

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

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

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

Recibido: 13 de Junio, 2018.

Aceptado: 20 de Julio, 2018.

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

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

Primera publicación DOI: 22 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 22, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

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

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

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

### Extracto de ajo (EA).

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

### Obtención de esporas de Forl

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

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

### Garlic extract (EA).

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

### Obtaining Forl spores

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

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

### **Inoculación de plántulas de tomate con Forl**

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

### **Tratamientos aplicados para la inducción de resistencia en plantas de tomate**

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

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

### **Tomato seedlings inoculated with Forl.**

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

### **Treatments to induce resistance in tomato plants**

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

### **Evaluation of disease severity**

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



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

### Evaluación de la severidad de la enfermedad.

Para evaluar la respuesta de las plantas de tomate al patógeno, se utilizó una escala hedónica propuesta por Apodaca *et al.* (2004) y Clavijo-Castro (2014). La clasificación de las plantas se realizó posterior a la aparición de la 5a hoja verdadera, se evaluó cada planta en una escala del 1 al 5 (Cuadro 2) según la intensidad de la enfermedad. Para cuantificar la severidad de la enfermedad, se evaluaron en las plantas los parámetros: índice de clorofila (UC) y altura (cm) cada 7 días después de la aplicación del tratamiento durante 49 días. El contenido de clorofila, se midió empleando el equipo SPAD 502 (Minolta). El equipo mide la absorción en longitudes de onda de 650 y 940 nm para estimar niveles de la clorofila. La medición se realizó en la tercera hoja por triplicado para obtener el índice de clorofila. La altura de la planta se midió con un flexómetro desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

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

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

Donde:

S= Severidad

n= Plantas por categoría

v= Valor de la categoría

N= Plantas por unidad experimental

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

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

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

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

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

Where:

S= Severity

n= Plants per category

v= Value of the category

N= Plants per experimental unit

### Quantification of salicylic acid and jasmonic acid

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

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

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

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

### Cuantificación de ácido salicílico y ácido jasmónico

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

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

utilizó para la determinación del ácido salicílico y del ácido jasmónico, utilizando un cromatógrafo de líquidos (Agilent Technologies modelo 1260 infinity), controlado por el programa OpenLab ChemStation (Agilent Technologies). El equipo consta de una bomba cuaternaria, un detector de arreglo de diodos y un inyector manual Rheodyne 7725i, la columna utilizada fue C18 (Phenomenex Luna) de 250 x 4.6 mm de 5  $\mu\text{m}$  de partícula. La fase móvil consistió de una fase A compuesta de 94.9%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{HCOOH}$  (ácido fórmico) y 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (acetonitrilo) y una fase B de 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 94.9%  $\text{CH}_3\text{CN}$  y 0.1%  $\text{HCOOH}$ , en una proporción 60 (A):40 (B), la cual se trabajó de manera isocrática a 1 mL por minuto durante 20 min a temperatura ambiente. La longitud de onda de detección fue 303 nm para los dos compuestos. Se utilizaron compuestos puros de ácido salicílico y ácido jasmónico (Sigma Aldrich) para realizar curvas de calibración, determinar los tiempos de retención de cada compuesto y calcular la concentración. Los rangos de las curvas de calibración fueron: para AS, 0.02-0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  y de 0.1-1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para AJ, 0.05-0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  y 0.1-1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

### Diseño experimental y análisis de datos

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

phase consisted of an A phase containing 94.9%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{HCOOH}$  (formic acid) and 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (acetonitrile) and a B phase containing 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 94.9%  $\text{CH}_3\text{CN}$  and 0.1%  $\text{HCOOH}$ , at a 60 (A):40 (B) ratio, for which we used an isocratic method at 1 mL per min during 20 min at room temperature. The detection wave length used for both compounds was 303 nm. Pure salicylic acid and jasmonic acid compounds were used to determine the calibration curves (Sigma Aldrich), the retention time of each compound and calculate the concentration. The calibration curves ranged as follows: 0.02-0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 0.1-1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  for AS, and 0.05-0.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 0.1-1.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  for AJ.

### Experimental design and data analysis

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

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chlorophyll content in tomato plants

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



## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Contenido de clorofila en plantas de tomate.

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

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

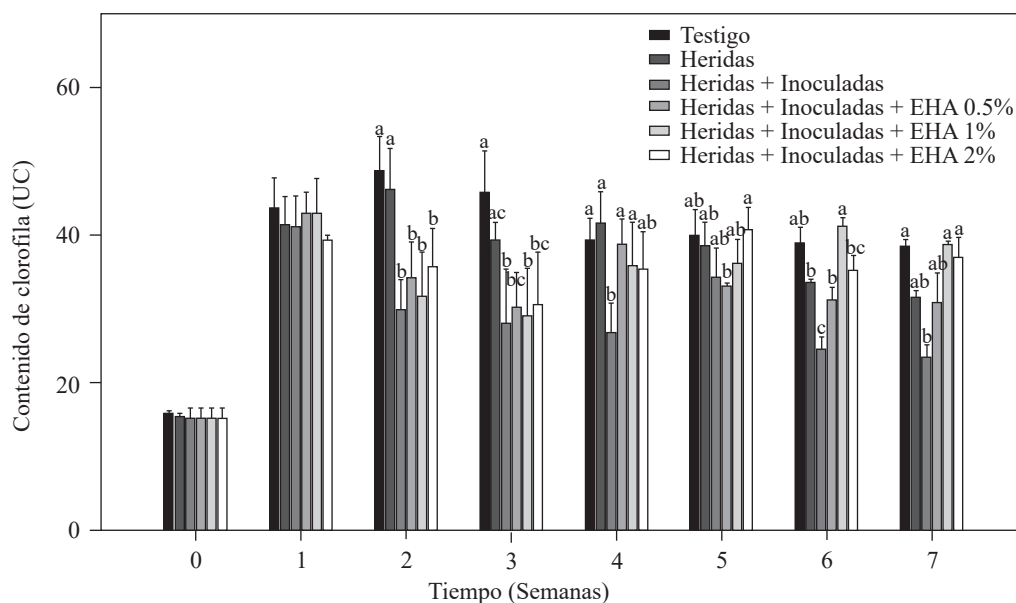


Figura 1. Contenido de clorofila en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl, y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n=3$ ). Letras diferentes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

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

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

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

### Altura de las plantas de tomate

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

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

### Height of the tomato plants

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

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

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

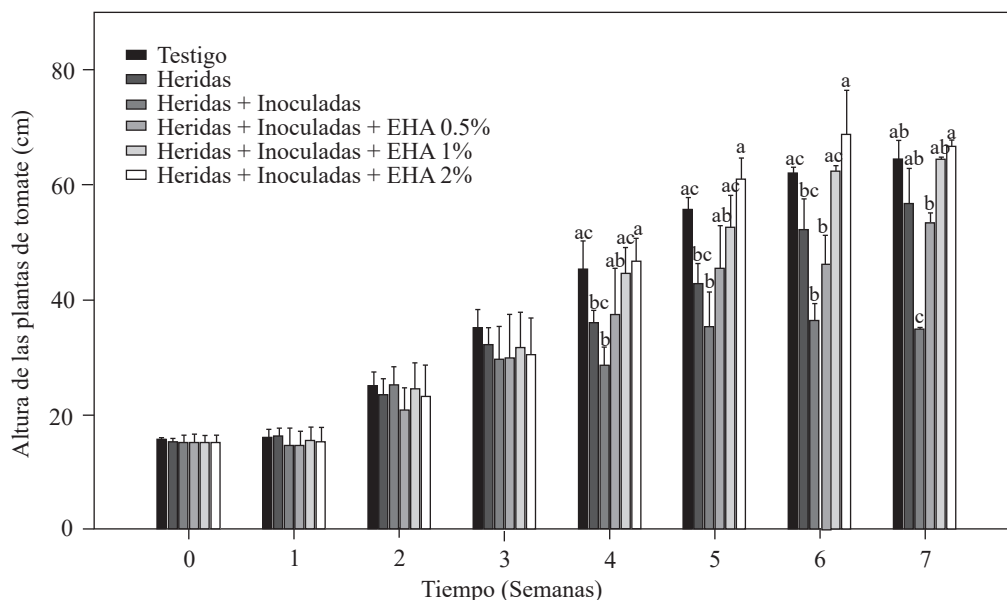


Figura 2. Evaluación de la altura de plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con extracto de ajo con diferentes concentraciones. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n=3$ ). Letras diferentes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

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

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

#### **Severidad de la enfermedad de plantas de tomate infectadas con Forl**

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

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

#### **Disease severity of tomato plants infected with Forl**

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

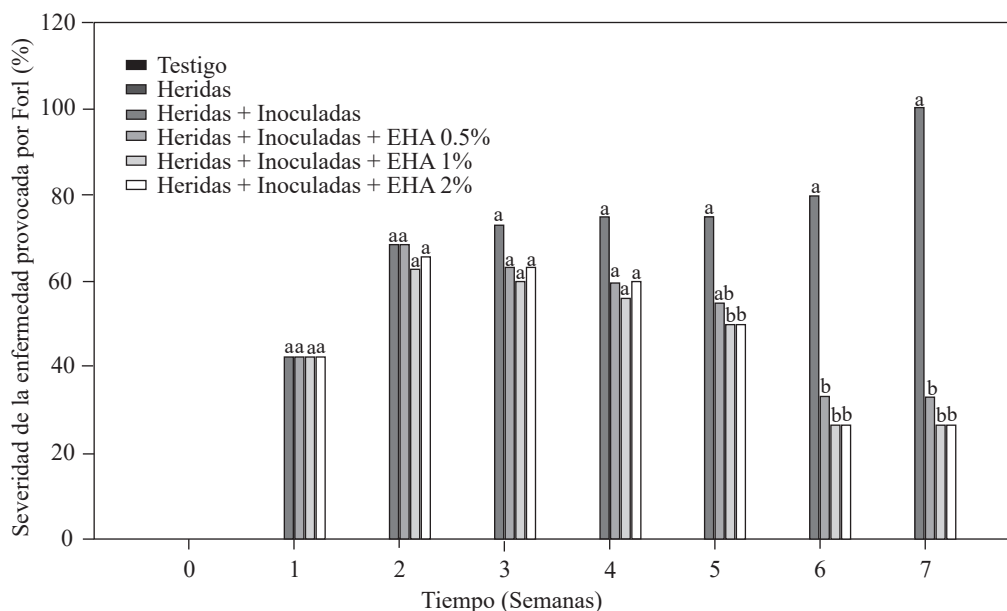


Figura 3. Porcentaje de severidad de la enfermedad provocada por Forl en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Letras diferentes significa diferencia significativa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

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

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

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

### Quantification of salicylic acid (SA)

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



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

### Cuantificación de ácido salicílico (AS)

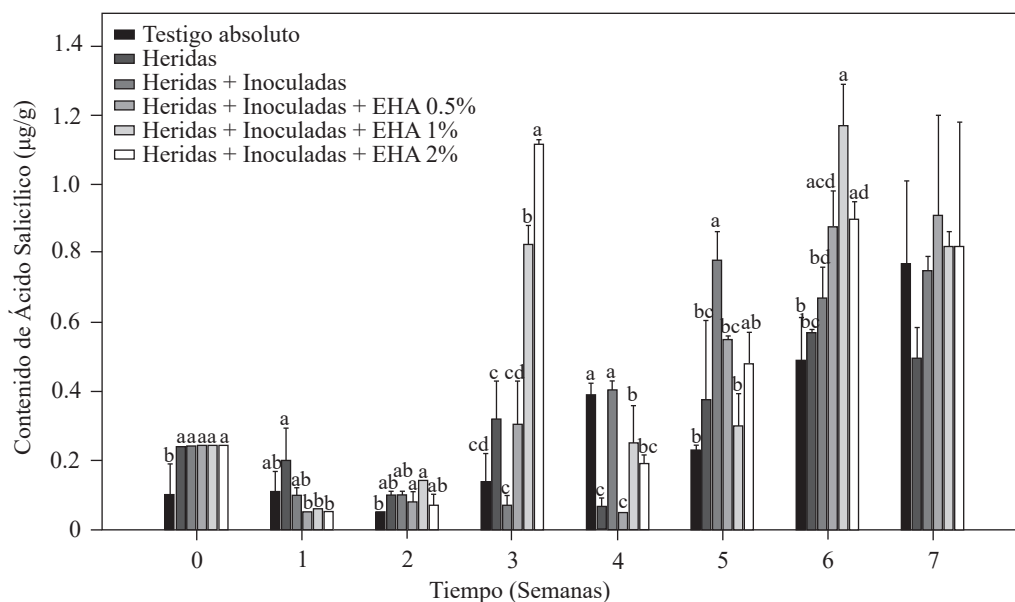
Los resultados obtenidos en la cuantificación de AS en las plantas de tomate se muestran en la Figura 4. Puede observarse que las variaciones en el contenido de AS presentaron cambios desde la semana de la inoculación de las plantas, cuantificando niveles basales de  $0.10 \mu\text{g g}^{-1}$  en las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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

### Quantification of jasmonic acid (JA)

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

### Cuantificación de ácido jasmónico (AJ)

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

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

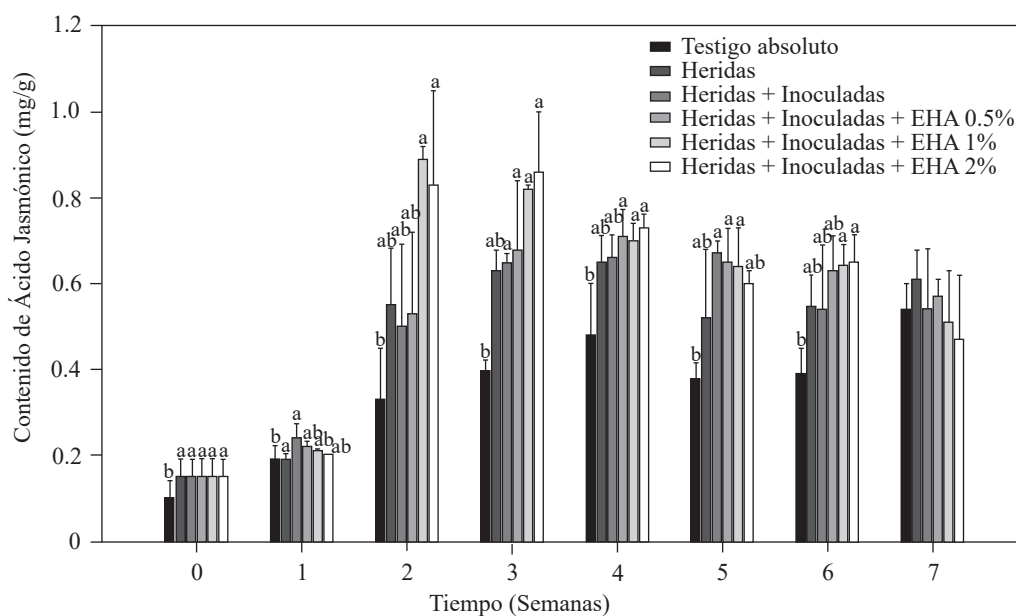


Figura 5. Concentración de ácido jasmónico en plantas de tomate inoculadas y no-inoculadas con Forl y tratadas con diferentes concentraciones de extracto de ajo. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 plantas cada una. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $n=3$ ). Letras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

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

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

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

## CONCLUSIONS

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

## ACKNOWLEDGMENT

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

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

## CONCLUSIONES

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

## AGRADECIMIENTOS

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

## LITERATURA CITADA

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



- Disponibile en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220101>
- Apodaca M, Zavaleta E, Osada S, García R y Valenzuela J. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:7-13. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222102>
- Arbona V and Gómez-Cadenas A. 2008. Hormonal modulation of citrus responses to flooding. Journal of Plant Growth Regulation 27:241-250. DOI: 10.1007/s00344-008-9051-x
- Arzoo K, Biswas S and Rajik M. 2012. Biochemical evidences of defence response in tomato against fusarium wilt induced by plant extracts. Plant Pathology Journal 11:42-50. DOI: 10.3923/ppj.2012.42.50
- Baysal O, Laux P and Zeller W. 2002. Further studies on the induced resistance effect of plant extract from *Redera helix* against fire blight (*Erwinia amylovora*). Acta Horticulturae 590:273-277. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.40
- Carrillo FJA, Montoya RTJ, García ERS, Cruz OJE, Márquez ZI y Sanduño BJ. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en El Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:123-127. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221205>
- Clavijo CSD. 2014. Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium spp.* en Capsicum. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia, 75 pp. Disponible en línea: [http://www.bdigital.unal.edu.co/47659/1/29673462\\_Sharon.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/47659/1/29673462_Sharon.pdf)
- Chohan S and Perveen R. 2015. Phytochemical analysis and antifungal efficacy of rhizome extracts of various plants against fusarium wilt and root rot of tomato. International Journal of Agriculture and Biology 17:1193-1199. DOI: 10.17857/IJAB/15.0055
- El Oirdi M, El Rahma TA, Rigan L, El Hadram A, Rodrigue MC, Daay F, Vojno A and Bouarab K. 2011. *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. The Plant Cell 23:2405-2421. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083394>
- El-Kalla SM. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plant against fusarium wilt diseases by bioagent fungi (Arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (Jasmonic acid and Salicylic acid): 1-Changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defense mechanism. Australian Journal of Basic Applied Science 1:691-705. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/42bb/00a3ee771688eba8485814214110d11cb703.pdf>
- Fatema S and Ahmad MU. 2005. Comparative efficacy of some organic amendments and a nematicide (Furadan-3G) against root-knot on two local varieties of groundnut. Plant Pathology Journal 4:54-57. DOI: 10.3923/ppj.2005.54.57
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43:205-227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- Gozzo F and Faoro F. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:12473-12491. DOI: 10.1021/jf404156x.
- Guzmán TE, Montenegro DD and Benavides MA. 2014. Concentration of salicylic acid in tomato leaves after foliar aspersions of this compound. American Journal of Plant Sciences 5:2048-2056. DOI: 10.4236/ajps.2014.513220
- Hadian S, Rahnama K, Jamali S and Eskandari A. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology 5:2052-2057. Disponible en línea: <http://www.aensiweb.com/old/aeb/2011/2052-2057.pdf>
- Hayat Q, Hayat S, Alyemeni MN and Ahmad A. 2012. Salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. Plant Soil Environmental 58:417-423. DOI: 10.17221/232/2012-PSE
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68:14-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- Heil M and Bostock RM. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annals of botany 89:503-512. DOI: 10.1093/aob/mcf076
- Hiderman J, Makino A, Kurita Y, Mae T and Ojima K. 1992. Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. Plant and cell physiology 33:1209-1214. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078375>
- Jansen H, Müller B and Knobloch K. 1987. Allicin characterization and its determination by HPLC. Planta Médica 53:559-562. DOI: 10.1055/s-2006-962811
- Kachroo A and Robin GP. 2013. Systemic signaling during plant defense. Current Opinion in Plant Biology 16:527-533. DOI: 10.1016/j.pbi.2013.06.019
- Kravchuk Z, Vicedo B, Flors V, Camanes G, González BC, García AP. 2011. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against *B. cinerea*. Journal of Plant Physiology 168:359-366. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.07.028
- Massacci A, Nabiev SM, Pietrosanti L, Nematov SK, Chernikova TN, Thor K, Leipner J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry 46:189-195. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.10.006>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato disease caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection 73:78-92. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Mendoza M, González GA, Santelises AA, Etcheveres JD y Rincón JA. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra 16:135-141. Disponible en línea: <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/16/2/art135-141.pdf>

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