







Efectividad del extracto etanólico de *Lippia palmeri* Wats para el manejo de *Fusarium* spp. en semillas de garbanzo

Effectiveness of ethanolic extract of *Lippia palmeri* Wats for the management of *Fusarium* spp. in chickpea seeds

Efetividade do extrato etanólico de *Lippia palmeri* Wats no manejo de *Fusarium* spp. em sementes de grão de bico

Mirella Romero-Bastidas¹, Juan Jose Reyes-Perez², Esli Alexis Mayer-Felix¹, José Saúl Hernández-Rubio¹, Pablo Misael Arce-Amezquita¹, Luis Guillermo Hernández-Montiel^{3*}

¹Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al sur km 5.5, Col. El Mezquitito. 23080, La Paz, Baja California Sur. México. Correo electrónico: (MR) miromero@uabcs.mx, ; (EM) eslimayer@gmail.com, ; (JH) saulhr@gmail.com ; (PA) parce@uabcs.mx, . ²Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito, Km 1,5 vía a Santo Domingo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Correo electrónico: jreyes@uteq.edu.ec, . ³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Calle Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096, La Paz, Baja California Sur, México. Correo electrónico: lhernandez@cibnor.mx, .

Resumen

El garbanzo es un cultivo de importancia mundial debido a su valor nutricional, sin embargo, la cosecha se ve afectada por enfermedades en semillas y raíz ocasionadas por *Fusarium* spp., y para su control se aplican fungicidas sintéticos, por lo que los productos naturales basados en extractos de plantas pueden ser una opción para el manejo sustentable de enfermedades de este cultivo. El objetivo de esta investigación fue determinar la eficiencia *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico de *Lippia palmeri* para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* en semillas de garbanzo. Al medio PDA se le añadió 500, 1000 y 2000 ppm del extracto etanólico de *L. palmeri* más un disco de agar de cada patógeno y se midió la inhibición del crecimiento micelial. Semillas de garbanzo fueron sumergidas

Recibido el 05-04-2020 • Aceptado el 15-06-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: lhernandez@cibnor.mx

en cada concentración de *L. palmeri* por cinco y 10 min, posteriormente, cada semilla se inoculó con *F. oxysporum* y *F. solani* y se determinó la incidencia de la enfermedad y el número de semillas germinadas. Las tres concentraciones de *L. palmeri* inhibieron *in vitro* a ambos patógenos. En las semillas, el extracto etanólico de *L. palmeri* disminuyó la incidencia de *F. solani* y mantuvo por encima del 80 % la germinación. Para *F. oxysporum* solo la dosis más alta del extracto etanólico y el mayor tiempo de exposición disminuyó 20 % la incidencia y la germinación fue menor de 25 %. El extracto etanólico de *L. palmeri* puede ser una opción para disminuir enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos del suelo en semillas de garbanzo

Palabras clave: antifúngicos, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, germinación.

Abstract

Chickpea is a crop of world importance due to its nutritional value; however, seed and root diseases caused by *Fusarium* spp. affect the harvest and for its control, synthetic fungicides are applied; nevertheless, natural products based on plant extracts may be an option for the sustainable management of this crop diseases. The objective of this research was to determine the *in vitro* and *in vivo* efficiency of the *Lippia palmeri* extract for the control of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in chickpea seeds. To PDA media, 500, 1000 and 2000 ppm from ethanolic extract of *L. palmeri* plus one agar disc of each pathogen, and the inhibition of mycelial growth was quantified. Chickpea seeds were submerged in each concentration of *L. palmeri* for 5 and 10 min, later, each seed was inoculated with *F. oxysporum* and *F. solani* and the disease incidence and germinated seeds were determined. The three concentrations of *L. palmeri* inhibited both phytopathogens *in vitro*. In the seeds, *L. palmeri* ethanolic extract decreased the incidence of *F. solani* and kept germination above 80 %. For *F.oxysporum* only the highest dose of the ethanolic extract and the longest exposure time decreased the incidence by 20 % and germination was less than 25 %.The ethanolic extract of *L. palmeri* can be an option to decrease diseases caused by phytopathogenic fungus of the soil in chickpea seeds.

Key words: antifungal, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, germination.

Resumo

O grão-de-bico é uma cultura de importância global devido ao seu valor nutricional; no entanto, a cultura é afetada por doenças de sementes e raízes causadas por *Fusarium* spp. E são aplicados fungicidas sintéticos para controlá-lo, portanto, produtos naturais à base de nos extratos vegetais, podem ser uma opção para o manejo sustentável das doenças dessa cultura. O objetivo desta investigação foi determinar a eficiência *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico de *Lippia palmeri* para o controle de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em sementes

de grão de bico. Ao meio PDA, 500, 1000 e 2000 ppm do extrato etanólico de *L. palmeri* mais um disco de ágar de cada patógeno foram adicionados e a inibição do crescimento micelial foi medida. Sementes de grão-de-bico foram imersas em cada concentração de *L. palmeri* por cinco e 10 minutos e, posteriormente, cada semente foi inoculada com *F. oxysporum* e *F. solani*, determinando-se a incidência da doença e o número de sementes germinadas. As três concentrações de *L. palmeri* inibiram ambos os patógenos *in vitro*. Nas sementes, o extrato etanólico de *L. palmeri* diminuiu a incidência de *F. solani* e manteve a germinação acima de 80 %. Para *F. oxysporum*, apenas a dose mais alta do extrato etanólico e o maior tempo de exposição diminuíram a incidência em 20 % e a germinação foi menor que 25 %. O extrato etanólico de *L. palmeri* pode ser uma opção para reduzir doenças causadas por fungos fitopatogênicos do solo em sementes de grão de bico

Palavras-chave: antifúngicos, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, germinação.

Introducción

La demanda constante de agro-productos libres de plaguicidas sintéticos ha obligado a implementar alternativas de producción, libres de residuos químicos dentro de los sistemas agrícolas (Sayuri *et al.*, 2018). Sin embargo, el control de hongos fitopatógenos sin el uso tradicional de plaguicidas sintéticos ha sido uno de los principales retos para el manejo sustentable de los cultivos. Actualmente, los productos naturales basados en extractos de plantas han generado un gran interés para el manejo de fitopatógenos, con la ventaja de que no presentan un impacto negativo al ambiente ni a la salud humana o animal (Shirazi *et al.*, 2020). Entre los diferentes compuestos antifúngicos que contienen los extractos de plantas destacan los alcaloides, taninos, quinonas, cumarinas, compuestos fenólicos y fitoalexinas (Wangkhem *et al.*, 2019), los cuales, han controlado

Introduction

The constant demand of agro-products free of synthetic pesticides has forced to implement production alternatives, free of chemical residues within agricultural systems (Sayuri *et al.*, 2018). However, the control of phytopathogenic fungus without the traditional use of synthetic pesticides has been one of the main challenges for the sustainable management of crops. Nowadays, natural products based on plant extracts have generated a big interest for the management of phytopathogens, with the advantage that they do not have a negative impact on the environment or on human or animal health (Shirazi *et al.*, 2020). Among the different antifungal compounds contained in plant extracts, there are: alkaloids, tannins, quinones, coumarins, phenolic compounds and phytoalexins (Wangkhem *et al.*, 2019), which have controlled efficiently to various phytopathogenic fungus

de manera eficiente a diversos hongos fitopatógenos como; *Botrytis cinerea* (Şesan *et al.*, 2015), *Colletotrichum* spp. (Melo *et al.*, 2016), *Fusarium* spp. (Wang *et al.*, 2016), *Phytophthora capsici* (Tala *et al.*, 2018), entre otros.

El orégano (*Lippia palmeri* Wats) de la familia Verbenaceae, ha sido usado tradicionalmente en la medicina popular para disminuir problemas respiratorios, digestivos, dolores de cabeza, reumatismo, entre otros (Leyva-López *et al.*, 2016). Además, se han estudiado sus propiedades farmacológicas (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2019), antioxidantes (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2019) y antimicrobianas (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011). De la gama de compuestos químicos que presenta *L. palmeri*, destacan el carvacrol, timol, eugenol y cimeno, debido a su alta acción antimicrobiana, causando principalmente disrupción de las membranas y paredes celulares de los microorganismos (Oyedemi *et al.*, 2009; Tornuk *et al.*, 2014).

El extracto etanólico de *L. palmeri* ha sido eficiente para el control de diversos patógenos de humanos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011) y fitopatógenos como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Borboa-Flores *et al.*, 2010). Hasta ahora, según concierne a los autores de este trabajo, no existen reportes de su aplicación para el control de hongos de raíz, los cuales, son uno de los fitopatógenos más comunes y severos de diversos cultivos.

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.), es un cultivo que se destaca por su alto valor nutricional, sin embargo, la cosecha se ve disminuida por diversos

such as; *Botrytis cinerea* (Şesan *et al.*, 2015), *Colletotrichum* spp. (Melo *et al.*, 2016), *Fusarium* spp. (Wang *et al.*, 2016), *Phytophthora capsici* (Tala *et al.*, 2018), among others.

The oregano (*Lippia palmeri* Wats) of the Verbenaceae family, has been traditionally used in popular medicine to decrease respiratory and digestive problems, headaches, rheumatism, among others (Leyva-López *et al.*, 2016). In addition, its pharmacological (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2019), antioxidants (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2019) and antimicrobials (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011) properties have been studied. From the range of chemical compounds that *L. palmeri* presents, there are the carvacrol, thymol, eugenol and cymene, due to its high antimicrobial action, mainly causing disruption of the membranes and cell walls of microorganisms (Oyedemi *et al.*, 2009; Tornuk *et al.*, 2014).

The ethanolic extract of *L. palmeri* has been efficient for the control of various human pathogens such as *Escherichiacoli* and *Staphylococcus aureus* (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011) and phytopathogens such as *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Borboa-Flores *et al.*, 2010). Until now, according to the authors of this work, there are no reports of its application for the control of root fungus, which are one of the most common and severe phytopathogens of various crops.

The chickpea (*Cicer arietinum* L.), is a crop that stands out for its high nutritional value, however, the harvest is diminished by various factors,

factores, destacando las enfermedades ocasionadas por diversos hongos fitopatógenos (Sankar *et al.*, 2019). *Fusarium oxysporum* y *F. solani* son dos hongos que causan enfermedades en semillas y raíz de plantas de garbanzo y están considerados como fitopatógenos de importancia debido a su amplia distribución mundial y a las pérdidas que producen anualmente, dentro de los principales síntomas que ocasionan están las pudriciones y/o necrosis en la semilla o pudrición y/o necrosis de raíz y marchitamiento general que provocan la muerte de las plantas en vivero o campo (Sunkad *et al.*, 2019).

En México, la variedad de garbanzo Blanco Sinaloa genera un grano con mayor demanda del mercado internacional, no obstante, ha mostrado susceptibilidad a las enfermedades de raíz (Frac *et al.*, 2016), por lo que el uso del extracto etanólico de *L. palmeri* pudiera ser una alternativa para el control de hongos fitopatógenos en esta especie.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico de *L. palmeri* para el control de *F. oxysporum* y *F. solani* en semillas de garbanzo.

Material y métodos

Obtención de la semilla

Se utilizaron semillas de garbanzo de la variedad Blanco Sinaloa (INIFAP, Ortega-Murrieta *et al.*, 2016), donada por productores de la región agrícola "Valle de Santo Domingo" ubicada en Ciudad Constitución, Baja California Sur, México (25°01'56" N, 111°40'13" O).

highlighting the diseases caused by various phytopathogenic fungus (Sankar *et al.*, 2019). *F. oxysporum* and *F. Solani* are two fungus that cause diseases in seeds and roots of chickpea plants and they are considered phytopathogens of importance due to their wide global distribution and the losses that they produce annually, among the main symptoms that they cause there are rots and / or necrosis in the seed or rot and / or root necrosis and general withering that causes the death of plants in seedling center or field (Sunkad *et al.*, 2019).

In Mexico, the Blanco Sinaloa chickpea variety generates a grain with higher demand in the international market, however, it has shown susceptibility to root diseases (Frac *et al.*, 2016), so the use of *L. palmeri* ethanolic extract could be an alternative for the control of phytopathogenic fungus in this specie.

The objective of the present research was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* efficiency of *L. palmeri* ethanolic extract for the control of *F. oxysporum* and *F. solani* in chickpea seeds.

Materials and methods

Seeds collection

Chickpea seeds of Blanco Sinaloa variety were used (INIFAP, Ortega-Murrieta *et al.*, 2016), donated by producers from the "Valle de Santo Domingo" agricultural region located in Ciudad Constitución, Baja California Sur, Mexico (25° 01'56" N, 111°40'13" O).

Hongos fitopatógenos

Los aislamientos de *F. oxysporum* y *F. solani* fueron suministrados por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. *F. oxysporum* y *F. solani*, fueron reactivados en placas Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 28 °C por siete días.

Prueba de patogenicidad

Para determinar la patogenicidad de *F. oxysporum* y *F. solani* se utilizaron semillas de garbanzo previamente esterilizadas con una solución de NaClO al 1 % m/v durante dos min, posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar por 30 min. La concentración de cada fitopatógeno se ajustó a 1×10^4 esporas. mL^{-1} utilizando un hematocitómetro y cada semilla fue inoculada con 20 μL de cada una de las suspensiones conidiales de *F. oxysporum* y *F. solani*. Se utilizó un lote de semillas sin fitopatógeno como grupo control. Las semillas se incubaron en una cámara ambiental a 28 ± 2 °C y 12 h de luz/oscuridad por siete días. La incidencia de la enfermedad (%) fue determinada en semillas con presencia de micelio y síntomas de pudriciones ocasionadas por los hongos, los cuales, fueron re-aislados en PDA para comprobar los postulados de Koch. Se utilizaron 30 semillas por tratamiento y el experimento fue realizado dos veces.

Material vegetal y preparación de extractos etanólicos de *L. palmeri*
Se colectaron plantas silvestres de *Lippia palmeri* en La Paz, Baja

Phytopathogenic fungus

The isolations of *F. oxysporum* and *F. Solani* were provided by the Laboratorio de Fitopatología del Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. *F. oxysporum* and *F. solani*, were reactivated in Petri dishes with the potato-dextrose-agar (PDA) culture media and incubated at 28° C for seven days.

Pathogenicity test

To determine the pathogenicity of *F. oxysporum* and *F. solani*, chickpea seeds previously sterilized with a solution of NaClO at 1 % m/v during 2 min were used, later, they were washed with sterile distilled water and left to dry for 30 min. The concentration of each phytopathogen was adjusted to 1×10^4 spores. mL^{-1} using a hematocytometer and each seed was inoculated with 20 μL of each of the *F. oxysporum* and *F. solani* conidial suspensions. A batch of seeds without phytopathogen was used as a control group. The seeds were incubated in an environmental chamber at 28 ± 2 °C and 12 h of light/darkness for seven days. The incidence of the disease (%) was determined in seeds with the presence of mycelium and symptoms of rot caused by fungus, which were re-isolated in PDA to verify Koch's postulates. Thirty seeds were used per treatment and the experiment was carried out twice.

Plant material and preparation of *L. palmeri* ethanolic extracts

Wild plants were collected from *Lippia palmeri* in La Paz, Baja California Sur, Mexico ($24^{\circ}08'32''$ N, $110^{\circ}18'39''$ W). To obtain the ethanolic

California Sur, México (24°08'32" N, 110°18'39" O). Para obtener el extracto etanólico (EE), las plantas se secaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por siete días. Posteriormente, el material seco se trituró y se depositaron 300 g en recipientes de vidrio de 1 L, conteniendo 900 mL de etanol al 96 % v/v . Los recipientes fueron sellados y almacenados por siete días a 25 °C en completa oscuridad. El macerado en etanol fue filtrado a través de papel de filtro Wathman No. 4 y el etanol fue evaporado en un evaporador rotativo (Buchi B-480) a 40 °C, hasta sequedad completa. El extracto etanólico de *L. palmeri* se mantuvo a temperatura de -4 °C, hasta su uso.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto etanólico de *L. palmeri*

El efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. solani* fue evaluado mediante el método de difusión en agar propuesto por Soyly *et al.* (2007). El volumen de PDA necesario para dispensar 15 mL/placa Petri fue preparado y esterilizado, una vez alcanzada la temperatura de 40 °C, se le agregó el volumen del extracto etanólico necesario para obtener las concentraciones de 500, 1000 y 2000 ppm, posteriormente, se colocó en el centro de las placas un disco de 0,5 cm de diámetro proveniente de un cultivo en PDA de siete días de cada fitopatógeno. Un grupo de placas con PDA fueron mezcladas con el fungicida sintético Captan (1 % N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida) a una dosis de 0,2 mg.mL⁻¹ e inoculadas

extract (EE), the plants were dried at room temperature (25 ± 2 °C) for seven days. After, the dry material was crushed and 300 g were deposited in 1 L glass containers, containing 900 mL of 96 % v/v ethanol. The containers were sealed and stored for seven days at 25 °C in complete darkness. The macerated in ethanol was filtered through Wathman No.4 filter paper and the ethanol was evaporated on a rotary evaporator (Buchi B-480) at 40 °C, until complete dryness. The ethanolic extract of *L. palmeri* was kept at a temperature of -4 °C, until its use.

In vitro evaluation of the antifungal activity of *L. palmeri* ethanolic extract

The effect of *L. palmeri* ethanolic extract on the inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. solani* was evaluated using the diffusion method in agar proposed by Soyly *et al.* (2007). The volume of PDA necessary to dispense 15 mL/Petri dish was prepared and sterilized, once the temperature of 40 °C was reach, the volume of the ethanolic extract necessary to obtain the concentrations of 500, 1000 and 2000 ppm was added, later, in the center of the plates a 0.5 cm diameter disc from the culture in PDA of each pathogen was placed. A group of plates with PDA were mixed with the Captan synthetic fungicide (1 % N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1.2 -dicarboximide) at a dose of 0.2 mg.mL⁻¹ and inoculated with each phytopathogen. As control treatment, PDA with ethanol at 96 % v/v and phytopathogen were mixed. The plates were incubated at 28 °C for 10 days. Ten replicates per

con cada fitopatógeno. Como tratamiento control se mezcló PDA con etanol al 96 % v/v y fitopatógeno. Las placas fueron incubadas a 28 °C por 10 días. Se utilizaron diez réplicas por tratamiento. Al final del experimento, se midió el diámetro (mm) del crecimiento radial de cada fitopatógeno y se expresó en porcentaje (%) de inhibición mediante la fórmula propuesta por Daryaei *et al.* (2016):

$$IM (\%) = 100 \times (C - R)/C$$

Dónde:

IM: Inhibición radial del fitopatógeno en porcentaje

C = Diámetro de la colonia del tratamiento control

R = Diámetro de la colonia del fitopatógeno de cada tratamiento

Efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre la germinación y la pudrición de las semillas de garbanzo causada por *F. oxysporum* y *F. solani*

Se utilizaron semillas de garbanzo previamente esterilizadas con una de solución de NaClO al 1 % m/v por dos min, posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar por 30 min. Lotes de semillas fueron embebidos en tres concentraciones (500, 1000 y 2000 ppm) del extracto etanólico de *L. palmeri* por cinco y 10 min. Seguidamente, cada semilla fue inoculada con 20 μ L de cada suspensión conidial (previamente ajustada a 1×10^4 esporas. mL^{-1}) de *F. oxysporum* y *F. solani*. Lotes de semillas fueron inoculados con cada fitopatógeno y el fungicida sintético Captan (1 % de N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida) a una

treatment were used. At the end of the experiment, the diameter (mm) of the radial growth of each phytopathogen was measured and it was expressed as a percentage (%) of inhibition by the formula proposed by Daryaei *et al.* (2016):

$$IM (\%) = 100 \times (C - R)/C$$

Where:

IM: Radial inhibition of the phytopathogen in percentage

C = Diameter of the colony of the control treatment

R = Diameter of the phytopathogen colony of each treatment

Effect of the ethanolic extract of *L. palmeri* on germination and rot of chickpea seeds caused by *F. oxysporum* and *F. solani*

Chickpea seeds previously sterilized with a solution of NaClO at 1% m/v for 2 min were used, after, they were washed with sterile distilled water and they were left to dry for 30 min. Seed lots were submerged in three concentrations (500, 1000 and 2000 ppm) of *L. palmeri* ethanolic extract for 5 and 10 min. Then, each seed was inoculated with 20 μ L of each conidial suspension (previously adjusted to 1×10^4 spores. mL^{-1}) of *F. oxysporum* and *F. solani*. Seed lots were inoculated with each phytopathogen and the Captan synthetic fungicide (1 % N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide) at a dose of 0.2 mg. mL^{-1} , another with ethanol at 96 % v/v and one more with sterile distilled water (ADE). A batch of seeds without fungus was considered as a control. The seeds were incubated in an

dosis de 0,2 mg.mL⁻¹, otro con etanol al 96 % v/v y uno más con agua destilada estéril (ADE). Un lote de semillas sin hongos fue considerado como control. Las semillas se incubaron en una cámara ambiental a 28 ± 2 °C y 12 h de luz/oscuridad por siete (7) días. Se determinó el porcentaje de la incidencia de la enfermedad y el porcentaje de semillas germinadas. Se utilizaron 30 semillas por tratamiento y el experimento fue realizado dos veces.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron procesados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se utilizó el paquete estadístico Statistica® v. 10,0 para Windows (StatSoft) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (p<0,05). Los porcentajes se transformaron con raíz cuadrada de arcoseno.

Resultados y discusión

Patogenicidad de *F. oxysporum* y *F. solani*

Ambos hongos tuvieron una incidencia del 100 % sobre las semillas de garbanzo. A las 24 h después de inoculado *F. solani*, se observó sobre las semillas de garbanzo un crecimiento micelial de color blanco a beige, con textura afelpada o esponjosa y a los tres (3) días la radícula mostró síntomas asociados a clorosis de tejido, flacidez y pudrición de la parte apical. En el caso de *F. oxysporum*, a las 24 h las semillas presentaron

environmental chamber at 28 ± 2 °C and 12 h of light/darkness for seven (7) days. The percentage of the incidence of the disease and the percentage of germinated seeds were determined. Thirty seeds per treatment were used and the experiment was carried out twice.

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design was used and the data were processed by a one-way analysis of variance (ANOVA). The Statistica® v. 10.0 statistical package was used for Windows (StatSoft) and Tukey's test (p<0.05) was used for the comparison of means. The percentages were transformed with arcsine square root.

Results and discussion

Pathogenicity of *F. oxysporum* and *F. solani*

Both fungus had an incidence of 100 % on chickpea seeds. At 24 h after inoculating *F. solani*, a white to beige mycelial growth with spongy texture was observed on the chickpea seeds and at day three (3) the radicle showed symptoms associated with tissue chlorosis, flaccidity and rot of the apical part. In the case of *F. oxysporum*, at 24 h the seeds presented plush mycelial growth of white to purple coloration and at day five (5) the radicle presented symptoms of tissue chlorosis. Re-isolation of both phytopathogens of chickpea seeds verified Koch's postulates.

Chickpea is a crop affected by more than 50 phytopathogens around the

crecimiento micelial afelpado de coloración blanco a púrpura y a los cinco (5) días la radícula presentó síntomas de clorosis de tejido. El re-aislamiento de ambos fitopatógenos de las semillas de garbanzo comprobó los postulados de Koch.

El garbanzo, es un cultivo afectado por más de 50 fitopatógenos alrededor del mundo (Nene *et al.*, 1996; Sankar *et al.*, 2018). Los hongos fitopatógenos, constituyen uno de los grupos de mayor importancia debido a las pérdidas que ocasionan en los cultivos. *F. solani* y *F. oxysporum* son dos fitopatógenos del suelo que afectan al garbanzo, ocasionando desde pudrición de semilla hasta la muerte de la planta, originando pérdidas económicas en todo el ciclo del cultivo (El Hazzat *et al.*, 2019; Tlemsani *et al.*, 2020). Además, el género *Fusarium* es considerado uno de los estresores bióticos para las plantas más importantes que presentan resistencia a los fungicidas sintéticos, complicando su control (Oliva-Ortiz *et al.*, 2017). Por lo tanto, la búsqueda de alternativas para disminuir enfermedades en las plantas ocasionadas por hongos fitopatógenos es una prioridad a nivel mundial (Shuping and Eloff, 2017).

Efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. solani*

Las tres concentraciones (500 ppm, 1000 ppm y 2000 ppm) del extracto etanólico de *L. palmeri* inhibieron significativamente el crecimiento radial de *F. solani* y *F. oxysporum* en comparación al tratamiento control (figura 1).

world (Nene *et al.*, 1996; Sankar *et al.*, 2018). The phytopathogenic fungus are one of the most important groups due to the losses they cause in crops. *F. solani* and *F. oxysporum* are two soil phytopathogens that affect chickpea, producing from seed rot to death of the plant, causing economic losses throughout the crop cycle (El Hazzat *et al.*, 2019; Tlemsani *et al.*, 2020). Also, the genus *Fusarium* is considered one of the biotic stressors for the most important plants that present resistance to synthetic fungicides, complicating their control (Oliva-Ortiz *et al.*, 2017). Therefore, the search for alternatives to reduce plant diseases caused by phytopathogenic fungus is a worldwide priority (Shuping and Eloff, 2017).

Effect of *L. palmeri* ethanolic extract on the mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. solani*

The three concentrations (500 ppm, 1000 ppm, and 2000 ppm) of *L. palmeri* ethanolic extract significantly inhibited the radial growth of *F. solani* and *F. oxysporum* in comparison to the control treatment (figure 1).

In the case of *F. oxysporum*, the concentration of 2000 ppm of *L. palmeri* ethanolic extract, inhibited the phytopathogen by 100 % and for the case of *F. solani*, the concentrations of 1000 and 2000 ppm of this Fabaceae inhibited it by 100 %. With the Captan synthetic fungicide the inhibition of *F. oxysporum* was 79 % and for *F. solani* was 100%. The control (ethanol) had no inhibition effects on both phytopathogens (figure 2).

Plant extracts have a broad antimicrobial activity towards various

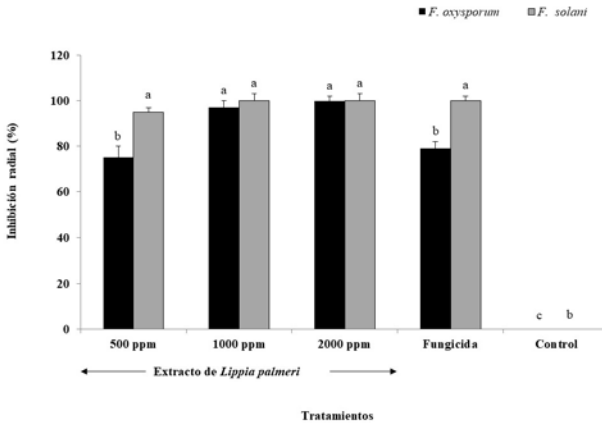


Figura 1. Efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Lippia palmeri* sobre la inhibición micelial de *F. solani* y *F. oxysporum*. Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Figure 1. *In vitro* effect of ethanolic extract of *Lippia palmeri* extract on the mycelial inhibition of *F. solani* and *F. oxysporum*. Columns with different letters indicate significant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

En el caso de *F. oxysporum*, la concentración de 2000 ppm del extracto etanólico de *L. palmeri*, inhibió al fitopatógeno en un 100 % y para el caso de *F. solani*, las concentraciones de 1000 y 2000 ppm de esta Fabaceae, lo inhibieron un 100 %. Con el fungicida sintético Captan la inhibición de *F. oxysporum* fue del 79 % y para *F. solani* del 100 %. El control (etanol) no tuvo efectos de inhibición sobre ambos fitopatógenos (figura 2).

Los extractos de plantas tienen una amplia actividad antimicrobiana hacia diversos fitopatógenos debido al contenido de sustancias activas como fitoalexinas y fitoantocianinas que contienen alcaloides, flavónidos, terpenoides, fenoles, glucósidos, taninos y / o ácidos grasos (Andrade-Bustamante *et al.*, 2018).

phytopathogens due to the content of active substances such as phytoalexins and phytoanthocyanins that contain alkaloids, flavonides, terpenoids, phenols, glycosides, tannins and / or fatty acids (Andrade-Bustamante *et al.*, 2018).

The ethanolic extract of *L. palmeri* inhibited *F. solani* and *F. oxysporum* *in vitro* and *in vivo*, which could be mainly due to the content of aromatic monoterpenes such as carvacrol and thymol, and to alkylbenzenecymene, which have been reported as important antifungals. (Wang *et al.*, 2018).

Various studies show that these monoterpenes inhibit phytopathogenic fungus mainly due to the damage they cause to their membrane structure, inhibition of biosynthesis and nucleic acids function, interference of essential metabolic processes, induction of

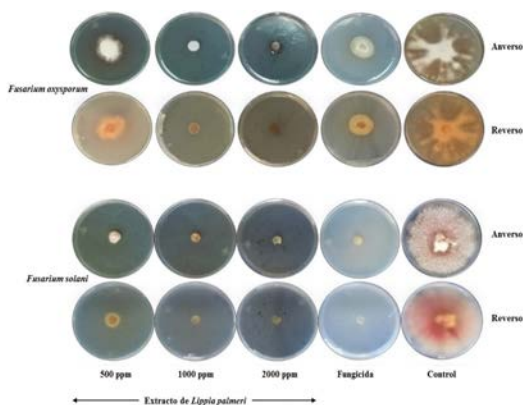


Figura 2. Efecto *in vitro* de tres concentraciones del extracto etanólico de *Lippia palmeri* sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. solani*. Fungicida = Captan (0,2 mg.mL⁻¹). Control = etanol al 96 % *v/v*.

Figure 2. *In vitro* effect of three concentrations of ethanolic extract of *Lippia palmeri* on the mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. solani*. Synthetic fungicide = Captan (0.2 mg.mL⁻¹). Control = 96 % ethanol *v/v*.

El extracto etanólico de *L. palmeri* inhibió *in vitro* e *in vivo* a *F. solani* y *F. oxysporum*, lo cual pudiera deberse principalmente al contenido de monoterpenos aromáticos como el carvacrol y timol, y al alquibenceno *p*-cimeno, los cuales, han sido reportados como importantes antifúngicos (Wang *et al.*, 2018).

Diversos estudios demuestran que estos monoterpenos inhiben a los hongos fitopatógenos principalmente por el daño que ocasionan en la estructura de su membrana, inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales, inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción en la comunicación celular normal (Radulovic *et al.*, 2013), inhibición de la fosforilación oxidativa de la membrana celular y de enzimas como la celulasa, pectinasa, lacasa, xilanasa, entre otras, causando una limitación en

coagulation of cytoplasmic components and interruption in normal cellular communication (Radulovic *et al.*, 2013), inhibition of oxidative phosphorylation of the cell membrane and of enzymes such as cellulase, pectinase, laccase, xylanase, among others, causing a limitation in the absorption of nutrients (complexation of metals and insolubilization of proteins) for the fungus (Lattanzio *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2017).

Effect of *L. palmeri* ethanolic extract on germination and rot of chickpea seeds caused by *F. solani* and *F. oxysporum*

The different doses of *L. palmeri* ethanolic extract significantly decreased the incidence of *F. solani* and they kept germination of chickpea seeds over 80 % (figure 3).

The application of 2000 ppm of *L. palmeri* ethanolic extract for 5 and 10 min in the seeds, significantly reduced

la absorción de nutrientes (complejación de metales e insolubilización de proteínas) para el hongo (Lattanzio *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2017).

Efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre la germinación y la pudrición de las semillas de garbanzo causada por *F. solani* y *F. oxysporum*

Las distintas dosis del extracto etanólico de *L. palmeri* disminuyeron significativamente la incidencia del *F. solani* y mantuvieron sobre el 80 % la germinación de las semillas de garbanzo (figura 3).

the incidence of the phytopathogen by less than 26 %, surpassing the treatment with Captan synthetic fungicide. The seeds submerged in both times with 1000 ppm of the extract of *L. palmeri*, presented similar statistical values to the treatment with Captan. In treatments with ADE (sterile distilled water) and ethanol, the incidence of *F. solani* was higher than 82 %. No damaged seeds were observed in the control treatment.

Regarding to the germination of the seeds, the control treatment presented more than 94%. The germination of

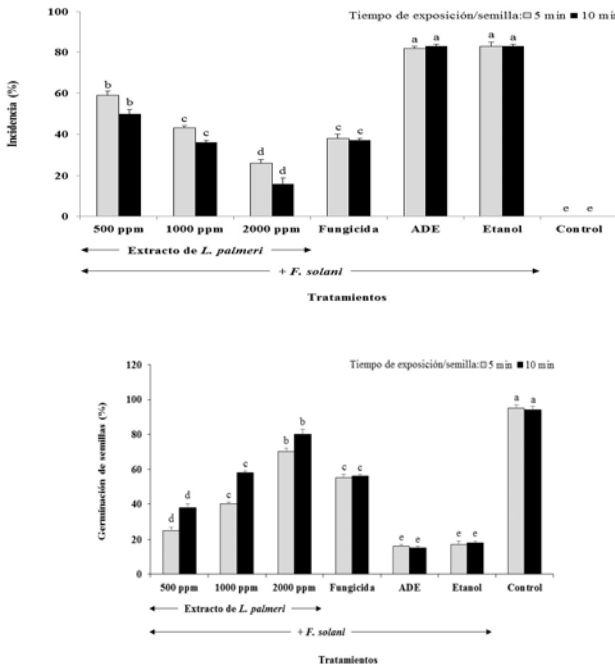


Figura 3. Efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre la protección de semillas de garbanzo. A) Incidencia de *F. solani*. B) Porcentaje de semillas germinadas. Fungicida = Captan (0,2 mg.mL⁻¹). ADE = agua destilada estéril. Etanol = etanol al 96 % v/v. Control = sin fitopatógeno. Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey (p<0,05).

Figure 3. Effect of the ethanolic extract of *L. palmeri* on the protection of chickpea seeds. A) Incidence of *F. solani*. B) Percentage of sprouted seeds. Synthetic fungicide = Captan (0.2 mg.mL⁻¹). ADE = sterile distilled water. Ethanol = 96 % ethanol v/v. Control = without phytopathogen. Columns with different letters indicate significant differences according to the Tukey test (p<0.05).

La aplicación de 2000 ppm del extracto etanólico de *L. palmeri* por cinco y 10 min en las semillas, redujeron significativamente en menos del 26 % la incidencia del fitopatógeno, superando al tratamiento con el fungicida sintético Captan. Las semillas embebidas en ambos tiempos con 1000 ppm del extracto de *L. palmeri*, presentaron valores estadísticos similares al tratamiento con Captan. En los tratamientos con ADE (agua destilada estéril) y etanol, la incidencia de *F. solani* fue superior de 82 %. No se observaron semillas dañadas en el tratamiento control.

En relación a la germinación de las semillas, el tratamiento control presentó más del 94 %. La germinación de las semillas embebidas en 2000 ppm del extracto etanólico de *L. palmeri* por cinco y 10 min, presentaron valores del 70 y 80 %, respectivamente. Las semillas con 1000 ppm del extracto etanólico de *L. palmeri*, presentaron valores estadísticos de germinación similares al tratamiento con Captan. En los tratamientos con ADE (agua destilada estéril) y etanol, la germinación fue menor del 18 %.

Con respecto a la germinación y la pudrición de las semillas de garbanzo causada por *F. oxysporum* solo la dosis más alta del extracto etanólico de *L. palmeri*, disminuyó significativamente la incidencia del hongo cuando las semillas de garbanzo fueron embebidas por 10 min y la germinación fue del 25 % (figura 4).

the seeds submerged in 2000 ppm of *L. palmeri* ethanolic extract for five and 10 min, presented values of 70 and 80 %, respectively. The seeds with 1000 ppm of *L. palmeri* ethanolic extract, presented statistical values of germination similar to the treatment with Captan. In the treatments with ADE (sterile distilled water) and ethanol, the germination was less than 18 %.

According to the germination and rot of chickpea seeds caused by *F. oxysporum*, only the highest dose of *L. palmeri* ethanolic extract significantly decreased the incidence of the fungus when chickpea seeds were submerged for 10 min and germination was of 25 % (figure 4).

The incidence of treatment only with *F. oxysporum* was higher than 80 % in the rest of the treatments, reducing seed germination by less than 6 %. In the treatments with ADE (sterile distilled water) and ethanol, no incidence of *F. oxysporum* was observed and the germination of the seeds was 95 %.

The chickpea seeds submerged in *L. palmeri* ethanolic extract were protected towards *F. solani*, in addition to maintain a high level of germination, overcoming the effect of the Captan synthetic fungicide, due to plant extracts are an option to maintain the vigor and health of seeds, essential characteristics for the yield and quality of the crops (Sayuri *et al.* 2018).

The *L. palmeri* ethanolic extract did not significantly decrease the incidence of *F. oxysporum*, therefore a low germination of chickpea

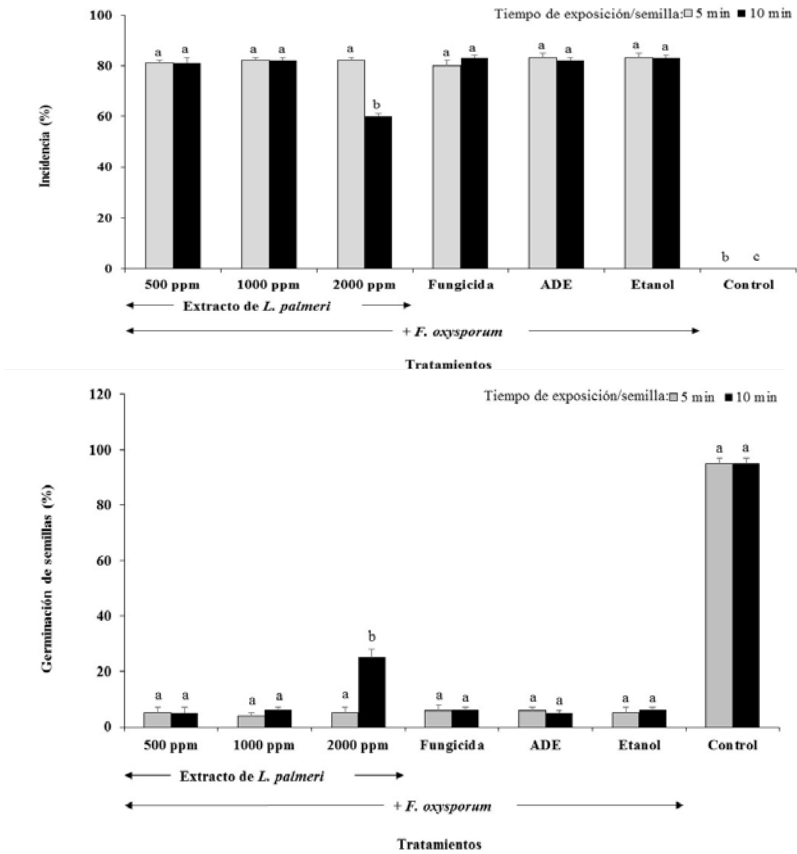


Figura 4. Efecto del extracto etanólico de *L. palmeri* sobre la protección de semillas de garbanzo. A) Incidencia de *F. oxysporum*. B) Porcentaje de semillas germinadas. Fungicida = Captan (0,2 mg.mL⁻¹). ADE = agua destilada estéril. Etanol = etanol al 96 % v/v. Control = Sin .topatógeno. Columnas con letras diferentes indican diferencias signi.cativas de acuerdo a la prueba de Tukey (p< 0,05).

Figure 4. Effect of the ethanolic extract of *L. palmeri* on the protection of chickpea seeds. A) Incidence of *F. oxysporum*. B) Percentage of sprouted seeds. Synthetic fungicide = Captan (0.2 mg.mL⁻¹). ADE = sterile distilled water. Ethanol = 96 % ethanol v/v. Control = without phytopathogen. Columns with different letters indicate signi.cant differences according to the Tukey test (p< 0,05).

La incidencia del tratamiento solo con *F. oxysporum* fue superior al 80 % en el resto de los tratamientos, disminuyendo la germinación de las semillas en menos del 6 %. En los tratamientos con ADE (agua

seeds was quantified, however, the highest dose and the longest time of exposure of the seed to the extract decreased the presence of the phytopathogen so, it is necessary to evaluate in future works a longer

destilada estéril) y etanol, no se observó incidencia de *F. oxysporum* y la germinación de las semillas fue del 95 %.

Las semillas de garbanzo embebidas en el extracto etanólico de *L. palmeri* fueron protegidas hacia *F. solani*, además de mantener un alto nivel de germinación superando al efecto del fungicida sintético Captan, por lo que los extractos de plantas son una opción para mantener el vigor y sanidad de las semillas, características indispensables para el rendimiento y calidad de los cultivos (Sayuri *et al.* 2018).

El extracto etanólico de *L. palmeri* no disminuyó significativamente la incidencia de *F. oxysporum* por lo tanto se cuantificó una baja germinación de las semillas de garbanzo, sin embargo, la dosis más alta y el mayor tiempo de exposición de la semilla al extracto disminuyó la presencia del fitopatógeno, por lo que es necesario evaluar en futuros trabajos un mayor tiempo de exposición de la semilla en dosis más altas del extracto etanólico de *L. palmeri* para lograr el control de este fitopatógeno. Al respecto Onaran y Yanar (2016) y Iqbal *et al.* (2019), mencionan la importancia de determinar en los extractos vegetales la dosis de inhibición por fitopatógeno para posteriormente aplicar una dosis que garantice una mejor eficiencia para su control.

La baja eficiencia del fungicida sintético para el control de *F. oxysporum* en las semillas de garbanzo probablemente se deba a la resistencia hacia los grupos químicos del fungicida, la virulencia

exposure time of the seed in higher doses of the *L. palmeri* ethanolic extract to achieve the control of this phytopathogen. In this regard, Onaran and Yanar (2016) and Iqbal *et al.* (2019), mention the importance of determining the plant inhibition dose in plant extracts to subsequently apply a dose that guarantees a better efficiency for its control.

The low efficiency of the synthetic fungicide for the control of *F. oxysporum* in chickpea seeds is probably due to the resistance to the chemical groups of the fungicide, the virulence of the phytopathogen, host susceptibility, abiotic conditions, among others (Mengist *et al.*, 2018).

Conclusions

The *L. palmeri* ethanolic extract reduced the radial growth of *F. solani* and *F. oxysporum* in vitro, and its application in chickpea seeds reduced the incidence of both phytopathogens. Plant extracts can be an efficient option in the management of phytopathogenic fungus associated with seeds, being an ecological and low cost solution.

End of English Version

del fitopatógeno, susceptibilidad del hospedero, condiciones abióticas, entre otros (Mengist *et al.*, 2018).

Conclusiones

El extracto etanólico de *L. palmeri* disminuyó *in vitro* el crecimiento radial de *F. solani* y *F. oxysporum* y

su aplicación en semillas de garbanzo redujo la incidencia de ambos fitopatógenos. Los extractos de plantas pueden ser una opción eficiente en el manejo de hongos fitopatógenos asociados a semillas, siendo una solución ecológica y de bajo costo.

Literatura citada

- Andrade-Bustamante, G., L. Cervantes-Díaz, C. Ail-Catzim, C. del Toro-Sánchez, J. Borboa-Flores, P. Preciado-Rangel, F. Martínez-Ruiz y E. Rueda-Puente. 2018. Potential of oregano and cachanilla extracts for the control of phytopathogenic fungi in tomato fruits. *ITEA* 114(4): 344-352.
- Borboa-Flores, J., E. Rueda-Puente, E. Acedo-Félix, J. Ponce, M. Cruz-Villegas, J. García-Hernández y M. Ortega-Nieblas. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12(3): 539-547.
- Daryaei, A., E. Jones, T. Glare y R. Falloon. 2016. Nutrient amendments affect *Trichoderma atroviride* conidium production, germination and bioactivity. *Biol. Control* 93: 8-14.
- El Hazzat, N., A. Touhami, M. Chliyeh, A. Errifi, K. Selmaoui, R. Benkirane y A. Douira. 2019. Effect of a composite endomycorrhizal inoculum on the manifestation of chickpea wilt, caused by *Fusarium solani*. *Plant Cell Biotech. Mol. Biol.* 486-500.
- Frac, M., A. Gryta, K. Oszust y N. Kotowicz. 2016. Fast and accurate microplate method (biolog mt2) for detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Front. Microbiol.* 7(489): 1-16. Gutiérrez-Grijalva, E., M. Antunes-Ricardo, B. Acosta-Estrada, J. Gutiérrez-Urbe y J. Heredia. 2019. Cellular antioxidant activity and *in vitro* inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Res. Int.* 116: 676-686.
- Iqbal, J., B. Abbasi, T. Mahmood, S. Kanwal, R. Ahmad y M. Ashraf. 2019. Plant-extract mediated green approach for the synthesis of ZnONPs: Characterization and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant potentials. *J. Mol. Struct.* 1189: 315-327.
- Lattanzio, V., V. Lattanzio y A. Cardinali. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, ISBN: 81-308-0034-9 Editor: Filippo Imperato. Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India. Pp- 23-67.
- Leyva-López, N., V. Nair, W. Bang, L. Cisneros-Zevallos y J. Heredia. 2016. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* 187: 302-312.
- Melo, P., E. Alves, C. Martins, A. Anjos Neto, K. Pinto, L. Araújo, C. Vieira y L. Nascimento. 2016. Extracts of *Caesalpinia ferrea* and *Trichoderma* sp. on the control of *Colletotrichum* sp. transmission in *Sideroxylon obtusifolium* seeds. *Rev. Bras. Plantas Med.* 18(2): 494-501.
- Mengist, Y., S. Sahile, A. Sintayehu y S. Singh. 2018. Evaluation of chickpea varieties and fungicides for the management of chickpea *Fusarium* wilt disease (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) at Adet Sick Plot in Northwest Ethiopia. *Int. J. Agro.* 7.
- Morales, J., L. Mendoza y M. Cotoras. 2017. Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the antifungal action of p-coumaric acid against *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.* 123(4): 969-976.
- Nene, Y., V. Sheila y S. Sharma. 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. (V Edition), ICRISAT, Patancheru (A.P.) India, pp. 1-27.
- Oliva-Ortiz, L., T. Velázquez-Alcaraz, R. Sosa-Pérez, L. Partida-Ruvalcaba, T. Díaz-Valdés, J. Arciniega-Ramos y C. López-Orona. 2017. Control de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. *Agrociencia* 51: 683-695.

- Onaran, A. y Y. Yanar. 2016. *In vivo* and *in vitro* antifungal activities of five plant extracts against various plant pathogens. *Egypt. J. Biol. Pest Co.* 26(2): 405.
- Ortega-Murrieta, P., G. Fierros-Leyva, I. Padilla-Valenzuela, V. Valenzuela-Herrera, J. Acosta-Gallegos, E. Gutiérrez-Perez, S. Velarde-Félix y F. Rodríguez-Cota. 2016. Blanco, nueva variedad de garbanzo blanco de grano extra grande para exportación. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(1): 209-216.
- Ortega-Nieblas, M., M. Robles-Burgueño, E. Acedo-Félix, A. González-León, A. Morales-Trejo y L. Vázquez-Moreno. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(1): 11-17.
- Oyedemi, S., A. Okoh, L. Mabinya, G. Pirochenva y A. Afolayan. 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, γ -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 1280-1286.
- Radulovic, N., P. Blagojevic, Z. Stojanovic-Radic y N. Stojanovic. 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr. Med. Chem.* 20(7): 932-952.
- Sankar, P., S. Vanitha, A. Kamalakannan, P. Raju y P. Jeyakumar. 2018. Prevalence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing wilt in chickpea and its pathogenic, cultural and morphological characterization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7(2): 1301-1313.
- Sankar, P., S. Vanitha, A. Kamalakannan, P. Raju y P. Jeyakumar. 2019. Biological management of *Fusarium* wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Legume Res.* 42(6): 838-843.
- Sayuri, I., M. Duarte, P. Carmignani, C. Pulcinelli y M. Machado. 2018. Effect of fungal incidence on physiological quality of tobacco seeds used in Brazil. *Arq. Ins. Biol.* 85: 1-6.
- Şesan, T., E. Enache, B. Iacomi, M. Oprea, F. Oancea y C. Iacomi. 2015. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Sci. Pol. Hortoru.* 14(1): 29-43.
- Shirazi, M., M. Abid, F. Hussain, A. Abbas y U. Sitara. 2020. Antifungal activity of some medicinal plant extracts against soil-borne phytopathogens. *Pak. J. Bot.* 52(2): 679-685.
- Shuping, D. y J. Eloff. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14(4): 120-127.
- Soylu, S., H. Yigitbas, E. Soyly y S. Kurt. 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1021-1030.
- Sunkad, G., H. Deepa, T. Shruthi y D. Singh. 2019. Chickpea wilt: status, diagnostics and management. *Indian Phytopathol.* 1-9.
- Tala, M., M. Ansary, F. Talontsi, T. Kowa, M. Islam y P. Tane. 2018. Anthraquinones and flavanols isolated from the vegetable herb *Rumex abyssinicus* inhibit motility of *Phytophthora capsici* zoospores. *S. Afr. J. Bot.* 115: 1-4.
- Tlemsani, M., Z. Fortas, S. Dib y M. Bellahcen. 2020. Inoculation with *Streptomyces* decreases vascular wilt of chickpea infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *South Asian J. Exp. Biol.* 9(6): 249-254.
- Tornuk, F., I. Ozturk, O. Sagdic, A. Yilmaz y O. Erkmén. 2014. Application of predictive inactivation models to evaluate survival of *Staphylococcus aureus* in fresh-cut apples treated with different plant hydrosols. *Int. J. Food Prop.* 17(3): 587-598.
- Wang, K., S. Jiang, T. Pu, L. Fan, F. Su y M. Ye. 2018. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. *Nat. Prod. Res.* 33(10): 1423-1430.

Wang, S., Y. Zheng, F. Xiang, S. Li y G. Yang. 2016. Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. J. Food Drug Anal. 24(4): 881-887.

Wangkhem, B., M. Rana y K. Jackson. 2019. Exploring the control measures of white rust-organic amendments, botanicals, biocontrol agents and chemicals. J. Pharmacogn. Phytochem. 8(3): 4413-4419.