

In vitro* evaluation of extracts from the *Lilium* genus to control *Fusarium oxysporum

Evaluación *in vitro* de extractos del genero *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*

Anygim Senyase Iturbide-Zuñiga, María Teresa Beryl Colinas-León*, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México; **Héctor Lozoya-Saldaña**, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México; **Sergio Alejandro Medina-Moreno**, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, km 20 Carretera Pachuca-Ciudad Sahagún, Ex Hacienda Santa Bárbara, Zempoala, Hidalgo, 43830, México; **Juan Ayala-Arreola**, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México. *Autor para correspondencia: lozcol@gmail.com.

Recibido: 26 de Septiembre, 2016.

Aceptado: 11 de Abril, 2017.

Iturbide-Zuñiga AS, Colinas-León MTB, Lozoya-Saldaña H, Medina-Moreno SA, Ayala-Arreola J. 2017. *In vitro* evaluation of extracts from the *Lilium* genus to control *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1609-6

Primera publicación DOI: 25 de Mayo, 2017.

First DOI publication: May 25, 2017.

Resumen. Se evaluó el efecto antifúngico de extractos de bulbos de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer” sobre *Fusarium oxysporum* considerado como hongo patógeno que provoca daños severos en la agricultura y pérdidas económicas en diversos sectores de la industria. El extracto crudo se fraccionó en tres sub-extractos de acuerdo a la polaridad (polar, medianamente polar y no polar), los cuales se sometieron a bioensayos de inhibición siendo papa-dextrosa-agar (PDA) el tratamiento

Abstract. The effect of antifungal plant extracts of bulbs of *Lilium* hybrid L/A “Indian summer” were evaluated on *Fusarium oxysporum*, which is considered a pathogenic fungus that causes serious damage to agriculture and economic losses to various sectors of industry. The crude extract was fractionated into three sub-extracts according to their polarity (polar, moderately polar and non-polar), and then subject to bioassays of inhibition being potato-dextrose-agar (PDA) the control. The moderately polar extract showed the highest inhibition, decreasing the growth rate by 27 % compared to the mycelial growth in the control. However, when it was compared to plant extracts reported under similar conditions, it was discarded as a growth inhibitor and considered as fungistatic.

Key words: fungicide, fungistatic, phenols.

Lilium is an ornamental crop of major importance in the market worldwide and ranked

testigo. Las muestras que se trataron con el extracto medianamente polar presentaron la mayor inhibición, al disminuir la tasa de crecimiento en un 27 %, en comparación al crecimiento micelial del testigo. Sin embargo, al comparar con extractos vegetales que reportaron bajo condiciones similares, se descarta como inhibidor del crecimiento y se considera como fungistático.

Palabras clave: fungicida, fungistático, fenoles.

Lilium es un cultivo ornamental de gran importancia en el mercado mundial y ocupa el décimo primer lugar en demanda y el segundo lugar en plantas bulbosas en México (Gómez, 2009), lo anterior se atribuye principalmente a la diversidad de colores que se han logrado a través de la hibridación entre especies asiáticas y orientales; y la disponibilidad de la flor en prácticamente todo el año, gracias a los sistemas intensivos de producción (Álvarez *et al.*, 2008). Estas prácticas son las que conducen a los horticultores a implementar programas de control de plagas y enfermedades que si bien no se erradican, logran reducir las altas tasas de crecimiento de patógenos. Sin embargo, no consideran las consecuencias de utilizar indiscriminadamente fertilizantes o plaguicidas de naturaleza química que repercuten directamente en el suelo, aire y agua (Ortega *et al.*, 2006). Por lo que es conveniente la implementación oportuna de programas de control de patógenos por medio de alternativas amigables con el medio ambiente, que además de reducir los costos, son una alternativa para evitar la contaminación por el uso de agentes químicos que además inducen la resistencia en el microorganismo (Keng *et al.*, 2010; Bhromsiri y Bhromsiri, 2010). Tal es el caso del uso de extractos vegetales, aceites esenciales, extractos orgánicos y enzimáticos que dan la apertura al biocontrol de patógenos

11th in demand and 2nd among bulbous plants in Mexico (Gómez, 2009). This is mainly attributed to its flower color diversity, which has been possible through hybridization among Asiatic and Eastern species, as well as the availability of flowers almost all the year round through intensive production systems (Álvarez *et al.*, 2008).

These practices lead growers to implement pest and disease control programs that do not succeed in eradicating them, but do help decrease the high rate of pathogen development. However, those programs do not take into consideration the consequences of the indiscriminate use of chemical fertilizers or pesticides that directly affect natural resources as soil, air and water (Ortega *et al.*, 2006). For this reason, it is convenient to establish pathogen control programs in time and seek environment-friendly alternatives which, aside from cutting costs, help prevent pollution caused by the use of chemical agents that induce resistance in microorganisms (Keng *et al.*, 2010; Bhromsiri and Bhromsiri, 2010). That is the case of plant extracts, essential oils, organic and enzymatic extracts that mark the beginning of pathogens control in intensive agriculture because they have proven to be effective at controlling the growth of bacteria, nematodes and phytopathogens isolated from a wide variety of crops (Rodríguez *et al.*, 2012; Alcalá de Marcano *et al.*, 2005; Chávez and Aquino, 2012; Vinueza *et al.*, 2006). In the specific case of *Lilium*, bulbs are disposed after the crop cycle ends, so a way of reusing them could be extracting active compounds for the control of *Fusarium oxysporum* fungus, since mycosis causes loss of tissue turgence and fruit rot, stem end or root rot, minor infections, and eventually the plant dies. In summary, these are the problems that growers face every year.

The objective of this study was to determine the antifungal activity of extracts of *Lilium* bulbs

en la agricultura intensiva ya que han demostrado efectividad ante el crecimiento de bacterias, nematodos y hongos fitopatógenos aislados de una amplia diversidad de cultivos (Rodríguez *et al.*, 2012; Alcalá de Marcano *et al.*, 2005; Chávez y Aquino, 2012; Vinueza *et al.*, 2006). En el caso específico de *Lilium*, los bulbos se desechan después de terminar el cultivo, por lo que una forma de reutilizarlos pudiera ser la extracción de compuestos activos en el control del hongo *Fusarium oxysporum* ya que la micosis que produce causa pérdida de turgencia de tejidos y la pudrición de frutos, de cuello o raíces de la planta, infecciones menores y posteriormente la muerte del huésped, estos son problemas a los que se enfrentan los productores año con año.

El objetivo del trabajo fue determinar la actividad antifúngica de extractos de bulbos de *Lilium* que se obtuvieron después de la cosecha de la flor como una medida para reutilizar un órgano considerado residuo al término de la producción, que no cuenta con un manejo adecuado además de representar una fuente potencial de contaminación. La cepa que se utilizó fue *Fusarium oxysporum* conservada en glicerol y agar nutritivo, la cual se aisló de suelos destinados a cultivos experimentales por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Los bulbos de *Lilium* se obtuvieron de un único lote de importación de la empresa “Van den Bos Flowerbulbs B.V” provenientes de Dijkweg, Honselersdijk, Holanda. El lote estaba conformado por 300 piezas de bulbos calibre 14/16 del género *Lilium* híbridos L/A de la variedad “Indian summer”. Los bulbos se lavaron primero con agua de la llave para retirar impurezas y septos dañados, después con agua destilada, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 5 min. Al finalizar se enjuagó en agua desionizada. Se pesó 50 g de bulbos y se maceraron con un mínimo de agua desionizada (5 mL) en un mortero desinfectado. El extracto ob-

collected after flower harvest as a way of reusing an organ considered a residue at the end of the production cycle and which is not properly managed and could be a source of contamination. The isolate used was *Fusarium oxysporum* kept in glycerol and nutrient agar that was obtained from soils allocated to experiment crops by the Parasitology Department of Universidad Autónoma Chapingo. *Lilium* bulbs were taken from a single lot imported from Dijkweg, Honselersdijk, The Netherlands, by the company Van den Bos Flowerbulbs B.V. The lot consisted of 300 size 14/16 bulbs of the *Lilium* genus L/A hybrids Indian Summer variety. The bulbs were first washed with running water to remove impurities and damaged septa, then with distilled water and disinfected with 1.5 % sodium chloride for 5 min. Finally, they were rinsed in deionized water. Fifty g of bulbs were weighed and macerated with a minimum of deionized water (5 mL) in a disinfected mortar. The extract obtained was filtered with a cotton cloth and then with filter paper (Papel Whatman®); this procedure was repeated three times. The filtered extracts were placed in sterile vials and kept at 4 °C until they were used. For morphological characterization, *Fusarium oxysporum* was sown in Petri dishes filled with agar-potato-dextrose (PDA), according to BD Bioxon® directions. Each of the developed colonies were isolated and purified using the hypha-point method. Considering 10 sampling units (10 Petri dishes containing axenic culture), a macroscopic-morphological characterization was performed and permanent preparations were made and observed under a microscope. Atypical structures were observed whose length and width were measured in each unit. Their genus was confirmed according to the Barnett and Hunter procedure (1998). The incubation conditions for the extract were as follows: after obtaining the raw plant extract (EVC), it was split according to the

tenido se filtró en un paño de algodón y después con papel filtro (Papel Whatman®) esto se repitió tres veces. Los extractos filtrados se colocaron en viales estériles y se mantuvieron a 4 °C hasta su empleo. Para llevar a cabo la caracterización morfológica, *Fusarium oxysporum* se sembró en caja Petri con agar-papa-dextrosa (PDA) de acuerdo a BD Bioxon®. Cada colonia desarrollada se aisló y purificó por el método punta de hifa. Considerando 10 unidades de muestreo (10 cajas Petri con cultivos axénicos) se realizó la caracterización morfológica macroscópica y las preparaciones permanentes para observar al microscopio. Se identificaron las estructuras típicas y se midió el largo y ancho de las mismas en cada unidad. Se confirmó el género con base en las claves de Barnett y Hunter (1998). Las condiciones de incubación del extracto fueron las siguientes: Una vez obtenido el extracto vegetal crudo (EVC), se procedió al fraccionamiento por afinidad en la polaridad de compuestos analizados por cromatografía de capa fina (CCP) en el cual se emplearon placas de sílica gel GF 254 de 0.25 mm de espesor y se corrieron en los eluyentes hexano 100 %, acetato de etilo 100 % y etanol 100 %. Posteriormente al definir los eluyentes para el fraccionamiento de los extractos vegetales se obtuvo el extracto no polar (ENP) con hexano al 100 % en una relación 1:1, el extracto medianamente polar (EMP) se obtuvo con el eluyente acetato de etilo al 100 % en una relación 1:1 y el extracto polar (EVP) se obtuvo con etanol al 100 % en una relación 1:1.

La identificación molecular inició con la extracción de ADN la cual se realizó a partir de 30 a 50 mg de micelio. El procedimiento se repitió a partir de 3 muestras del hongo con los oligos ITS-1 5'-tcgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tctccgcttattgatagc-3' (White et al., 1990); los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable de aproximadamente 800 a 1200 pares de bases (pb). Esta práctica se realizó

polarity affinity of the compounds analyzed by thin-layer chromatography (CCP) using 25-mm-thick silica gel plates GF 254, and run in 100 % eluent hexane, 100 % ethyl acetate and 100 % ethanol. Later, when defining the eluents to split the plant extracts, the non-polar (ENP) extract was obtained using the 100 % ethyl acetate eluent at a 1:1 ratio, the polar extract (EMP) using the 100 % ethyl acetate eluent at a 1:1 ratio, and the polar extract (EVP) using 100 % ethanol at a 1:1 ratio.

The first step in molecular identification was DNA extraction, which was performed with 30 to 50 mg of mycelium. The procedure was repeated using 3 samples of the fungus with the oligos ITS-1 5'-tcgtaggtgaacctgcgg-3' and ITS-4 5'-tctccgcttattgatagc-3' (White et al., 1990) that amplify an internal transcribed spacer (ITS) and yields a product of variable size that contains approximately 800 to 1200 base pairs (pb). This task was performed with a mixture of reaction in a 25 µL final volume whose final components were: reaction buffer (1X, MgCl₂ 2mM, dNTP's), 200 nM of each, 20 pmoles of each oligonucleotide, and 1 unit of Taq DNA polymerase. The thermal program involves keeping 2 min at 94 °C, 30 seg at 55 °C and 1 min at 72 °C (35 cycles). The products resulting from the PCR reaction were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels, the PCR bands were observed in an UV Transilluminator (UVP brand) and pictures were taken. The amplified fragments were directly sequenced and the results compared with the sequences stored in the (GenBank) Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

For pathogenicity tests, 7 bulb flakes of the *Lilium* hybrid L/A Indian summer variety were used. They were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for 5 min and then rinsed with deionized water. Each flake was considered as an experiment unit in a complete randomized design.

con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2mM, dNTP's, 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa. El programa térmico consiste en mantener 2 min a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 1 min a 72 °C (35 ciclos). Los productos de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados directamente y los resultados se compararon con las secuencias del banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

En las pruebas de patogenicidad, se utilizaron 7 escamas de bulbos de *Lilium* híbrido L/A "Indian summer" que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 5 min. y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada. Se consideró cada escama como unidad experimental en un arreglo completamente al azar. La cepa previamente aislada se cultivó en medio PDA durante 8 días para el incremento de inóculo, después se preparó una suspensión de conidias en agua destilada estéril; la cual se ajustó a una concentración de 80x10³ propágulos·mL⁻¹ como lo indican Díaz *et al.* (2014), se asperjaron las escamas de *Lilium* con un volumen aproximado de 2 mL de la suspensión de esporas. Como testigo se utilizó una escama que solo se enjuagó con agua desionizada. Las 7 unidades experimentales se colocaron en cajas Petri de vidrio previamente estériles y se incubaron a 26 °C ± 2 °C. Los síntomas se registraron diariamente por 15 días. De las zonas afectadas por invasión micelial se tomó tejido el cual se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min. y se enjuagó 2 veces con agua desionizada. Después se sembraron en cajas Petri con medio PDA. La

The isolate that was previously isolated was sown in PDA medium for 8 days for inoculum increase, and then a suspension of conidia was prepared in sterile distilled water, adjusted to a concentration of 80x10³ propagules mL⁻¹ as stated by Díaz *et al.* (2014), and the flakes were spread with spore suspension (approximately 2mL in volume). As control we used the flake that was rinsed only with deionized water. The 7 experiment units were placed in 8 previously sterilized Petri dishes and incubated at 5 at 26 °C ± 2 °C. Symptoms were recorded daily for 15 days. From the areas affected by mycelial invasion, tissue was taken, disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for 2 min and rinsed twice with deionized water. Then, the samples were sown in Petri dishes containing PDA medium. The concentration of the plant extract in the medium was 30 %, incubation period: 23 h, incubation temperature: 25 °C +/-1.

The morphological-macroscopic features (color, shape and colony spreading) and microscopic (hypha, sclerotium, conidium, metula, phialid, etc.) were compared with those originally inoculated to prove Koch postulates. For repellency bioassays (antibiograms), 20 mL of plant extract were previously added for analysis along with 100 mL of PDA for sterilization; then it was distributed in Petri dishes 100 X 155 mm in diameter (Araujo *et al.*, 2007). When the culture medium solidified, sowings were made in the middle of each plaque using a 5x5 mm sample of *F. oxysporum* that was previously reactivated in liquid medium (nutrient broth) for 48 h and then transferred to solid medium (PDA) for the next 48 h. Mycelial growth was measured every 24 h at the four quadrant directions of the Petri dishes and the diameter of the inhibition halo was measured (in mm) until complete development was observed in the Petri dish containing the control (without plant extract). We carried out an analysis of the

concentración del extracto vegetal en el medio fue al 30 %, tiempo de incubación: 23 d, temperatura incubación: 25 °C +/- 1.

Las características morfológicas macroscópicas (color, forma y propagación de colonia) y microscópicas (hifa, esclerocio, conidia, métula, fiálide, etc.) se compararon con las originalmente inoculadas, para comprobar los postulados de Koch. Para la realización de los bioensayos de repelencia (antibiogramas), previamente se adicionaron 20 mL de extracto vegetal a analizar con 100 mL de PDA para su esterilización, posteriormente se distribuyó en cajas Petri de 100 X 155 mm de diámetro (Araujo *et al.*, 2007). Cuando el medio de cultivo se solidificó se hicieron las siembras en el centro de cada placa, con una muestra de 5x5 mm con *F. oxysporum* el cual se reactivó previamente en medio líquido (caldo nutritivo) por 48 h. y se transfirió a medio sólido (PDA) por las 48 h. siguientes. El crecimiento micelial se midió cada 24 h en los cuatro sentidos del cuadrante de la caja de Petri y se reportó el diámetro del halo de inhibición en mm hasta que la caja Petri del testigo (sin extracto vegetal) presentó un crecimiento completo. A los datos se les realizó un análisis de varianza (ANAVA). De igual forma se efectuó una prueba de comparación de medias utilizando el método Tukey con nivel de significancia al 5 %. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statistical Analysis System.

Las colonias aisladas de *Fusarium oxysporum* presentaron en su morfología macroscópica, durante las primeras 72 h una coloración blanquecina y una conformación algodonosa (Figura 1a) que inició en el punto de siembra y se extendió conforme a la propagación de nuevas hifas. Después de las 144 h se observó una coloración de rosa a púrpura siendo mayormente intensa al inicio del crecimiento (Figura 1b) y más tenue hacia los bordes con un color lila-rosado. La pigmentación púrpura –oscuro

data using variance analysis (ANAVA). Similarly, a median comparison test with 5 % significance level was performed according to Tukey's method. All the statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System software.

In their macroscopic morphology, the *Fusarium oxysporum* colonies isolated showed whitish and cottony shapes during the first 72 h (Figure 1a) that started to appear when they were sown and extended as new hyphae developed. After 144 h, we observed a pinkish-purple color that grew in intensity when the colonies started to grow (Figure 1b) and became lighter with lilac-pinkish tones towards the edges. The purple dark pigmentation was uniform after 312 h (Figure 1c and Figure 1d). The mature isolate produced branched hyphae 3-4.5µm in diameter, single and short phialides, abundant cylindrical micronidia and thin macronidia with a slightly curve and apical cell (Figure 1d).

In the molecular characterization, the size of the isolate identified as *Fusarium* was of 1040 pb, which agrees with the size expected for this species. The obtained sequence was 99 % similar to the ITS region whose alignment was in agreement with *F. oxysporum* CM000589.1.

The pathogenicity test confirmed the ability of the available isolate to develop typical fusariosis symptoms in septa of *Lilium* hybrids L/A bulbs. After 96 h, we observed the first signs of infection on the septum's meristematic tissue as yellowish-brownish spots (Figure 2). After 144 h, the damaged area showed degraded tissue, and from these areas an aliquot was taken to be resown in Petri dishes and confirm the presence of *Fusarium oxysporum*, according to Koch's postulates.

As for inhibition bioassays, the effect of the plant extracts on *Fusarium* sp. mycelial growth *in vitro* is shown in Table 1.

There is a significant difference among the treatments being the row plant extract (EVC)

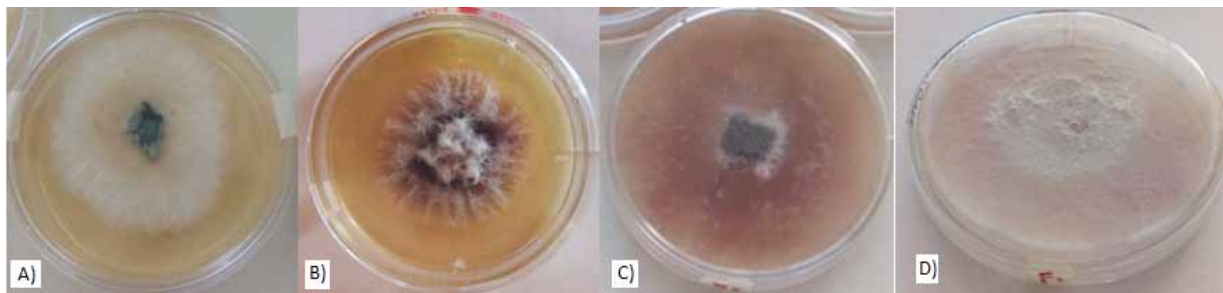


Figura 1. Morfología del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* A) 72 h, B) 144 h, C) 240 h y D) 312 h.
Figure 1. Morphology of *Fusarium oxysporum* mycelial growth A) 72 h, B) 144 h, C) 240 h and D) 312 h.

se observó uniforme después de 312 h (Figura 1c y 1d). La cepa madura presentó hifas ramificadas de 3 - 4.5µm de diámetro, fiálides cortas simples, Microconidias cilíndricas abundantes y Macroconidias delgadas con una célula apical ligeramente curva (Figura 1d).

En la caracterización molecular, el aislamiento identificado como *Fusarium* tuvo una talla de 1040 pb que concuerda con la talla esperada para la especie. La secuencia obtenida tuvo un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *F. oxysporum* CM000589.1

La prueba de patogenicidad confirmó la capacidad de la cepa disponible para generar la sintomatología típica de una fusariosis en septos de bulbos de *Lilium* híbridos L/A. Después de 96 h se observaron las primeras señales de la infección sobre el tejido meristemático del septo en forma de manchas amarillentas-pardas (Figura 2). Después de 144 h el área dañada presentaba tejido degradado y de estas zonas se tomó una alícuota para resembrar en caja Petri, confirmando la presencia de *Fusarium oxysporum* de acuerdo a los postulados de Koch.

En el caso de los bioensayos de inhibición, el efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. *in vitro* se puede observar en el Cuadro 1.

the statistically higher treatment at 48 h with an increase of 79% compared with the PDA treatment, since it acted as mycelial growth stimulator. In the case of the intermediately polar extract (EMP), there was a statistical difference lower than the difference in the control with a decrease of 27% and a low inhibitory effect. At 96 h, EVC decreased the mycelial growth ratio, but it was kept as the treatment with a higher statistical difference with an increase of 54% compared with the control. On the other hand, EMP presented a lower statistical difference with a decrease of 28% compared with the mycelial growth of the control, which was greater at 48 h and increased its inhibitory effect. At

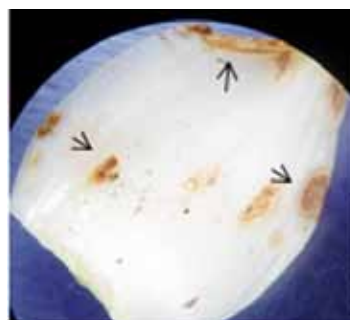


Figura 2. Septo de *Lilium* L/A después de 96 h bajo infección inducida por cultivo axénico de *Fusarium oxysporum*. Las flechas señalan las afectaciones al tejido.
Figure 2. *Lilium* L/A septo after 96 h under induced infection by a *Fusarium oxysporum* axenic culture. Arrows show tissue damage.

Cuadro 1. Comparación de medias del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en diferentes medios adicionados con extractos vegetales al 30 %.

Table 1. Median comparison of *Fusarium oxysporum* mycelial growth in different mediums to which plant extracts at 30% were added.

Tratamiento	Crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> (mm)					
	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	288 h
PDA	1.5	5.8	8.6	11.9	16.5	21.6
	C	C	CD	CD	CB	CB
EVC	7.2	12.6	18.9	23.7	28.2	31.8
	A	A	A	A	A	A
EVP	3.2	8.7	14.8	18.3	20.1	22.1
	BC	B	B	B	B	CB
EMP	1.1	4.2	6.3	9.0	12.5	15.5
	C	C	D	D	C	C
ENP	4.9	9.2	11.9	15.8	19.6	23.7
	BA	B	CB	CB	B	B
CV	28.8	10.6	11.8	9.3	8.1	12.1
DMS	2.9	2.4	4.0	4.1	4.4	7.8

* Las medias con letras diferentes en cada columna, indican diferencia significativa al 5 % de probabilidad / medians with different letter in each column denote significant difference at 5 % probability.

Existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, siendo el extracto vegetal crudo (EVC) el tratamiento estadísticamente superior a las 48 h con un incremento del 79 % sobre el tratamiento PDA, actuando como potencializador del crecimiento micelial. En el caso del extracto medianamente polar (EMP) se presentó diferencia estadística inferior al testigo con un decremento del 27 % presentando un efecto inhibitorio bajo. A las 96 h el EVC disminuyó la proporción de crecimiento micelial, sin embargo, se mantuvo como el tratamiento que presentó diferencia superior estadística con un incremento del 54 % sobre el testigo. Por otra parte, el EMP presentó diferencia estadística inferior, con una disminución del 28 % sobre el crecimiento micelial del testigo siendo mayor a la presentada a las 48 h y aumentando su efecto inhibitorio. A las 144 h el EVC es estadísticamente superior, con un aumento del 67 % al testigo recuperando su efecto promotor del crecimiento mostrado

144 h, EVC was statistically higher with an increase of 67 % compared with the control and recovered its ability to stimulate growth that has shown 48 h earlier. However, EMP was statistically lower with a decrease of 27 % on the control's mycelial growth and maintained its inhibitory activity. At 192 h, EVC continued to be the highest but different from the control with an increase of 50 %. It should be noted that the growth stimulating activity decreases but the inhibitory effect of the EMP treatment is continuous and presents a statistically lower difference than that of the PDA treatment with a decrease of 26 %. At 240 h, EVC remains as the statistically highest treatment with a growth median of 28.167 mm but shows a difference of 41 % where the lowest kinetics of mycelial growth was obtained. On the other hand, EMP is 25 % statistically lower than the control but maintains its inhibitory activity 10 days after inoculation. At 288 h, EVC resumes its activity to stimulate growth but

48 h antes. Sin embargo, el EMP es inferior estadísticamente, 27 % menos sobre el crecimiento micelial del testigo manteniendo su actividad inhibitoria en el mismo. A las 192 h el EVC se mantuvo como el tratamiento estadísticamente superior siendo diferente al testigo con un incremento del 50 %. Cabe señalar que la actividad promotora del crecimiento se ve reducida, mientras que el efecto inhibitorio del tratamiento EMP se mantiene constante, siendo el que presenta diferencia estadística inferior al tratamiento PDA con una disminución del 26 %. A las 240 h el EVC permanece como el tratamiento superior estadísticamente con una media de crecimiento de 28.167 mm no obstante la diferencia que muestra con respecto al testigo es de 41 % en donde se obtuvo la menor cinética de crecimiento micelial. Por otra parte, el EMP es inferior estadísticamente al testigo en 25 % manteniendo estable su actividad inhibitoria 10 días después de la inoculación. A las 288 h el EVC recupera actividad para promover el crecimiento sin lograr un aumento superior al presentado a las 192 h, presentando diferencia estadística superior con un crecimiento del 51 % con respecto al testigo. En el caso del EMP se observó un aumento en la actividad inhibitoria, siendo estadísticamente diferente al testigo con un aumento del 28 %. Chávez y Aquino. (2012) señalan que el extracto vegetal de piri (Cyperus spp.) presentó un efecto inhibitorio bajo en *Fusarium* sp., utilizando concentraciones del 20 %. No obstante, estos autores mencionan que el extracto de ajo inhibió por completo el desarrollo micelial de *Fusarium* sp., este resultado coincide con lo citado por López *et al.* (2005), que en concentraciones del 5 y 10 %, el extracto de ajo inhibe el 68.5 y 69.8 % del crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, respectivamente. Por lo cual se deduce que a mayor concentración de los extractos vegetales, mayor es el efecto inhibitorio. El extracto vegetal de ortiga (*Urtica dioica*) presentó un efecto inhibitorio bajo

there is no significant increase than that at 192 h, and shows a statistically higher difference of 51 % in growth compared with the control. In the case of EMP, increased inhibitory activity was observed, being statistically different from the control with an increase of 28 %. Chávez and Aquino (2012) state that plant extracts of piri (*Cyperus* spp.) showed a low inhibitory effect in *Fusarium* sp. using 20 % concentrations. However, the authors mention that garlic extract completely inhibited *Fusarium* sp. mycelial growth. This result is in agreement with López *et al.* (2005) statement, who reported that at 5 and 10 % concentrations, garlic inhibits 68.5 and 69.8 % of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* growth, respectively. For this reason, it is assumed that the higher the concentration of plant extracts, the higher the inhibitory effect. Nettle extract (*Urtica dioica*) showed a low inhibitory effect in *Fusarium* sp. (Chávez and Aquino, 2012) in contrast with the effects observed on tests using *Colletotrichum gloeosporioides*, in which 100 % growth inhibition was observed when aqueous and alcoholic extracts of such plant were used. Based on the favorable response of EMP, we characterized and determined the organic structure of the extract using gas chromatography with a universal column and obtained the chromatogram shown in Figure 3.

In the plant extract (EMP), we found hexadecanoic acid methyl ester (Palmitic acid) and octadecadienoic acid 9,16 methyl ester (Table 2) called Omega 6 that are compounds known to have the capacity to capture free radicals and anti-inflammatory, antiallergic, antithrombotic, antimicrobial and antineoplastic activity (Kuskoski *et al.*, 2005).

The presence of phenolic compounds such as 2,4-diphenol 1,1-dimethyl, ethyl and 1,3 dioxolane 2 heptanenitrile α -methyl δ -oxo- 2- phenyl (precursor of thymol, and carvacrol and eugenol intermediary) suggest fungal activity of the plant

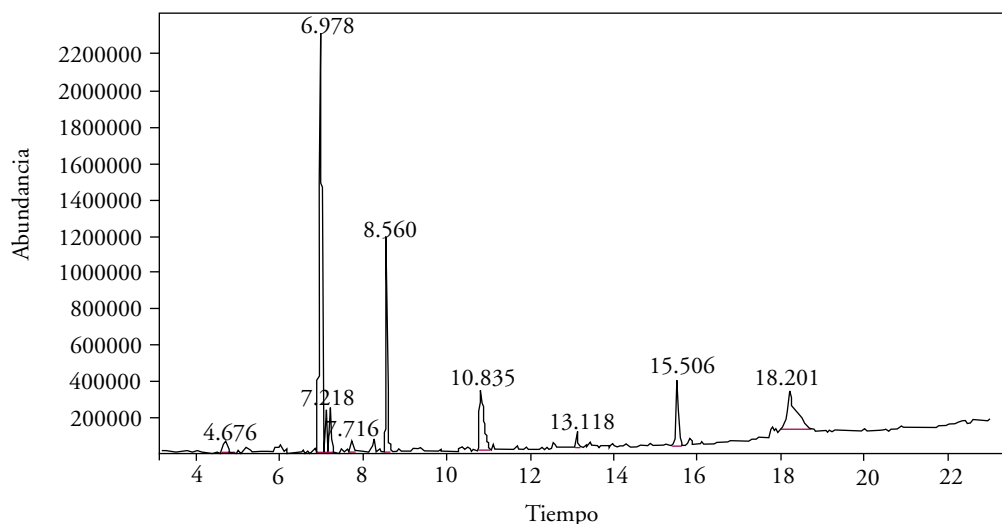
en *Fusarium* sp., (Chávez y Aquino, 2012), en contraposición a los observado en ensayos con *Colletotrichum gloeosporioides*, en los cuales se obtuvo 100 % de inhibición de crecimiento con extractos acuoso y alcohólicos de esta planta. Con base en la respuesta favorable del EMP se procedió a la caracterización y determinación de la estructura orgánica del extracto en cromatografía de gases con columna universal, obteniendo el cromatograma mostrado en la Figura 3.

En el extracto vegetal (EMP) se identificó ácido hexadecanoico metil éster (ácido palmítico) y ácido octadecadienoico 9,16 metil éster (Cuadro 2) conocido como omega 6, compuestos conocidos por su capacidad de capturar radicales libres y presentar actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Kuskoski *et al.*, 2005).

La presencia de los compuestos fenólicos como el 2,4-difenol 1,1-dimetil, etil y 1,3 dioxolano 2 heptanonitrilo α -metil δ -oxo- 2-fenil (precursor del timol e intermediario del carvacrol y eugenol) sugieren la actividad fungicida de los extractos vegetales,

extracts, which is favored by the acid nature of their hydroxyl group that creates a hydrogen bridge with an active enzymatic site (Kalemba and Kunicka, 2003). On the other hand, the biosynthesis of these molecules is taken either constitutively, pathogen-independent (phytoanticipins), or, if induced as part of the defense mechanism of plants against infections caused by bacteria, fungi or nematodes (phytoalexins). To this group belong flavonoids, isoflavones, aurones and phenalenes. (Tanaka *et al.*, 2002. Kalemba and Kunicka (2003) suggest that plant extracts and essential oils with phenol as the main component express the highest spectrum of antimicrobial activity.

The *Fusarium oxysporum* white fungal species was confirmed with the sequence key CM000589.1 stored in the gene bank in NCBI and based on DNA and PCR extraction protocols. The most abundant compounds (3-4 benzaldehyde dimethyl, 1,3-dioxolane-2-heptanenitrile, α -methyl- δ -oxo-2- phenyl and 9,16- octadecadienoic acid, methyl ester) in the intermediately polar plant extract (EMP) have shown fungal activity in crops



**Figura 3. Cromatograma del extracto vegetal medianamente polar (EMP) obtenido de bulbos de *Lilium*.
Figure 3. Chromatogram of plant tissue intermediately polar (EMP) obtained from *Lilium* bulbs.**

Cuadro 2. Compuestos obtenidos en los tiempos de retención mostrados en el cromatograma del extracto medianamente polar.**Table 2. Compounds obtained within the retention periods shown in the intermediate polar extract chromatogram.**

Tiempo de retención	Compuesto	Tiempo de retención	Compuesto
4.676	Ácido valérico, 4 tridecil éster	8.56	1,3-Dioxolano-2-heptanonitrilo, α -metil- δ -oxo-2-fenil-
6.978	Benzaldehído, 3-4 dimetil	10.835	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-
7.098	Biciclo [3.1.1.] hept-3-en2-ona, 4,6,6-trimetil-	13.118	Metil 12-metil-tridecanoato
7.218	Biciclo [3.1.1.] hept-3-en-2-one, 4,3,6-trimethyl-	15.506	Ácido hexadecanoico, metil éster
7.716	2-Cyclohexen-1-ona, 3-methyl-6-(1-metil-etenil)-,(S)	18.201	9,16- Ácido Octadecadienoico, metil éster

la cual es favorecida por la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente hidrógeno con un sitio activo enzimático (Kalemba y Kunicka, 2003). Por otra parte la biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nematodos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran los flavonoides, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Tanaka *et al.*, 2002; Kalemba y Kunicka (2003) sugieren que los extractos vegetales y aceites esenciales con fenol como componente principal expresan el más alto espectro de actividad antimicrobiana.

Se confirmó la especie fúngica blanco *Fusarium oxysporum* con clave de secuencia CM000589.1 del banco de genes del NCBI. Con base a los protocolos de extracción de ADN y PCR. Los compuestos de mayor abundancia en el extracto vegetal medianamente polar (EMP) 3-4 dimetil benzaldehído, 1,3-dioxolano-2-heptanonitrilo, α -metil- δ -oxo-2-fenil y 9,16-ácido octadecanoico, metil éster, han reportado actividad fungicida en cultivos de interés

of interest and are potential components for further studies. The raw plant extract of *Lilium* hybrid L/A “Indian summer” bulbs presented stimulating activity in *Fusarium oxysporum* mycelial growth. The intermediate polar extract (EMP) of the bulbs presented low inhibitory activity and it is considered useful as a *Fusarium oxysporum* fungistatic.

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

agrícola siendo componentes potenciales para estudios posteriores El extracto vegetal crudo de bulbos de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer” presentó actividad promotora del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. El extracto medianamente polar (EMP) de los bulbos presenta actividad inhibitoria baja y se considera su utilidad como fungistático de *Fusarium oxysporum*.

## LITERATURA CITADA

Alcalá de Marcano D, Vargas N, Pire A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el cre-

- cimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Revista de la Facultad de Agronomía 22:315-323. <http://revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre-diciembre2005/d-alcala.pdf>
- Álvarez SME, Maldonado TR, García MR, Almaguer VG, Ruppit AJ, Zavala EF. 2008. Suministro de calcio en el desarrollo y nutrición de *Lilium* asiático. Agrociencia 42:881-889. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2008/nov-dic/art-3.pdf>
- Araujo D, Rodríguez D, Sanabria ME. 2007. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* causante del mal de Panamá, en algunos extractos vegetales y funguicidas. Fitopatología Venezolana 21:2-8. <http://www.ovefit.com.ve/boletines/21-1/documento1.pdf>
- Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American Phythopathological. Society Minnesota, USA. 218 p.
- Bhromsiri C, Bhromsiri A. 2010. The effect of plant growth promoting Rhizobacteria and *Arbuscular mycorrhizal* fungi on the growth, development and nutrient uptake on different vetiver ecotypes. Thai Journal of Agricultural Science 43:239-249. [http://www.thaiagj.org/images/stories/Journal\\_online/2010/43-4/06-TJ-AGR-1010-49.pdf](http://www.thaiagj.org/images/stories/Journal_online/2010/43-4/06-TJ-AGR-1010-49.pdf)
- Chávez AR, Aquino AS. 2012. Control de los hongos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp y *Sclerotium* sp con extractos vegetales. Investigación Agraria 14:17-23. <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/242/228>
- Díaz JF, Vargas M, Ayvar S, Alvarado OG, Solís JF, Durán JA, Díaz HL, Hernández A. 2014. Morphological and PCR identification of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from piana pumpkin fruits and greenhouse management. Biotecnia 16:17-21. DOI:10.18633/bt.v16i3.107
- Gómez AA. 2009. La situación de las flores de corte mexicanas dentro de la política comercial internacional de México Tesis-Tecatl 2:1-30 <http://www.eumed.net/rev/tecsistecatl/n9/aagg.htm>
- Kalemba DF, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10:813-829. DOI:10.2174/0929867033457719
- Keng HC, Rung YW, Keng CC, Ting FH, Ren SC. 2010. Effects of chemical and organic fertilizer on the growth, flower quality and nutrient uptake of *Anthurium andraeanum*, cultivated for cut flower production. Scientia Horticulturae 125:434441 DOI:10.1016/j.scienta.2010.04.011
- López BA, López BSR, Vásquez BME, Rodríguez HSA, Mendoza EM, Padron CE. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* schlechtend f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kunh y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:183-190. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- Ortega BR, Correa BM, Olate ME. 2006. Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. para flor de corte. Agrociencia 40:77-88. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/ene-feb/art-8.pdf>
- Rodríguez PAT, Ramírez AMA, Bautista BS, Cruz TA, Rivero D. 2012. Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Revista Científica UDO Agrícola 12:91-96. <http://udoagricola.udo.edu.ve/V12N1UDOAg/V12N1Rodriguez91.htm>
- Tanaka H, Sato M, Fujiwara S, Hirata M, Etoh H, Takeuchi H. 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology 35:494-498. DOI:10.1016/j.1472-765x.2002.01222.x
- Vinueza PSM, Crozzoli R, Perichi G. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para control de nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. Fitopatología Venezolana 19:26-31.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A., Inns, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky, and T.J., White (eds.). PCR protocols. Pp 315-322. Academic Press. San Diego, CA.