

EFFECTIVENESS OF BOTH SYNTHETIC COMPOUNDS AND BIOLOGICAL EXTRACTS AGAINST POWDERY MILDEW (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) ON WINTER WHEAT

EFFECTIVIDAD DE COMPUESTOS SINTÉTICOS Y EXTRACTOS BIOLÓGICOS CONTRA EL MOHO (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) EN TRIGO DE INVIERNO

Lubomír Věchet^{1*}, Božena Šerá²

¹Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, 161 06 Prague, Czech Republic.

²Department of Biology, Faculty of Education, University of South Bohemia, Jeronýmova 10, 371 15 České Budějovice, Czech Republic. (bsera@pf.jcu.cz)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of foliar application of various synthetic compounds and biological extracts against powdery mildew on wheat. Seed coats of winter wheat were treated by synthetical compounds (benzothiadiazole, salicylic acid, and glycine betaine) or by the extracts from plants (oak, giant knotweed, curcuma, and ginger). Then the seeds were planted using small-field experiments with powdery mildew infection (repetitions over a two-year period; experimental field in Ruzyně, Prague). Leaf area infection was measured and the Cumulative Proportion of Leaf Area Diseased (CPLAD) was calculated. Data were analysed using ANOVA (Tukey test, $p \leq 0.05$). Effectiveness of preparations varied 30 % to 72 % in 2008, and 25 % to 65 % in 2009. The most effective synthetical compound was benzothiadiazole and the most effective biological extract was one from giant knotweed in both years ($p \leq 0.05$). Besides, plants treated with salicylic acid or glycine betaine had the least activity against powdery mildew ($p \leq 0.05$). Effectiveness in both years of cultivation was ($p > 0.05$) similar, which indicates good stability of the biological extracts used. These findings suggest that these biological extracts may be a good preparation for using in organic farming.

Key words: biotechnology, curcuma, giant knotweed, ginger, infection, oak.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de la aplicación foliar de varios compuestos sintéticos y extractos biológicos contra el moho polvoriento del trigo. La testa de las semillas de trigo de invierno se trataron con compuestos sintéticos (benzotiadiazol, ácido salicílico, y glicina betaína) o con extractos de plantas (roble, knotweed gigante, cúrcuma y jengibre). Luego las semillas se plantaron en pequeños experimentos de campo con infección de moho polvoriento (repeticiones en un período de dos años campo experimental en Ruzyně, Prague). El área foliar de la infección se midió y se calculó la proporción acumulada de área foliar enferma (CPLAD). Los datos se analizaron con ANDEVA (Tukey, $p \leq 0.05$). La efectividad de las preparaciones varió de 30 % a 72 % en 2008 y de 25 % a el 65 % en 2009. El compuesto sintético más efectivo fue el benzotiadiazol y el extracto biológico más eficaz fue uno del knotweed gigante en ambos años ($p \leq 0.05$). Además, las plantas tratadas con ácido salicílico o glicina betaína tuvieron la menor actividad contra el moho polvoriento ($p \leq 0.05$). La efectividad en ambos años de cultivo fue similar ($p > 0.05$), lo cual indica una buena estabilidad de los extractos biológicos. Estos hallazgos sugieren que estos extractos biológicos pueden ser una buena preparación para usarse en la agricultura ecológica.

Palabras clave: biotecnología, cúrcuma, knotweed gigante, jengibre, infección, roble.

INTRODUCCIÓN

El libro “European Crop Protection in 2030”, sobre la protección de cultivos en la agricultura europea, fue aceptado por el Parlamento

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: February, 2014. Approved: December, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 77-85. 2015.

INTRODUCTION

The 'European Crop Protection in 2030' book about crop protection in European agriculture was accepted by the European parliament and restrictions in the usage of pesticides were established (Labussiere *et al.*, 2010). Plant resistance is an important component of modern, sustainable agriculture (Asadi *et al.*, 2013). Understanding plant mechanisms that tolerate pathogens, insects, and abiotic stress are critical for understanding ways of increasing plant production and crop yields (Deepak *et al.*, 2003; Khademi *et al.*, 2012; Stenglein *et al.*, 2012).

Induced resistance (IR) is a process of active resistance dependent on the host plant's physical or chemical barriers, triggered by biotic or abiotic agents (Kloepper *et al.*, 1992). In its broadest sense IR means a control of pathogens and pests by prior activation of genetically programmed plant defence pathways. This enhanced state of resistance is effective for fungi, bacteria, viruses, nematodes, parasitic plants, and insect herbivores (Walling, 2000; Deepak *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2005).

Systemic acquired resistance (SAR) is a mechanism of induced plant defense to confer long-lasting protection against a broad spectrum of microorganisms (Durrant and Dong, 2004). SAR was characterized in plant mouse ear cress (*Arabidopsis* sp.) as the marked reduction in susceptibility to disease resulting from prior infection with an avirulent necrotizing pathogen.

Benzothiadiazole (BTH) induces disease resistance to various plant pathogens (Qiu *et al.*, 2004). Görlach *et al.* (1996) report successful control of powdery mildew, Septoria leaf spot (*Septoria* spp.), and leaf rust [*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* (Eriks and E. Henn.) D.M. Henderson] of wheat in field trials. BTH was also effective against downy mildew in maize [*Peronosclerospora sorghi* (W. Weston and Uppal) C.G. Shaw] in the field when applied as a seed treatment (Morris *et al.*, 1998). Stadnik and Buchenauer (1999a, b) report success in field experiments with single applications of BTH for controlling powdery mildew of wheat, but they had not clear results for Septoria leaf blotch (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz). Salicylic acid and glycine betaine have an obvious effect like BTH (Vechet *et al.*, 2009). Salicylic acid has a well-known ability

Europeo y se establecieron restricciones en el uso de pesticidas (Labussière *et al.*, 2010). La resistencia de las plantas es un componente importante de la agricultura moderna y sostenible (Asadi *et al.*, 2013). Entender los mecanismos de las plantas que toleran patógenos, insectos y estrés abiótico son fundamentales para comprender la manera de aumentar la producción de la planta y rendimientos de cultivos (Deepak *et al.*, 2003; Khademi *et al.*, 2012; Stenglein *et al.*, 2012).

La resistencia inducida (RI) es un proceso de resistencia activa que depende de las barreras físicas o químicas de la planta huésped, provocada por agentes bióticos o abióticos (Kloepper *et al.*, 1992). En su más amplio sentido la RI significa un control de patógenos y plagas por activación previa de las vías de defensa de la planta programadas genéticamente. Este estado mejorado de resistencia es eficaz para hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parásitas e insectos herbívoros (Walling, 2000; Deepak *et al.*, 2003; Walters *et al.*, 2005).

La resistencia sistémica adquirida (RSA) es un mecanismo de defensa de la planta inducida para conferir protección de larga duración contra un amplio espectro de microorganismos (Durrant y Dong, 2004). La RSA se caracterizó en una planta de berro (*Arabidopsis* sp.) como la reducción marcada de susceptibilidad a la enfermedad resultante de una infección previa con un patógeno necrosante no virulento.

El benzotiadiazol (BTH) induce resistencia a la enfermedad por varios patógenos de las plantas (Qiu *et al.*, 2004). Görlach *et al.* (1996) reportan el control satisfactorio del moho polvoriento, Septorios de la hoja (*Septoria* spp.), y roya de la hoja [*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* (Eriks y E. Henn.) D. M. Henderson] del trigo en las pruebas de campo. El BTH también fue eficaz contra el moho polvoriento del maíz [*Peronosclerospora sorghi* (W. Weston y Uppal) CG Shaw] en el campo cuando se aplica como un tratamiento de semillas (Morris *et al.*, 1998). Stadnik y Buchenauer (1999a, b) reportan éxito en experimentos de campo con aplicaciones únicas de BTH para controlar el moho polvoriento de trigo, pero no hubo resultados claros para tizón foliar Septoria (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz). El ácido salicílico y glicina betaína tienen un

to induce resistance and potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance (Mur *et al.*, 1996). Glycine betaine is quaternary ammonium compound and has a role in plants during stress (Ashraf and Foolad, 2007).

In comparison to the synthetic compounds, influence of plant extract for reducing plant pathogen is not well known. According to Vechet *et al.* (2005, 2009), plant extract treatment shows a positive effect against plant pathogen; most of their experiments were carried out in laboratory and for field experiments they suggest using oak, giant knotweed, curcuma, and ginger.

Oak bark can be used in biological-dynamic agriculture because it supports disease resistance of plants (Dostálek and Hradil, 1998). Giant knotweed shows preventive and protective effects on powdery mildew in many plants and preparation Milsana[®], based on giant knotweed, is commercially available (Wurms *et al.*, 1999). Turmeric spice (curcuma) contains the flavonoid curcumin (diferuloylmethane), a low molecular weight polyphenol (Chainani-Wu, 2003), and curcumol. The major constituents of the ginger spice essential oil are sesquiterpenes zingiberene (35 %) and farnesene (10 %). monoterpenes (1,8-cineol, linalol, borneol, neral and geraniol) are also found, but in lower concentrations (Sakamura *et al.*, 1986).

Therefore, the aim of this study was to test the effectiveness of individual resistance inducers of chemical and biological origin on the severity of powdery mildew in field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Material

Three chemical substances and four plant extracts were used in the experiment. Chemical inducers benzothiadiazole (BTH, 1.2 mM; commercially produced as Bion[®] and containing 50 % of BTH), salicylic acid (SA, 1 mM), and glycine betaine (GB, 0.3 M) were prepared as water solutions (Vechet *et al.*, 2009).

Biological extracts were prepared from biomass (100 g) of: oak (*Quercus robur* L.), giant knotweed (*Polygonum sachalinense* Friedr. Schmidt), turmeric spice known as curcuma (*Curcuma longa* L.), and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Dried crushed oak bark (QR), dried crushed leaves of giant knotweed (PS), turmeric spice (CL), and ginger spice

efecto obvio como BTH (Vechet *et al.*, 2009). El ácido salicílico tiene una capacidad bien conocida para inducir resistencia y potenciar la expresión de genes de defensa en tejido con resistencia adquirida (Mur *et al.*, 1996). La glicina betaína es un compuesto de amonio cuaternario y tiene una función en las plantas durante el estrés (Ashraf y Foolad, 2007).

En comparación con los compuestos sintéticos, la influencia del extracto de planta para reducir patógenos de plantas no se conoce bien. Según Vechet *et al.* (2005, 2009), el tratamiento con extracto de planta muestra un efecto positivo contra patógeno de la planta; la mayoría de sus experimentos se realizó en laboratorio y para experimentos en campo sugieren usar roble, knotweed gigante, cúrcuma y jengibre.

La corteza de roble puede usarse en agricultura biodinámica, ya que apoya la resistencia a enfermedades de las plantas (Dostálek y Hradil, 1998). El knotweed gigante muestra efectos de prevención y protección contra el moho polvoriento en muchas plantas y la preparación Milsana[®], basada en el knotweed gigante, está disponible comercialmente (Wurms *et al.*, 1999). La especia cúrcuma contiene el flavonoide curcumina (diferuloylmetano), un polifenol de bajo peso molecular (Chainani-Wu, 2003), y curcumol. Los principales componentes del aceite esencial de la especia jengibre son sesquiterpenoides zingibereno (35 %) y farneseno (10 %). También hay monoterpenoides (1,8-cineol, linalol, borneol, neral y geraniol), pero en concentraciones más bajas (Sakamura *et al.*, 1986).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de inductores de resistencia individuales de origen químico y biológico sobre la severidad del moho polvoriento en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

En el experimento se usaron tres sustancias químicas y cuatro extractos de planta. Los inductores químicos benzotiadiazol (BTH, 1.2 mM; producido comercialmente como Bion[®] y contiene 50 % de BTH), ácido salicílico (AS, 1 mM), y glicina betaína (GB, 0.3 M) se prepararon como soluciones de agua (Vechet *et al.*, 2009).

(ZO) were extracted in 850 mL 20 % ethanol during 5 h with frequent shaking. The mixture was filtered through miracloth. Both chemical substances and biological extracts were used for wheat treatment.

Field experiment

Small-plot field experiments were carried out at the Crop Research Institute (Prague Ruzyně, 50° 5.1676' N, 14° 18.0464' E). Soil type is orthic luvisol, clay-loam, developed on dilluvial sediments mixed with loess, soil reaction is neutral (pH KCl is 6.8-7.1) in the profile (Simon, 2005). The winter wheat cultivar Kanzler (*Triticum aestivum* L. cv. Kanzler), which is regarded a standard for its susceptibility to powdery mildew, was used. Wheat was grown in a standard way and infection by powdery mildew was natural.

One small-plot with 1 m row length was used for one type of treatments (in two repetitions). The rows were isolated on both sides by five rows of plants of the same cultivar, which had not been treated. Each first neighbouring rows were treated using one type of preparations, whereas the next five rows did not receive any treatment. Seven individual preparations were applied using a manual sprayer, each separately, and 150 mL 1 m⁻² crop in one application. Foliar application was carried out three times in the early growth stage of wheat (December, March, and May) and evaluations were made on June.

Variables evaluated

Leaf area infection (LAIN) was evaluated for all live leaves on 15 plants (randomly chosen) in two replications as a percentage of leaf area covered by powdery mildew infection per one leaf. Based upon the infection, the cumulative proportion of leaf area diseased (CPLAD) was calculated, which expresses the disease severity for the whole plant (Vechet and Kocourek, 1987; Brière *et al.*, 1994). All variables were evaluated in June (2008, 2009). Induced effectiveness (IE) was calculated in percentage of not-diseased leaf area per one plant. The plants without treatment were used as a control.

Variables were calculated as follows:

$$LAIN = \frac{\sum_j^M \left(\frac{\sum_i^N A_i}{N} \right)_j}{M}, \quad (1)$$

$$CPLAD_{tr} = \frac{\sum_i^N A_{tr_i}}{N}, \quad (2)$$

Los extractos biológicos se prepararon con biomasa (100 g) de: roble (*Quercus robur* L.), knotweed gigante (*Polygonum sachalinense* Friedr. Schmidt), la especia cúrcuma (*Curcuma longa* L.), y el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Corteza de roble seca triturada (QR), hojas secas trituradas de knotweed gigante (PS), cúrcuma (CL), y la especia jengibre (ZO) fueron extraídas 5 h en 850 mL de etanol al 20 % con agitación frecuente. La mezcla se filtró a través de miracloth. Ambas sustancias químicas y extractos biológicos se usaron para el tratamiento del trigo.

Experimento de campo

Los experimentos de campo en parcelas pequeñas se realizaron en el Crop Research Institute (Prague Ruzyně, 50° 5.1676' N, 14° 18.0464' E). El tipo de suelo es luvisol órtico, franco-arcilloso, desarrollado sobre sedimentos coluviales mezclados con loess, la reacción del suelo es neutra (pH KCl 6.8-7.1) en el perfil (Simon, 2005). El cultivo usado fue trigo de invierno Kanzler (*Triticum aestivum* L. cv. Kanzler), el cual se considera un estándar por su susceptibilidad al moho polvoriento. El trigo se cultivó de manera estándar y la infección por moho polvoriento fue natural.

Una parcela pequeña con hileras de 1 m de longitud se usó para un tipo de tratamientos (en dos repeticiones). Las hileras se aislaron en ambos lados con cinco hileras de plantas del mismo cultivo y no tratadas. Cada una de las primeras filas vecinas fueron tratadas usando un tipo de preparado, mientras que las próximas cinco filas no recibieron tratamiento. Siete preparaciones individuales se aplicaron con un pulverizador manual, cada una por separado, y 150 mL 1 m⁻² de cultivo en una aplicación. La aplicación foliar se realizó tres veces en la etapa temprana de crecimiento del trigo (diciembre, marzo y mayo) y las evaluaciones se hicieron en junio.

Variables evaluadas

La infección del área foliar (LAIN) se evaluó en todas las hojas vivas en 15 plantas (elegidas al azar) en dos repeticiones como un porcentaje del área foliar cubierta por la infección del moho polvoriento por hoja. Con base en la infección, se calculó la proporción acumulativa de área foliar enferma (CPLAD), la cual expresa la gravedad de la enfermedad para la planta entera (Vechet y Kocourek, 1987; Brière *et al.*, 1994). Todas las variables se evaluaron en junio (2008, 2009). La efectividad inducida (EI) se calculó en porcentaje de área foliar no enferma por planta. Las plantas sin tratamiento se usaron como testigo.

Las variables se calcularon así:

$$IE = \sum_j^M \left(100 - \frac{CPLAD_{tr}}{CPLAD_{co}} * 100 \right)_j, \quad (3)$$

where M is number of treatment repetitions, N is number of leaves, A is leaf area disease, tr is treatment, and co is control.

The experiment was conducted in the 2008 and 2009 crop year.

Statistical analysis

STATISTICA program was used for all statistical analysis. Data were compared by one-way ANOVA followed by Tukey HSD multiple range comparison test ($p \leq 0.05$). The dependent variables LAIN, CPLAD, and IE were log-transformed ($y = \log x$) in order to obtain the normal distribution before statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Disease severity was high in the control in 2009 and low in 2008, but plant resistance after various treatments produced analogous results in mean infection (Table 1). Significant differences ($p \leq 0.05$) were found in CPLAD between inducers of BTH and RS in 2008, and between BTH, RS, and CU in 2009, as compared to control samples; these inducers caused a high reduction of LAIN and CPLAD (Table 1).

IE varied between 30 % and 72 % in 2008 and between 25 % and 65 % in 2009. IE of most inducers significantly differed from control samples in both years (Table 1). The best IE was found for RS (72.39 %) and BTH (70.51 %) in 2008, and for BTH (64.87 %) in 2009 ($p \leq 0.05$). GB (29.59 %) in 2008 and for SA (24.62 %) showed the smallest IE ($p \leq 0.05$).

Little is known about disease resistance inducers in wheat (Vechet *et al.*, 2009; Randoux *et al.*, 2010). In our experiments with resistance inducers under field conditions carried out on the Kanzler cultivar, the standard for susceptibility to this disease, a partial difference was observed in 2008 and 2009, which was probably influenced by weather conditions. These results are similar to those obtained with compounds of natural origin by Vechet *et al.* (2005). The higher disease severity registered in the control indicates that in wheat treated with resistance inducers, a protective reactions against powdery mildew was activated.

$$LAIN = \frac{\sum_j^M \left(\frac{\sum_i^N A_i}{N} \right)_j}{M}, \quad (1)$$

$$CPLAD_{tr} = \frac{\sum_i^N A_{tr_i}}{N}, \quad (2)$$

$$IE = \sum_j^M \left(100 - \frac{CPLAD_{tr}}{CPLAD_{co}} * 100 \right)_j, \quad (3)$$

donde M es número de repeticiones de tratamiento, N es número de hojas, A es enfermedad del área foliar, tr es tratamiento, y co es testigo.

El experimento se realizó en el año agrícola de 2008 y 2009.

Análisis estadístico

El programa STATISTICA se usó para todos los análisis estadísticos. Los datos se compararon con un ANDEVA de una vía seguida por la prueba HSD de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables dependientes LAIN, CPLAD, y EI se transformaron logarítmicamente ($y = \log x$) con el fin de obtener la distribución normal antes del análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La severidad de la enfermedad fue alta en el testigo en 2009 y baja en 2008, pero la resistencia de la planta después de varios tratamientos produjo resultados análogos en la infección media (Cuadro 1). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en CPLAD entre inductores de BTH y RS en 2008, y entre BTH, RS, y CU en 2009, en comparación con las muestras testigo; estos inductores causaron una reducción alta de LAIN y CPLAD (Cuadro 1).

La EI varió entre 30 % y 72 % en 2008 y entre 25 % y 65 % en 2009. La EI de la mayoría de los inductores difería significativamente de las muestras testigo en ambos años (Cuadro 1). La mejor EI fue para RS (72.39 %) y BTH (70.51 %) en 2008, y para BTH (64.87 %) en 2009 ($p \leq 0.05$). GB (29.59 %) en 2008 y para SA (24.62 %) mostraron la EI más baja ($p \leq 0.05$).

Poco se sabe sobre los inductores de resistencia a enfermedades en trigo (Vechet *et al.*, 2009; Randoux *et al.*, 2010). En nuestros experimentos con inductores de resistencia bajo condiciones de campo

Table 1. Effect of chemical substances and plant extracts on powdery mildew infection of the susceptible wheat Kanzler cultivar. Cuadro 1. Efecto de las sustancias químicas y extractos de plantas en la infección por moho polvoriento del cultivar Kanzler de trigo susceptible.

Season	Treatment	Leaf area infection			Cumulative proportion of leaf area disease			Induced effectiveness (%)		
		Mean (n=30)	SD	HSD	Mean (n=30)	SD	HSD	Mean (n=30)	SD	HSD
2008	CO	3.32	0.00	a	13.28	0.00	a	0.00	0.00	a
	BTH	0.98	0.58	b	3.92	2.31	b	70.51	17.43	bc
	SA	1.63	0.46	ab	6.02	2.15	ab	50.80	13.73	bc
	GB	2.34	0.36	ab	9.35	1.43	ab	29.59	10.74	ac
	QR	1.56	0.12	ab	6.23	0.49	ab	53.06	3.66	bc
	PS	0.92	0.32	b	3.67	1.29	b	72.39	9.72	b
	CL	1.86	0.62	ab	7.45	2.46	ab	43.90	18.54	bc
	ZO	1.59	0.91	ab	6.37	3.65	ab	52.06	27.50	bc
2009	CO	5.79	0.00	a	23.15	0.00	a	0.00	0.00	a
	BTH	2.03	0.55	b	8.13	2.21	b	64.87	9.56	c
	SA	4.36	1.83	ab	17.45	7.34	ab	24.62	31.69	ab
	GB	3.18	1.05	ab	12.70	4.21	ab	45.13	18.20	bc
	QR	3.23	0.17	ab	12.92	0.69	ab	44.20	2.98	bc
	PS	2.86	0.35	b	11.42	1.41	b	50.67	6.08	bc
	CL	2.75	0.57	b	10.98	2.28	b	52.56	9.89	bc
	ZO	3.57	0.28	ab	14.27	1.11	ab	38.37	4.80	abc

Preparation: BTH - benzothiadiazol, SA - salicylic acid, GB - glycine betaine, QR - oak, PS - giant knotweed, CL - curcuma, ZO - ginger, CO - control without treatment. Values correspond to the original data, SD - standard deviation. Different letters in the HSD column represent significant difference among individual treatments and control samples (Tukey HSD test, $p \leq 0.05$). ♦ Preparación: BTH - benzotiadiazol, SA - ácido salicílico, GB - glicina betaína, QR - roble, PS - knotweed gigante, CL - cúrcuma, ZO - jengibre, CO - control sin tratamiento. Los valores corresponden a los datos originales, SD - desviación estándar. Letras diferentes en la columna HSD representan diferencia significativa entre los tratamientos individuales y muestras de control (prueba HSD de Tukey, $p \leq 0.05$).

The efficiency of biological origin extracts is similar to those of chemical origin (Vechet *et al.*, 2009). Benzothiadiazole and the extract from giant knotweed were very effective in reducing powdery mildew in both years (Table 1). Benzothiadiazole triggers plant defence responses without any direct antifungal activity (Kunz *et al.*, 1997); besides, it is an inducer of SAR and activates gene expression and disease resistance in wheat (Görlach *et al.*, 1996). According to Qiu *et al.* (2004), SAR is an inducible defence response shown by a large range of plant species; for example, in papaya SAR was induced by exogenous application of silicic acid or related molecules like benzothiadiazole.

Milsana[®] (made with plant extract of giant knotweed), which induces resistance to powdery mildew on cucumbers, reduced powdery mildew infection by 85 % on wheat (Randoux *et al.*, 2006). There is a potential usage of this product in agriculture. The efficacy of Milsana[®] against

llevados a cabo en el cultivo Kanzler, en el estándar para la susceptibilidad a esta enfermedad, se observó una diferencia parcial en 2008 y 2009, lo que fue probablemente influenciado por las condiciones meteorológicas. Estos resultados son similares a los obtenidos con compuestos de origen natural por Vechet *et al.* (2005). La gravedad mayor de la enfermedad registrada en el testigo indica que en trigos tratados con inductores de resistencia, se activan unas reacciones de protección contra el moho polvoriento.

La eficacia de los extractos de origen biológico es similar a la de origen químico (Vechet *et al.*, 2009). El benzotiadiazol y el extracto de knotweed gigante fueron muy eficaces en la reducción del moho polvoriento en ambos años (Cuadro 1). El benzotiadiazol desencadena las respuestas de defensa de la planta sin ninguna actividad antifúngica directa (Kunz *et al.*, 1997); además, es un inductor de RSA y activa la expresión génica y la resistencia a enfermedades en trigo (Görlach *et al.*, 1996). De acuerdo con Qiu *et al.*

Leveillula taurica (Lev.) Arn. was tested on tomatoes and in four out of five trials the disease was reduced between 42 % and 65 % (Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2006) and only in one its efficacy was low (23 %). In contrast to fungicide preparations, Milsana® was equally effective as wettable sulphur, thus indicating that its effect was preventive rather than curative. Giant knotweed contains many secondary metabolites (phenolic substances) with biological activities (Pavela *et al.*, 2008; Vrchotová and Šerá, 2008). These compounds reduced powdery mildew in wheat in our study (Table 1).

Plants can be induced to develop enhanced resistance to pathogen infection by treatment with a variety of abiotic and biotic inducers. Resistance induced by these agents (resistance elicitors) is broad-spectral and long-lasting, but it rarely provides a complete control of infection. Many resistance elicitors provide between 20 % and 85 % disease control (Walters *et al.*, 2005). Our experiments showed that the effectiveness of individual inducers, compared to an untreated control, ranged between 30 % for glycine betaine and 72 % for extracts from giant knotweed in 2008, whereas in 2009 the effectiveness varied from 25 % for salicylic acid to 65 % for benzothiadiazole (Table 1).

Effectiveness of the tested plant species and chemicals in field conditions was long-lasting, as the evaluation for disease severity after the first treatment was more than four months; besides, treatments were effective under natural conditions. The experiments showed the resistance inducer's effectiveness through the entire growing season, but the effectiveness of individual resistance inducers varied within individual treatment periods. Induced resistance is a plant's response to an attempted infection; therefore, expression of this response will be affected by several factors, including genotype and environment (Walters *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS

The seven preparations were tested as protection against powdery mildew (*B. graminis* f.sp. *tritici*) attack on winter wheat (*T. aestivum* L. cv. Kanzler). Benzothiadiazole and two plant extracts: giant knotweed (*P. sachalinense*) and turmeric spice (curcuma, *C. longa*), showed the best results.

(2004), la RSA es una respuesta de defensa inducible mostrada por una amplia gama de especies vegetales; por ejemplo, en la papaya la RSA fue inducida por la aplicación exógena de ácido silícico o moléculas relacionadas como el benzotiadiazol.

Milsana® (hecho con extracto de la planta knotweed gigante), que induce resistencia al moho polvoriento en pepinos, redujo la infección por moho polvoriento en 85 % en el trigo (Randoux *et al.*, 2006). Hay un uso potencial de este producto en la agricultura. La eficacia de Milsana® contra *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. se probó en tomates y en cuatro de los cinco experimentos la enfermedad se redujo entre 42 % y 65 % (Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2006) y sólo en uno su eficacia fue baja (23 %). En contraste con las preparaciones de fungicidas, Milsana® fue igualmente efectivo que el azufre humedecible, lo cual indica que su efecto era más preventivo que curativo. El knotweed gigante contiene muchos metabolitos secundarios (sustancias fenólicas) con actividades biológicas (Pavela *et al.*, 2008; Vrchotová y Sera, 2008). Estos compuestos redujeron el moho polvoriento del trigo en nuestro estudio (Cuadro 1).

Las plantas pueden ser inducidas a desarrollar una resistencia mayor a la infección por patógenos mediante tratamiento con una variedad de inductores abióticos y bióticos. La resistencia inducida por estos agentes (inductores de resistencia) es de amplio espectro y de larga duración, pero rara vez proporcionan un control completo de la infección. Muchos inductores de resistencia proporcionan 20 % a 85 % de control de la enfermedad (Walters *et al.*, 2005). Nuestros experimentos mostraron que la efectividad de los inductores individuales, en comparación con un testigo sin tratar, oscilaron entre 30 % para la glicina betaína y 72 % para el extracto de knotweed gigante en 2008, mientras que en 2009 la efectividad varió de 25 % para el ácido salicílico a 65 % para el benzotiadiazol (Cuadro 1).

La efectividad de las especies vegetales y productos químicos probados en condiciones de campo fue de larga duración, como la evaluación de la severidad de la enfermedad después del primer tratamiento que duró más de cuatro meses; además, los tratamientos fueron efectivos en condiciones naturales. Los experimentos mostraron la efectividad de los inductores de resistencia través de toda la temporada de crecimiento, pero la efectividad de los inductores de

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project no. VZ VURV 0002700602) and by Department of Biology (Faculty of Education, University of South Bohemia in Ceske Budejovice). The authors would like to thank both reviewers for their comments, which helped to improve the manuscript.

LITERATURE CITED

- Asadi, A., K. Kalantari, and S. Choobchian. 2013. Structural analysis of factors affecting agricultural sustainability in Qazvin province, Iran. *J. Agric. Sci. Technol.* 15: 11-22.
- Ashraf, M., and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exper. Bot.* 59: 206-216.
- Brière, S. C., A. C. Kushalappa, and D. E. Mather. 1994. Screening for partial resistance to an isolate of crown rust (*Puccinia recondita* f.sp. *avenae*) race 264 in oat cultivars and breeding lines. *Can. J. Plant Path.* 16: 49-55.
- Chainani-Wu, N. 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). *J. Alternative Compl. Med.* 9: 161-168.
- Deepak, S. A., S. N. Raj, K. Umemura, T. Kono, and H. S. Shetty. 2003. Cerebroside as an elicitor for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet. *Ann. Appl. Biol.* 143: 169-173.
- Dostálek, P., and R. Hradil. 1998. Biologicko-dynamický preparát. PRO-BIO, Šumperk, 72 p.
- Durrant, W. E., and X. Dong. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185-209.
- Görlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, G. Hengy, U. Beckhove, K. H. Kogel, M. Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmenn, and J. Ryals. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- Khademi, O., Z. Zamani, Y. Mostofi, S. Kalantari, and A. Ahmadi. 2012. Extending storability of persimmon fruit cv. Karaj by postharvest application of salicylic acid. *J. Agric. Sci. Technol.* 14: 1067-1074.
- Kloepper, J. W., S. Tuzun, and J. A. Kuc. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 349-351.
- Konstantinidou-Doltsinis, S., E. Markellou, A. M. Kassalaki, N. Fanouraki, C. M. Koumaki, A. Schmit, A. Liopa-Tsakalidis, and N. E. Malathrakakis. 2006. Efficacy of Milsana®, a formulated plant extract from *Reynoutria sachaliensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). *Biol. Control* 51: 375-392.
- Kunz, W., R. Schurter, and T. Maerzke. 1997. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *J. Pest Sci.* 50: 275-282.
- Labussiere E., M. Barzman, and P. Ricci. 2010. European Crop Protection in 2030. A foresight study. INRA. www.endure-network.eu (Access: August, 2013).
- Morris, S. W., B. Vernooij, S. Titatarn, M. Starrett, S. Thomas, C. C. Wiltse, R. A. Frederiksen, A., Bhandhufalck, S.

resistencia individuales varió dentro de los períodos de tratamiento individuales. La resistencia inducida es la respuesta de una planta a un intento de infección; por lo tanto, la expresión de esta respuesta será afectada por varios factores, incluyendo genotipo y medio ambiente (Walters *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Las siete preparaciones fueron probadas como protección contra el ataque del moho polvoriento (*B. graminis* f. sp. *tritici*) sobre el trigo de invierno (*T. aestivum* L. cv. Kanzler). El benzotiadiazol y dos extractos vegetales: knotweed gigante (*P. sachalinense*) y la especia cúrcuma (*C. longa*), mostraron los mejores resultados.

—Fin de la versión en Español—



- Hulbert, and S. Unkes. 1998. Induced resistance responses in maize. *Mol. Plant Micr. Inter.* 11: 643-658.
- Mur, L. A. J., G. Naylor, S. A. J. Warner, J. M. Sugars, R. F. White, and J. Draper. 1996. Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* 9: 559-571.
- Pavela, R., N. Vrchotová, and B. Šerá. 2008. Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. *Agrociencia* 42: 573-584.
- Qiu, X. H., P. Z. Guan, M. L. Wang, P. H. Moore, Y. J. Zhu, J. Hu, W. Borth, and H. H. Albert. 2004. Identification and expression analysis of BTH induced genes in papaya. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 21-30.
- Randoux, B., D. Renard, E. Nowak, J. Sanssene, J. Courtois, R. Durand, and P. Reignault. 2006. Inhibition of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* germination and partial enhancement of wheat defenses by Milsana. *Phytopathology* 96: 1278-1286.
- Randoux, B., D. Renard-Merlier, G. Mulard, S. Rossard, F. Duyme, J. Sanssené, J. Courtios, R. Durand, and P. Reignault. 2010. Distinct defences induced in wheat against powdery mildew by acetylated and nonacetylated oligogalacturonides. *Phytopathology* 100: 1352-1363.
- Sakamura, F., K. Ogihara, T. Suga, K. Taniguchi, and R. Tanaka. 1986. Volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes produced by *in vitro* shoot tip culture. *Phytochemistry* 25: 1333-1335.
- Simon T. 2005. Aliphatic compounds, organic C and N and microbial biomass and its activity in long-term field experiment. *Plant Soil Environ.* 51: 276-282.
- Stadnik, M. J., and H. Buchenauer. 1999a. Control of wheat diseases by benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. *Zeitsch. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 106: 466-475.
- Stadnik, M. J., and H. Buchenauer. 1999b. Effects of benzothiadiazole, kinetin and urea on the severity of powdery

- mildew and yield of winter wheat. Zeitsch. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz 106: 47-69.
- Stenglein, S. A., M. I. Dinolfo, F. Bongiorno, and M. V. Moreno. 2012. Response of wheat (*Triticum* spp.) and barley (*Hordeo vulgare*) to fusarium poae. Agrociencia 46: 299-306.
- Vechet, L., L. Burketova, and M. Sindelarova. 2009. A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) in wheat under field conditions. Crop Protect. 28: 151-154.
- Vechet, L., and F. Kocourek. 1987. The Effect of the time of treatment on the occurrence of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and on the damage it causes to spring barley. Ochr. Rostl. 23: 117-124.
- Vechet, L., J. Martinkova, M. Sindelarova, and L. Burketova. 2005. Compounds of natural origin inducing winter wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Plant Soil Environ. 51: 469-475.
- Vrchotová, N., and B. Šerá. 2008. Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. Plant Soil Environ. 54: 301-303.
- Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. J. Plant Growth Regul. 19: 195-216.
- Walters, D., D. Walsh, A. Newton, and G. Lyon. 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. Phytopathology 95: 1368-1373.
- Wurms, K., C. Labbé, N. Benhamou, and R. Bélanger. 1999. Effects of Milsana and benzithiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria in cucumber. Phytopathology 89: 728-736.