentrations of flavonoids, phenols, terpenes, alkaloids and salicylic acid were measured in *P. auritum* ethanolic extracts and the antifungal activity was measured with the median effective concentration (EC_{50}). The concentrations of total flavonoids, phenols and terpenes were higher with chitosan treatment (respectively 12.8 vs 12.4 μg quercetin equivalent per mg, 12.6 vs. 2.3 μg tannic acid equivalent per 10 mg, and 16.3 vs. 11.6 mg menthol equivalent per 100 mg). However, the alkaloid concentration was reduced by chitosan addition (from 148.2 to 84.5 μg piperine equivalent per mg). Chitosan addition increased the concentration of salicylic acid (from 1.3 to 2.2 μg salicylic acid equivalent per mg). A 4 mg mL⁻¹ ethanolic extract of *P. auritum* treated with chitosan inhibited 100% of mycelial growth. The EC_{50} of *P. auritum* against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was lower with chitosan treatment (1.5 mg mL⁻¹) compared to control (5.1 mg mL⁻¹). Chitosan addition increased secondary metabolite production and *in vitro* antifungal activity in *P. auritum* extracts.

Key words: ethanolic extracts, Mexican pepperleaf, hoja santa

Secondary metabolites, such as alkaloids, flavonoids, terpenes and phenols, are molecules synthesized by plants as defense mechanisms against pathogen attacks (Scott *et al.*, 2008). Other molecules, such as chitosan, can be used to elicit secondary metabolite production in plants (López-Moya *et al.* 2019). Plant-produced secondary metabolites can be used as bioplaguicidas (Báez-Valdez *et al.*, 2010), providing environmentally friendly alternatives to the chemical control of

100 mg). Mientras que la concentración de alcaloides disminuyó mediante la adición de quitosano (de 148.2 a 84.5 μg de equivalente de piperina por mg). La adición de quitosano aumentó la concentración de ácido salicílico (de 1.3 a 2.2 μg de equivalente de ácido salicílico por mg). La concentración de 4 mg mL⁻¹ de extracto etanólico de *P. auritum* tratado con quitosano inhibió el 100% del crecimiento micelial. El tratamiento con quitosano generó que la CE_{50} de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* fuera menor (1.5 mg mL⁻¹) respecto al control (5.1 mg mL⁻¹). Se concluye que la adición de quitosano aumentó la producción de metabolitos secundarios y la actividad antifúngica *in vitro* en extractos de *P. auritum*.

Palabras clave: extractos etanólicos, pimienta mexicana, hoja santa

Los metabolitos secundarios, como los alcaloides, flavonoides, terpenos y fenoles son moléculas que las plantas sintetizan como mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos (Scott *et al.*, 2008). Otras moléculas, como el quitosano, se pueden utilizar para obtener la producción de metabolitos secundarios en las plantas (López-Moya *et al.* 2019). Los metabolitos secundarios que producen las plantas se pueden utilizar como bioplaguicidas (Báez-Valdez *et al.*, 2010) y, por tanto, constituyen alternativas ecológicas para remplazar el control químico de patógenos como *Fusarium*, un hongo que ataca el sistema vascular de las plantas, que causa enfermedades en varias especies vegetales y frutícolas (Dweba *et al.*, 2017; McGovern, 2015) y considerables pérdidas económicas. El control biológico de *Fusarium* se puede llevar a cabo utilizando compuestos naturales sintetizados por algunas especies vegetales del género *Piper* (Scott *et al.*, 2008), ya que se ha reportado que los aceites esenciales y los extractos tienen efectos fungici-

pathogens such as *Fusarium*, a fungus that attacks the vascular system of plants and causes diseases in several vegetable and fruit species (Dweba *et al.*, 2017; McGovern, 2015) leading to serious economic loss. Biological control of *Fusarium* can be achieved with natural compounds synthesized by some plant species of the genus *Piper* (Scott *et al.*, 2008), which have been shown to have fungicidal effects on *F. solani* f. sp. *piperis* and *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (da Luz *et al.*, 2017; Suprapta and Ohsawa, 2007). The fungicidal activity of *Piper* can be attributed to resistance genes such as those developed by some black pepper (*P. nigrum*) cultivars that produce secondary metabolites when attacked by *F. solani* f. sp. *piperis* (da Luz *et al.*, 2017). Similarly, at least three American *Piper* taxa were reported being resistant to *Fusarium*: low mortality of *P. divaricatum* exposed to *Fusarium* was attributed to secondary metabolite production, especially phenols (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016), the seeds and seedlings of *P. aduncum* are protected by essential oils (Potzernheim *et al.*, 2012), and *P. tuberculatum* expresses gene resistance when are treated with *F. solani* f. sp. *piperis*, which involves some of the same genes related to the systemic acquired resistance (SAR) in *P. nigrum* (Nascimento *et al.*, 2009).

SAR is a generalized defense mechanism of plants against a broad range of pathogens generated by different proteins regulating interactions at the interface of the cellular membranes (Ádám *et al.*, 2018). For example, the recognition of fungal chitin triggers a cascade of chemical signals, activating response genes that synthesize proteins such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL) responsible for flavonoid and phenol production through a biosynthesis pathway involving the phytohormone salicylic acid as a signal molecule (López-Moya *et al.*, 2019). Salicylic acid and chitosan are used together to induce plant resistance

as in *F. solani* f. sp. *piperis* and *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (da Luz *et al.*, 2017; Suprapta and Ohsawa, 2007). La actividad fungicida de *Piper* se atribuye a los genes de resistencia como los que desarrollan algunas variedades de pimienta negra (*P. nigrum*) que producen metabolitos secundarios cuando son atacados por *F. solani* f. sp. *piperis* (da Luz *et al.*, 2017). De igual manera, se han reportado por lo menos tres taxones americanos de *Piper* que son resistentes a *Fusarium*: la baja mortalidad de *P. divaricatum* expuesta a *Fusarium* fue atribuida a la producción de metabolitos secundarios, sobre todo fenoles (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016); las semillas y plántulas de *P. aduncum* están protegidas por aceites esenciales (Potzernheim *et al.*, 2012); y *P. tuberculatum* expresa resistencia genética cuando son tratados con *F. solani* f. sp. *piperis*, que incluye algunos de los mismos genes relacionados con la resistencia sistémica adquirida (RSA) en *P. nigrum* (Nascimento *et al.*, 2009).

La RSA es un mecanismo de defensa generalizado contra una amplia variedad de patógenos que generan las diferentes proteínas que regulan las interacciones en la interfaz de las membranas celulares (Ádám *et al.*, 2018). Por ejemplo, el reconocimiento de la quitina fúngica desencadena una cascada de señales químicas y activan los genes de respuesta que sintetizan las proteínas, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), responsable de la producción de flavonoides y fenoles mediante una ruta biosintética que incluye la fitohormona ácido salicílico como una molécula señal (López-Moya *et al.*, 2019). El ácido salicílico y el quitosano se utilizan juntos para inducir la resistencia de la planta a los patógenos. Ambos ofrecen una alternativa al uso de fungicidas porque modulan la RSA y estimulan la producción de fenoles, terpenos y flavonoides en respuesta a la infección causada por hongos como *Fusarium* (Golkar *et al.*, 2019). Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron

against pathogens. They provide an alternative to fungicides by modulating SAR and by stimulating the production of phenols, terpenes and flavonoids in response to infection by fungi such as *Fusarium* (Golkar *et al.*, 2019). Therefore, the objectives of this study were to evaluate the production of secondary metabolites of chitosan-treated plant extracts of *P. auritum* and to determine their *in vitro* fungicidal activity against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

A wild population of *P. auritum* was selected in the locality of San Andrés Tlalnelhuayocan, Veracruz, Mexico (-96.9776678 W; 19.29358 N; 1450 m asl), within a cloud forest on an andosol, subject to a wet temperate climate. The population included 72 mature plants with reproductive structures, which were divided into 6 parcels with 4 individuals each. Three parcels were treated with commercial chitosan (trademark VEPINSA, Sinaloa, Mexico) [low molecular weight (22,000 to 33,000 g mol⁻¹), 27 % chitosan in product, deacetylation 80 %, humidity 10 %, cinder 1.8%, viscosity (10g L⁻¹, 25 °C) 30 to 200 cps] dissolved to 1 mg mL⁻¹ concentration and pH 5.5 (Treatment A). The other three parcels were the control, treated with a Tween 80 solution at 0.01 % (v/v) with pH 5.5 (Treatment B). The treatments were applied every week for one month, following the methodology of Benhamou and Thériault (1992). After the treatments, 3 kg of fresh *P. auritum* (leaves, inflorescences, and stems) were collected and oven dried at 45 ± 5 °C before maceration, separating the treated and control samples by 1.5 m in the drier.

The phytochemical extraction was carried out with a Soxhlet, using 10 g of plant material mixed with ethanol and concentrated with a rotavapor (250 rpm at 45 °C) (Carmona-Hernández *et al.*, 2014). Total alkaloids were measured by spectrophotometry with 544 nm absorbance using

evaluar la producción de metabolitos secundarios de extractos de plantas de *P. auritum* tratadas con quitosano y determinar su actividad fungicida *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Se seleccionó una población silvestre de *P. auritum* en la localidad de San Andrés Tlalnelhuayocan, Veracruz, México (-96.9776678 O; 19.29358 N; 1450 msnm); las muestras se recolectaron en un bosque nuboso con suelo tipo andosol y clima templado húmedo. La población incluyó 72 plantas maduras con estructuras reproductivas, que se distribuyeron en 6 parcelas con 4 individuos en cada una. Se trataron tres parcelas con quitosano comercial (marca VEPINSA, Sinaloa, México) [de bajo peso molecular (de 22,000 a 33,000 g mol⁻¹), 27% de quitosano en el producto, 80% de desacetilación, 10% de humedad, 1.8% de ceniza, viscosidad (10g L⁻¹, 25 °C) 30 a 200 cps] disuelto a una concentración de 1 mg mL⁻¹ y pH 5.5 (Tratamiento A). Las otras tres parcelas fueron el control, tratado con una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v) con pH 5.5 (Tratamiento B). Los tratamientos se aplicaron cada semana por un mes, siguiendo la metodología de Benhamou y Thériault (1992). Después de los tratamientos, se recolectaron 3 kg de *P. auritum* fresca (hojas, inflorescencias y tallos) y se secaron en estufa a 45 ± 5 °C antes de la maceración, separando las muestras tratadas y el control a una distancia de 1.5 m en el secador.

La extracción fitoquímica se llevó a cabo con un Soxhlet, utilizando 10 g de material vegetal mezclado con etanol y concentrado en un evaporador rotativo (250 rpm a 45 °C) (Carmona-Hernández *et al.*, 2014). Los alcaloides totales se midieron por espectrofotometría con 544 nm de absorbancia utilizando el método verde de bromocresol, y los resultados se expresaron en µg de equivalente de piperina (EP) por mg de extracto (Tiwari *et al.*, 2017). Para los flavonoides totales, se utilizó el método de reducción de aluminio con 420 nm

the bromocresol green method and the results were expressed in μg of piperine equivalent (PE) per mg of extract (Tiwari *et al.*, 2017). For total flavonoids, the aluminum reduction method was used with 420 nm absorbance and the results were expressed as μg quercetin equivalent (QE) per 10 mg of extract (Blainski *et al.*, 2013). For the total phenols, the Folin-Ciocalteu reagent was used with 760 nm absorbance and the results were expressed as μg tannic acid equivalent (TAE) per 10 mg of extract (Blainski *et al.*, 2013). The total terpenes were obtained following the methodology of Ghorai *et al.* (2012) and the results were expressed as mg menthol equivalent (ME) per 100 mg of extract. The salicylic acid response hormone was measured using the methodology of Rahman *et al.* (2016): 1000 μL of ethanolic extract (1 mg mL^{-1}) was added to 50 μL ClFe_3 and 950 μL bidistilled water and the absorbance measured at 540 nm. The results were expressed as μg salicylic acid equivalent (SAE) per mg of extract. Five replicas of each analysis were carried out.

The *in vitro* inhibitory activity of *P. auritum* extracts was tested using fungal cultures of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* in Petri dishes (90 mm diameter) for three replicas with five concentrations of extracts (0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 mg mL^{-1}) and a control (EtOH), added to potato dextrose agar (PDA). The tests were performed by placing 5 mm of mycelium in the center of the Petri dishes. Diameter growth was measured after five days incubation at 27 °C (Rongai *et al.*, 2015). Percentage of inhibition was calculated with the following formula: % growth inhibition = ((control growth – treatment growth) / control growth) * 100.

The STATISTICA 10 software was used to perform ANOVAs with post hoc Tukey tests. The median effective concentration (EC_{50}) was estimated with a probit model using the Biostat 6.0 software (Amini and Sidovich, 2010).

de absorbancia y los resultados se expresaron como μg de equivalente de quercetina (EQ) por 10 mg de extracto (Blainski *et al.*, 2013). Para el total de fenoles, se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu con 760 nm de absorbancia expresada como μg de equivalente de ácido tánico (EAT) por 10 mg de extracto (Blainski *et al.*, 2013). Los terpenos totales se obtuvieron siguiendo la metodología de Ghorai *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de equivalente de mentol (EM) por 100 mg de extracto. La respuesta de la fitohormona ácido salicílico se midió utilizando la metodología de Rahman *et al.* (2016): se agregaron 1000 μL de extracto etanólico (1 mg mL^{-1}) a 50 μL de ClFe_3 y 950 μL de agua bidestilada, y la absorbancia se midió a 540 nm. Los resultados se expresaron como μg de equivalente de ácido salicílico (EAS) por mg de extracto. Se realizaron cinco réplicas de cada análisis.

La actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de *P. auritum* se probó utilizando cultivos fúngicos de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* en placas Petri (de 90 mm diámetro) con tres réplicas y cinco concentraciones de extractos (0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 mg mL^{-1}) y un control (EtOH), añadidos al papa dextrosa (PDA). Las pruebas se realizaron colocando 5 mm de micelio en el centro de las placas Petri. El crecimiento del diámetro se midió cinco días después de la incubación a 27 °C (Rongai *et al.*, 2015). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: % inhibición de crecimiento = ((crecimiento del control – crecimiento del tratamiento) / crecimiento del control) * 100.

Para el análisis de varianza (ANEVA) se utilizó el programa STATISTICA 10 con las pruebas post hoc de Tukey. La concentración efectiva media (EC_{50}) se estimó con un modelo probit y el programa Biostat 6.0 (Amini y Sidovich, 2010).

Hubieron diferencias significativas en la producción de metabolitos secundarios entre los extractos de plantas de *P. auritum* con y sin tratamiento de

There were significant differences in the secondary metabolite production between the *P. auritum* plant extracts with and without chitosan treatment (Table 1). In line with previous studies with other plant species, the concentrations of flavonoids, terpenes and phenols were significantly higher ($P < 0.05$) in the chitosan-treated plant extracts. For example, the application of chitosan (200 mg) to *Hypericum perforatum* induced flavonoid production (Brasili *et al.*, 2014), terpene production increased with chitosan addition (1 g) in *Mentha piperita* (Chang *et al.*, 1998), and phenol concentrations were higher with chitosan treatment (200, 500 and 1000 ppm) in extracts of *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Yin *et al.*, 2012). According to López-Moya *et al.* (2019), the chitosan treatment increased the production of salicylic acid in plants; which can trigger the production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), in turn exacerbating the production of flavonoids, terpenes, and phenols, which might contribute to generate the SAR (Wiesel *et al.*, 2014). Contrary to the positive effect

quitosano (Cuadro 1). Conforme a estudios anteriores en los que se utilizaron otras especies vegetales, las concentraciones de flavonoides, terpenos y fenoles fueron significativamente más altas ($P < 0.05$) en los extractos de plantas tratadas con quitosano. Por ejemplo, la aplicación de quitosano (200 mg) a *Hypericum perforatum* indujo la producción de flavonoides (Brasili *et al.*, 2014), la producción de terpeno aumentó con la adición de quitosano (1 g) en *Mentha piperita* (Chang *et al.*, 1998) y las concentraciones de fenol fueron más altas con el tratamiento de quitosano (200, 500 y 1000 ppm) en extractos de *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Yin *et al.*, 2012). Al igual que en el estudio de López-Moya *et al.* (2019), el tratamiento de quitosano aumentó la producción de ácido salicílico en las plantas, que puede desencadenar la producción de fenilalanina amonio liasa (PAL), exacerbando la producción de flavonoides, terpenos y fenoles, lo cual pudo haber contribuido a la RSA (Wiesel *et al.*, 2014). A diferencia del efecto positivo en los flavonoides, terpenos y fenoles, el tratamiento con

Table 1. Mean concentration (with standard deviation and coefficient of variation) of secondary metabolites and salicylic acid in *Piper auritum* extracts with and without chitosan treatment.

Cuadro 1. Concentración media (con desviación estándar y coeficiente de variación) de metabolitos secundarios y ácido salicílico en extractos de *Piper auritum* con y sin tratamiento de quitosano.

Metabolite	Treatment	Mean concentration	Standard deviation	Coefficient of variation
Alkaloids	A	84.5 ^a	1.1	0.8
	B	148.2 ^b	0.8	0.9
Flavonoids	A	12.8 ^b	0.1	1.0
	B	12.4 ^a	0.1	0.5
Phenols	A	12.6 ^b	0.0	1.7
	B	2.3 ^a	0.2	1.9
Terpenes	A	16.3 ^b	0.3	2.7
	B	11.6 ^a	0.4	2.7
Salicylic acid	A	2.2 ^b	0.1	7.5
	B	1.3 ^a	0.0	1.2

A: with chitosan, B: without chitosan. / A: con quitosano; B: sin quitosano.

Alkaloids: $\mu\text{g EP mg}^{-1}$, Flavonoids: $\mu\text{g EQ mg}^{-1}$, Phenols: $\mu\text{g Eat } 10 \text{ mg}^{-1}$, Terpenes $\text{mg EM}/100 \text{ mg}$, Salicylic acid: $\mu\text{g ESA mg}^{-1}$. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in mean metabolite concentration. / Alcaloides: $\mu\text{g EP mg}^{-1}$, Flavonoides: $\mu\text{g EQ mg}^{-1}$, Fenoles: $\mu\text{g Eat } 10 \text{ mg}^{-1}$, Terpenos $\text{mg EM}/100 \text{ mg}$, Ácido salicílico: $\mu\text{g ESA mg}^{-1}$. Las diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración media de metabolitos.

on flavonoids, terpenes and phenols, the chitosan treatment significantly decreased the concentration of alkaloids ($P < 0.05$). Such an effect has previously been reported in *Stemona curtisii* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999) at concentrations of chitosan higher than 0.1 mg mL^{-1} , in less than 4 weeks.

The median effective concentration (EC_{50}) of *P. auritum* extracts against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was significantly lower with chitosan treatment ($EC_{50} = 1.473 \text{ mg mL}^{-1}$; standard error = 0.288) than in the control ($EC_{50} = 5.123 \text{ mg mL}^{-1}$; standard error = 0.646) ($P < 0.001$). The inhibition curve shows that the highest concentration *P. auritum* ethanolic extract (4 mg/mL) caused 100% inhibition of *Fusarium* growth with chitosan treatment, compared to 41% without chitosan (Figure 1). Fungicidal activity of *P. auritum* against *F. oxysporum* and other phytopathogenic fungi has previously been reported by Pineda *et al.*, (2012), which could be attributed to high

quitosano disminuyó significativamente ($P < 0.05$) la concentración de alcaloides. Este efecto fue reportado anteriormente en *Stemona curtisii* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999) a concentraciones de quitosano de más de 0.1 mg mL^{-1} , en menos de 4 semanas.

La concentración efectiva media (EC_{50}) de extractos de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* fue significativamente menor con el tratamiento de quitosano ($EC_{50} = 1.473 \text{ mg mL}^{-1}$; error estándar = 0.288) que la del control ($EC_{50} = 5.123 \text{ mg mL}^{-1}$; error estándar = 0.646) ($P < 0.001$). La curva de inhibición muestra que la concentración más alta de extracto etanólico de *P. auritum* (4 mg/mL) inhibió el 100% del crecimiento de *Fusarium* con el tratamiento de quitosano comparado con el 41% sin quitosano (Figura 1). La actividad fungicida de *P. auritum* contra *F. oxysporum* y otros hongos fitopatógenicos fue anteriormente reportada por Pineda *et al.* (2012). La actividad podría ser atribuida a las altas concentraciones de fenoles, flavonoides y

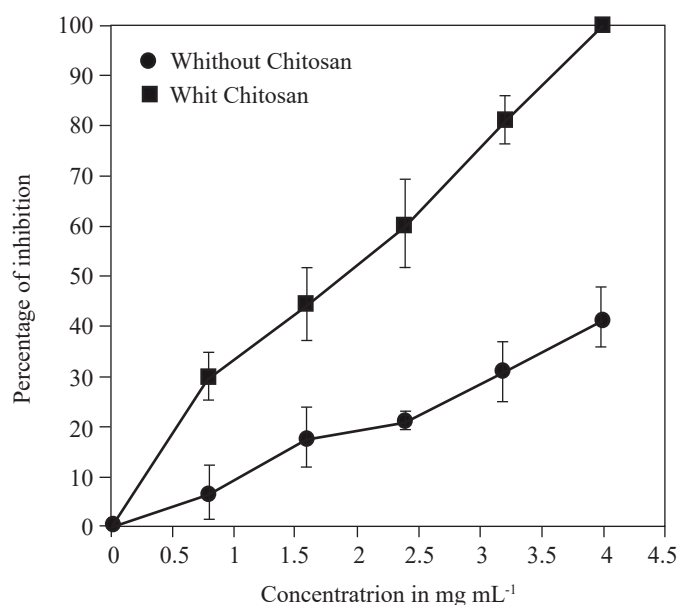


Figure 1. Fungicidal activity ethanolic extracts of *Piper auritum* against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* previously treated with chitosan (mean and standard error).

Figura 1. Extractos etanólicos de la actividad fungicida de *Piper auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* previamente tratada con quitosano (media y errores estándar).

concentrations of phenols, flavonoids and terpenes. The American *Piper* species are known to possess resistance genes associated with the production of phenylpropanoids (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2009; Potzernheim *et al.*, 2012). The results presented here show that chitosan has an eliciting effect on the production of phenols, flavonoids, terpenes and salicylic acid in the plant extracts of *P. auritum*, but an antagonistic effect on alkaloid production. The fungicidal activity of *P. auritum* ethanolic extracts against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was markedly improved by chitosan addition.

terpenos. Se sabe que las especies americanas de *Piper* poseen genes de resistencia asociadas con la producción de fenilpropanoides (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2009; Potzernheim *et al.*, 2012). Los resultados que aquí se describen muestran que el quitosano tiene un efecto desencadenante en la producción de fenoles, flavonoides, terpenos y ácido salicílico en los extractos de *P. auritum*, pero tiene también un efecto antagonista en la producción de alcaloides. La actividad fungicida de los extractos etanólicos de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* mejoró notablemente con la adición de quitosano.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

## LITERATURE CITED

- Ádám AL, Nagy ZÁ, Kátay G, Mergenthaler E and Viczián O. 2018. Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4): 1146. <https://doi.org/10.3390/ijms19041146>
- Amini J and Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50: 172–178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>
- Báez-Valdez EP, Carrillo-Fasio JA, Báez-Sañudo MA, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB and Contreras-Martínez R. 2010. Uso de portainjertos resistentes para el control de la fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en condiciones de malla sombra. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 111–123. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a4.pdf>
- Benhamou N and Thériault G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 33–52. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90047-Y](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90047-Y)
- Blainski A, Lopes GC and De Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Brasili E, Pratico G, Marini F, Valletta A, Capuani G, Sciubba F, Miccheli A and Pasqua G. 2014. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* *in vitro* roots. *Metabolomics* 10: 1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0660-z>
- Carmona-Hernández O, Fernández MS, Palmeros-Sánchez B and Lozada-García JA. 2014. Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 67–73. <https://www.redalyc.org/pdf/370/37033725008.pdf>
- Chang JH, Shin JH, Chung IS and Lee HJ. 1998. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letters* 20: 1097–1099. <https://doi.org/10.1023/A:1005396924568>
- da Luz SFM, Yamaguchi LF, Kato MJ, de Lemos OF, Xavier LP, Maia JGS, Ramos AR, Setzer WN and da Silva JKR. 2017. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (black pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 2434. <https://doi.org/10.3390/ijms18122434>
- Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, Motaung TE, Sydenham S, Mwadzingeni L and Tsilo TJ. 2017. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection* 91: 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>
- Erisléia-Meireles N, Luciana-Xavier P, Alessandra-Ramos R, José-Guilherme MS, William-Setzer N and da Silva JKR. 2016. Phenylpropanoids produced by *Piper divaricatum*, a resistant species to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the pathogenic agent of fusariosis in black pepper. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 7: 333. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000333>
- Ghorai N, Ghorai N, Chakraborty S, Guchait S, Saha SK and Biswas S. 2012. Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard



- reagent. Protocol Exchange. November. <https://dx.doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Golkar P, Taghizadeh M and Yousefian Z. 2019. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137(3): 575–585.
- López-Moya F, Suarez-Fernández M and López-Llorca LV. 2019. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 332. <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Nascimento SB, de Mattos C, Cezar J, de Menezes IC, Reis Duarte MDL, Darnet S, Harada ML and de Souza CRB. 2009. Identifying sequences potentially related to resistance response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by suppression subtractive hybridization. *Protein and Peptide Letters* 16: 1429–1434. <https://doi.org/10.2174/092986609789839368>
- Pineda RM, Vizcaíno SP, García CM, Gil JH, Durango DL. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 507–515. <http://www.chileanjar.cl/files/V7214Y2012CJAR120090.pdf>
- Pitta-Alvarez SI and Giulietti AM. 1999. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida*. Effect of medium pH and growth phase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 31–38. <https://doi.org/10.1023/A:1006359429830>
- Potzernheim MCL, Bizzo HR, Silva JP and Vieira RF. 2012. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 42: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.025>
- Rahman A, Sultana V, Ara J and Ehteshamul-Haque S. 2016. Induction of systemic resistance in cotton by the neem cake and *Pseudomonas aeruginosa* under salinity stress and *Macrophomina phaseolina* infection. *Pakistan Journal of Botany* 48: 1681–1689. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48\(4\)/45.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48(4)/45.pdf)
- Rongai D, Pulcini P, Pesce B and Milano F. 2015. Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Science* 10: 409–416. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0040>
- Scott IM, Jensen HR, Philogène BJ and Arnason JT. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Suprapta DN and Ohsawa K. 2007. Fungicidal activity of *Piper betle* extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 13: 40–46. <http://issaasphil.org/wp-content/uploads/2020/02/J-Issaas-v13n2-December-2007-Full-Journal.pdf>
- Tiwari RK, Udayabhanu M. and Chanda S. 2016. Quantitative analysis of secondary metabolites in aqueous extract of *Clerodendrum serratum*. *International Research Journal of Pharmacy* 7: 61–65. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0712148>
- Wiesel L, Newton AC, Elliott I, Booty D, Gilroy EM, Birch PR and Hein I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Yin H, Fretté XC, Christensen LP and Grevsen K. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(1): 136–143. <https://doi.org/10.1021/jf204376j>