

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 fotoperíodo, 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 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 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 ($\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$) 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 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 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 ($\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$) 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

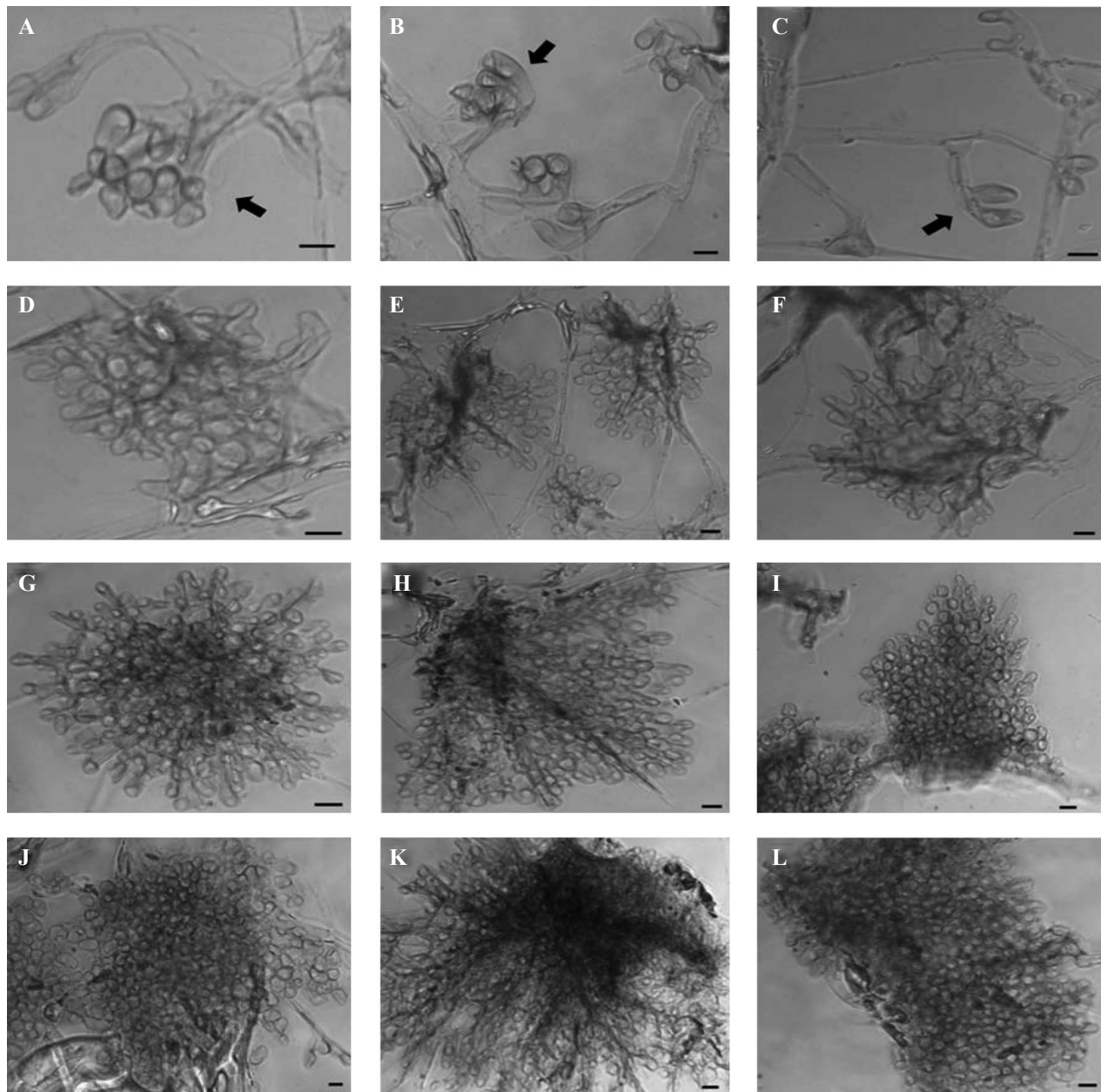


Figura 1. Formación de estructuras microscópicas observadas durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* después de siete días de crecimiento fúngico, sin KHCO_3 (control). Primera estructura: ramificación de hifas, que señalan las flechas (A-C); segunda estructura: ramificación 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*.

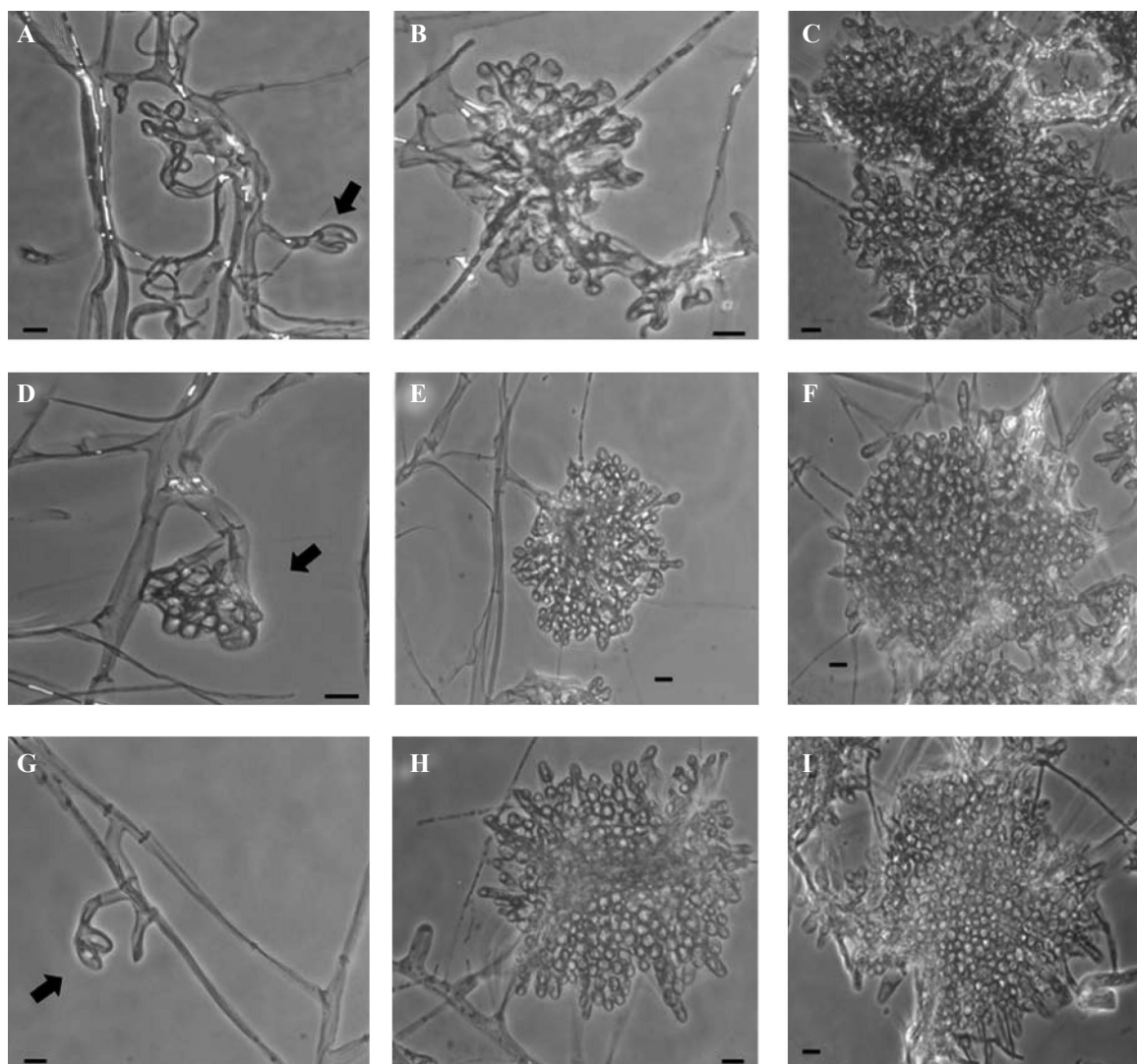


Figura 2. Estructuras microscópicas de desarrollo durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, después de siete días de crecimiento del hongo. La primera (que indican las flechas), la segunda y la tercera estructura del desarrollo de esclerocios en presencia de KHCO_3 : (A-C) 2 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

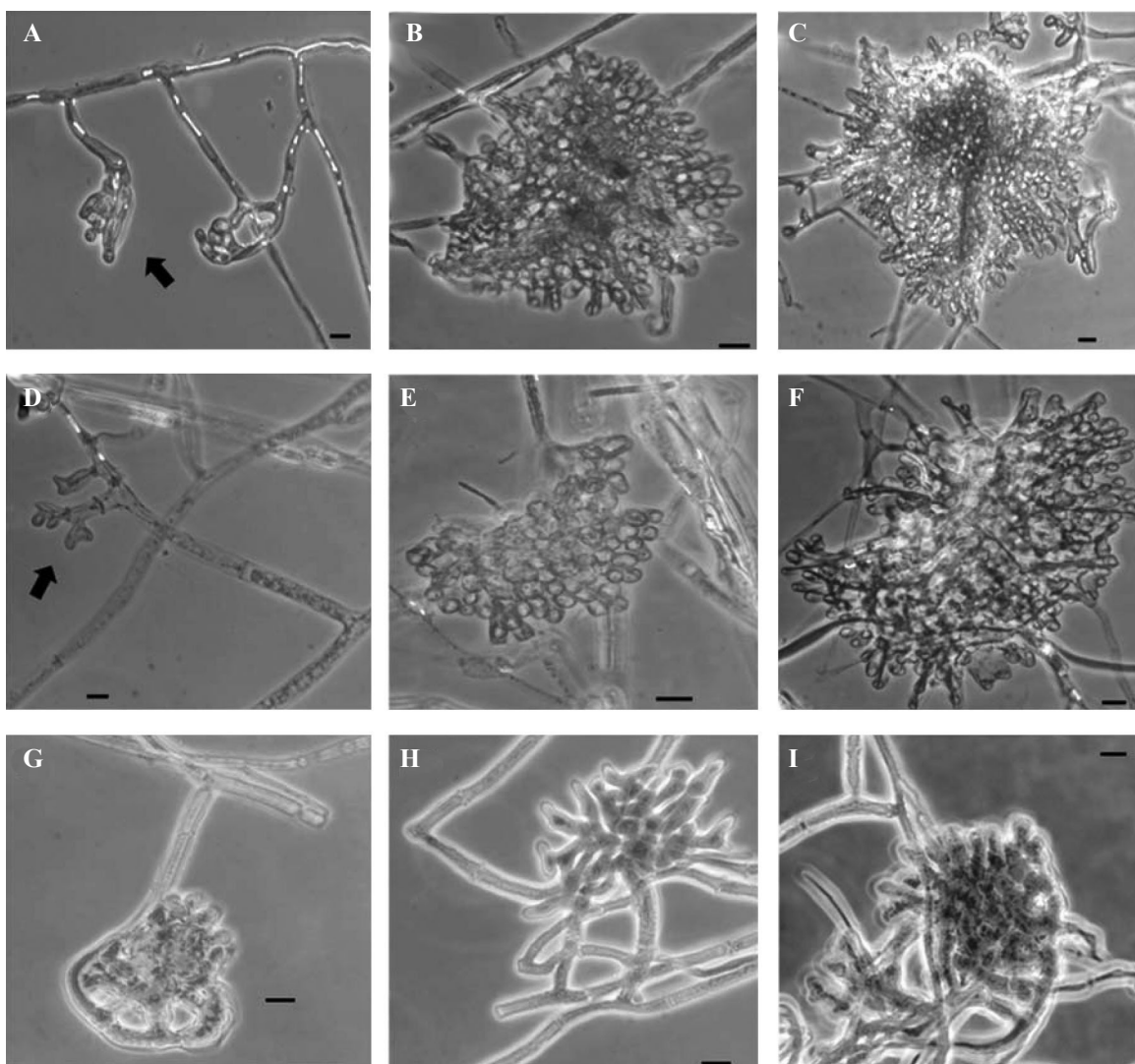


Figura 3. Se observaron estructuras microscópicas de desarrollo durante la formación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, después de siete días de crecimiento del hongo. La primera (que indican las flechas), la segunda y la tercera estructura del desarrollo de esclerocios en presencia de KHCO_3 : (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)