

Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*)

Quitosano y extractos de *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Alternaria alternata* en jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Víctor Manuel Rodríguez-Romero*, Ramón Villanueva-Arce, Ariadna Berenice Trejo-Raya, Laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI). Instituto Politécnico Nacional (IPN). Avenida Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México, CP 07340, México; Silvia Bautista-Baños, Departamento de Tecnología Postcosecha, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi). IPN. Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla, San Isidro, Yautepec CP 62731, Morelos, México.
*Autor de correspondencia vmrodriguezr@ipn.mx.

Recibido: 19 de Diciembre, 2018.

Aceptado: 10 de Febrero, 2019.

Rodríguez-Romero VM, Villanueva-Arce R, Trejo-Raya AB and Bautista-Baños S. 2019. Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*). Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 202-219.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1812-2

Primera publicación DOI: 25 de Febrero, 2019.

First DOI publication: February 25, 2019.

Resumen. *Alternaria alternata* es un hongo que ocasiona daños en el cultivo de jitomate, se caracteriza por producir manchas negras y marchitez en plantas y frutos; los fungicidas sintéticos son las principales herramientas para controlar este hongo. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de mezclas de quitosano y extractos de *Pseudomonas fluorescens* en el control de *A. alternata* bajo condiciones *in vitro* sobre micelio y conidios, así como la incidencia y severidad en plantas

Abstract. *Alternaria alternata* is a fungus that causes damage to the tomato crop, it is characterized by producing black spots and wilting in plants and fruits; synthetic fungicides are the main tools to control this fungus. The objective of this study was to evaluate the effect of the application of mixtures of chitosan and extracts of *Pseudomonas fluorescens* in the control *in vitro* of *A. alternata* on mycelium and conidia, as well as the incidence and severity in greenhouse tomato plants. The use of the mixture of chitosan 1.5% (w/v) + extract of *P. fluorescens* 50% (v/v) resulted in 60 and 100% of *in vitro* inhibition of mycelial growth and conidia germination of *A. alternata* respectively. In greenhouse, the plants were inoculated with *A. alternata*, later they were sprayed with the mixture of chitosan 1.5% (w/v) + extract of *P. fluorescens* 50% (v/v) every 7 days until flowering. The incidence was 100%, while the severity was 51.8 and 38.9% for 7 days and 16.9 and 16.2% for 60 days, respectively. The mixture used is an option for the control of *A. alternata*.

de jitomate en invernadero. El uso de la mezcla de quitosano 1.5% (p/v) + extracto de *P. fluorescens* 50% (v/v) resultó en 60 y 100% de inhibición *in vitro* de crecimiento micelial y germinación de conidios de *A. alternata* respectivamente. En invernadero, las plantas se inocularon con *A. alternata*, posteriormente se asperjaron con la mezcla de quitosano 1.5% (p/v) + extracto de *P. fluorescens* 50% (v/v) cada 7 días hasta la floración. La incidencia fue del 100 %, mientras que la severidad fue 51.8 y 38.9 para 7 días y 16.9 y 16.2% para 60 días, respectivamente. La mezcla utilizada es una opción para el control de *A. alternata*.

Palabras clave: actividad antifúngica, control biológico, incidencia, severidad.

México es uno de los diez países a nivel mundial con mayor producción de jitomate (*Solanum lycopersicum*), el cultivo en México satisface la demanda interna y se exporta aproximadamente el 46% de la cosecha (FAO, 2016). Diversos microorganismos fitopatógenos pueden ocasionar enfermedades en el cultivo de jitomate, principalmente los hongos (Orberá *et al.*, 2014). Los géneros que ocasionan las mayores pérdidas en pre y poscosecha son *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Rhizopus* (Petriacq, 2018; Trigos *et al.*, 2008). Las afectaciones que provocan son variadas, desde síntomas poco visibles hasta devastaciones completas de áreas de cultivo (Dean *et al.*, 2012; Strange y Scott, 2005). Los daños por *Alternaria* son comunes alrededor del mundo, se caracterizan por la aparición de manchas negras y marchitez, que afectan hojas, tallos, flores y frutos (Agrios, 1997; Logrieco *et al.*, 2009). Los fungicidas de origen sintético son las principales herramientas para el control y manejo de enfermedades en plantas; sin embargo, el uso excesivo genera problemas

Key words: antifungal activity, biological control, incidence, severity.

Mexico is one of the ten countries in the world with the highest production of tomato (*Solanum lycopersicum*). The crop satisfies the internal demand, and approximately 46% of the harvest is exported (FAO, 2016). Diverse phytopathogenic microorganisms may cause diseases in the tomato crop, and particularly fungi (Orberá *et al.*, 2014). The genera which cause the greatest losses in pre- and postharvest are *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum* and *Rhizopus* (Petriacq, 2018; Trigos *et al.*, 2008). Their effects range from hardly visible symptoms to the devastation of complete plantations (Dean *et al.*, 2012; Strange and Scott, 2005). Damages by *Alternaria* are common around the world and characteristically display black spots and wilting that affects leaves, stems, flowers and fruits (Agrios, 1997; Logrieco *et al.*, 2009). Synthetic fungicides are the main tools for the control and management of plant diseases; however, excessive use produces important health and environmental problems, which has led to a demand for the management of agrochemical-free crops and foods by consumers (Sánchez-Bayo and Tennekes, 2015).

An alternative for the reduction of agrochemicals is the use of biopolymers such as chitosan, which is an abundant compound in nature, and can be obtained by the partial deacetylation of chitin (main component of the exoskeleton of arthropods) through a thermal alkaline treatment; it has properties of biodegradability and innocuity, as well as antifungal activities, making it an ideal and easily manageable product (Waewthongrak *et al.*, 2015). Diverse authors report that this biopolymer controls diseases caused by phytopathogenic fungi in papaya (*Carica papaya*), tomato (*Physalis*

importantes en la salud y medio ambiente. Por lo que existe una exigencia de manejo de cultivos y alimentos libres de agroquímicos por parte de los consumidores (Sánchez-Bayo y Tennekes, 2015).

Una alternativa para la reducción de agroquímicos es el uso de biopolímeros como el quitosano, el cual es un compuesto abundante en la naturaleza, que se obtiene por la desacetilación parcial de la quitina (componente principal del exoesqueleto de artrópodos) a través de un tratamiento térmico alcalino, tiene propiedades de biodegradabilidad, inocuidad y actividad antifúngica que lo hacen un producto ideal y de fácil manejo (Waewthongrak *et al.*, 2015). Diversos autores reportan que este biopolímero controla enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de papaya (*Carica papaya*), tomate (*Physalis ixocarpa*), plátano (*Musa × paradisiaca*) y otros (Bautista-Baños *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2007; Maqbool *et al.*, 2010). Además, tiene la capacidad de formar películas o recubrimientos y sirve como matriz para incorporar otros aditivos o componentes que pueden añadir o potenciar alguna propiedad (Zargar *et al.*, 2015).

En este sentido, el quitosano es una opción para mezclarse con otros agentes antifúngicos, tales como metabolitos secundarios, como los presentes en los extractos libres de células de *Pseudomonas fluorescens*. Esta bacteria muestra efectos de control frente a hongos fitopatógenos en los cultivos de col (*Brassica oleracea*), alfalfa (*Medicago sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), haba (*Vicia faba*) y otros (Alemu y Alemu, 2013; Mishra y Arora, 2012; Yanes *et al.*, 2012;), mediante la producción de metabolitos extracelulares, que pueden recuperarse del medio de cultivo y ejercen un efecto antifúngico sin la necesidad de tener la bacteria presente (Pal y McSpadden, 2006) y abordar las limitaciones del uso de biomasa. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antifúngico de la combinación de

ixocarpa), banana (*Musa × paradisiaca*) and other crops (Bautista-Baños *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2007; Maqbool *et al.*, 2010). It also has the ability to produce films or coatings and it serves as a matrix to incorporate other additives or components that can add or strengthen some properties (Zargar *et al.*, 2015).

In this sense, chitosan is an option for mixing with other antifungal agents, such as secondary metabolites like the ones found in the free extracts in *Pseudomonas fluorescens* cells. This bacteria displays control effects over phytopathogenic fungi in plantations of cabbage (*Brassica oleracea*), alfalfa (*Medicago sativa*), wheat (*Triticum aestivum*), broad bean (*Vicia faba*) and others (Alemu and Alemu, 2013; Mishra and Arora, 2012; Yanes *et al.*, 2012;) by producing extracellular metabolites, which can be recovered from the culture medium and have an antifungal effect, without the need of having the bacteria present (Pal and McSpadden, 2006) and tackle the limitations of the use of biomass. The aim of this study was to evaluate the antifungal effect of the combination of chitosan and *P. fluorescens* extracts on the control *in vitro* of mycelia and *A. alternata* conidia, as well as the incidence and severity on tomato plants in greenhouse as an alternative possibility to reduce the use of agrochemicals.

MATERIALS AND METHODS

Biological material. The bacteria *Pseudomonas fluorescens* was isolated from the bacterial rhizosphere of strawberry stolons (*Fragaria sp.*) from the location of Ejido de la Finca, Villa Guerrero, State of Mexico (18° 53' 07" N, 99° 37' 36" W and an altitude of 1839 masl) during the 2012-2013 production cycle. The bacteria was purified and identified at the level of genus,

quitosano y extractos de *P. fluorescens* en el control *in vitro* de micelio y conidios de *A. alternata*; así como, la incidencia y severidad en plantas de jitomate en invernadero, como una posible alternativa para reducir el uso de agroquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. La bacteria *Pseudomonas fluorescens* se aisló de la rizosfera microbiana de estolones de fresa (*Fragaria sp.*) de la localidad del Ejido de la Finca, Villa Guerrero, Estado de México (18° 53' 07" N, 99° 37' 36" O y altitud de 1839 msnm) durante el ciclo productivo 2012-2013. La bacteria se purificó e identificó a nivel género de acuerdo con la metodología propuesta por Schaad (1988). Se realizó la caracterización molecular por amplificación y secuenciación del rARN 16s y alineación con las bases de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

El hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* se aisló de frutos de jitomate con síntomas característicos de la enfermedad, se identificó y caracterizó molecularmente en el Laboratorio de Fisiología Postcosecha del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, se cultivó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA, BD Bioxon, México) durante 4-7 días e incubó a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para los ensayos posteriores.

Para los experimentos en invernadero, se utilizaron plantas de jitomate de la variedad Saladett (Eterno F1) en la etapa vegetativa (de 15 a 25 cm de altura) hasta la floración, obtenidas de siembra directa en pellets de *peatmoss* y cultivadas en macetas de 5 L aproximadamente, en una mezcla de tierra orgánica-*peatmoss-agrolita* en proporción 4:1:1, en invernadero (32 °C, 75% HR, aproximadamente) de febrero a junio de 2017.

following the methodology proposed by Schaad (1988). The molecular characterization was carried out by amplifying and sequencing the rRNA 16s and aligning with the bases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* was isolated from tomato fruits with typical symptoms of the disease, then identified and characterized molecularly in the Postharvest Physiology Lab in the Center for the Development of Biotic Products of the National Polytechnic Institute; it was then cultivated a Potato Dextrose Agar medium (PDA, BD Bioxon, Mexico) for 4-7 days and incubated at room temperature (25 ± 2 °C) for later trials.

Experiments performed in greenhouse were carried out using tomato plants of the Saladett (Eterno F1) variety in stages between vegetative (15 to 25 cm in height) to a flowering states, obtained from direct seeding in *peatmoss* pellets and grown in pots with an approximate capacity of 5 L, in a mixture of organic soil-*peatmoss-agrolite* in a proportion of 4:1:1, in greenhouse (32 °C, 75% RH, approximately) between February and June, 2017.

Preparation of chitosan and *P. fluorescens* extracts. The chitosan solution (Qs) (Sigma Aldrich, USA) was prepared at 3% (w/v) and obtained by dissolving 3.0 g of chitosan of low molecular weight (50-190 kDa, 85% deacetylation) in 100 mL of distilled water, it was adding slowly glacial acetic acid (Fermont, Mexico) at 1% (v/v). The solution was stirred and warmed to 40 °C for 24 h, the pH was adjusted at 5.6 with sodium hydroxide 1 N and sterilized for 15 min at 15 psi. The *P. fluorescens* (EPf) extract was obtained by cultivating bacteria in a King's B medium (25 ± 2 °C, 72 h, 120 rpm), centrifuged for 15 min at 10015 xg, and the supernatant was filtered with 0.22 µm sterile membranes (Cole Palmer, USA) to retain the remaining cell biomass.

Preparación de quitosano y extractos de *P. fluorescens*. La solución de quitosano (Qs) (Sigma Aldrich, EUA) se preparó al 3% (p/v) y se obtuvo al disolver 3.0 g de quitosano de bajo peso molecular (50-190 kDa, 85% desacetilación) en 100 mL de agua destilada, se añadió lentamente ácido acético glacial (Fermont, México) al 1% (v/v). La solución se agitó y calentó a 40 °C durante 24 h, el pH se ajustó a 5.6 con hidróxido de sodio 1 N y se esterilizó por 15 min a 15 psi. El extracto de *P. fluorescens* (EPf) se obtuvo al cultivar la bacteria en medio B de King (25 ± 2 °C, 72 h, 120 rpm), se centrifugó 15 min a 10015 xg, el sobrenadante se filtró con membranas estériles (Cole Palmer, EUA) de 0.22 µm para retener la biomasa celular remanente.

Pruebas de control *in vitro* de *A. alternata*: crecimiento micelial y germinación de conidios. Para las pruebas de inhibición del crecimiento micelial se realizó un diseño de tratamientos en arreglo factorial, los factores y niveles fueron Qs [0, 0.5, 1.0, y 1.5% (p/v)] y EPf [0, 15, 30 y 50% (v/v)] con seis repeticiones por tratamiento. Se incluyó Captan (0.25% p/v) como control positivo. El pH de todos los tratamientos se ajustó a 5.6. La unidad experimental fue una caja Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo PDA, se depositó y distribuyó de manera uniforme sobre la superficie del medio 0.5 mL de cada uno de los tratamientos y se dejó secar de 5 a 10 min. Después se colocaron en el centro de la caja discos (5 mm de diámetro) de PDA con micelio del hongo e incubaron a temperatura ambiente. El tiempo límite de incubación se determinó cuando el crecimiento micelial del control negativo (Qs 0% + Epf 0%) alcanzó el borde de la caja. Para cada unidad experimental se midió y promedió el diámetro de la colonia en dos direcciones. El porcentaje de inhibición micelial se calculó según Korsten y Jager (1995) con la fórmula: Inhibición (%) = [(DC - DT) / DC] x 100; donde DC es el

Control tests *in vitro* of *A. alternata*: mycelial growth and conidia germination. For the inhibition trials, was carried out in a treatments design in a factorial arrangement, the factors and levels were Qs [0, 0.5, 1.0, and 1.5% (w/v)] and EPf [0, 15, 30 and 50% (w/v)] with six repetitions per treatment it was included Captan (0.25% w/v) as a positive control. The pH of all treatments was adjusted to 5.6. The experimental unit was a Petri dish (90 x 15 mm) with PDA culture medium; 0.5 mL of each of the treatments was evenly placed and distributed on the surface of the medium, and left to dry for 5 to 10 min. PDA discs (5 mm in diameter) with fungal mycelia were then placed in the center of the dishes and incubated at room temperature. The time limit for incubation was determined when the mycelial growth of the negative control (Qs 0% + Epf 0%) reached the edge of the dish. For each experimental unit was measured and averaged the diameter of culture in two directions. The percentage of mycelial inhibition was calculated following Korsten and Jager (1995) using the formula: Inhibition (%) = [(DC - DT) / DC] x 100, where DC is the diameter of the control culture, and DT is the diameter culture of the treatment.

For the conidia germination trials, it was used the mixture that displayed the most statistically significant mycelial inhibition *in vitro* (%) * = p ≤ 0.05. Distilled water was included as a negative control, and Captan (0.25% w/v) as a positive control, with 6 repetitions for each treatment. It was placed 0.5 mL of each treatment on the surface of the Petri dishes with PDA, spread it out evenly, left it to dry for 5 to 10 min, inoculated using a conidial suspension (0.1 mL) (10⁶ mL⁻¹) and incubated at 25 ± 2 °C for 4 days, and the percentage of conidia germination was determined.

***A. alternata* control tests in tomato plants in greenhouse conditions.** For the trial in a greenhouse, it was used the mixture that presented

diámetro del cultivo control, y DT el diámetro del cultivo del tratamiento.

Para la prueba de germinación de conidios se utilizó la mezcla que presentó la mayor inhibición micelial *in vitro* (%) estadísticamente significativa $*=p \leq 0.05$. Se incluyeron agua destilada como control negativo y Captan (0.25% p/v) como control positivo, con 6 repeticiones para cada tratamiento. Se depositó 0.5 mL de cada tratamiento sobre la superficie de las cajas Petri con PDA, se distribuyó de manera uniforme, se dejó secar de 5 a 10 min, se inoculó con una suspensión (0.1 mL) de conidios (10^6 mL⁻¹) e incubó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 días y se determinó el porcentaje de germinación de conidios.

Pruebas de control de *A. alternata* en plantas de jitomate en invernadero. Para la prueba en invernadero se utilizó la mezcla que presentó la mayor inhibición micelial *in vitro* (%) estadísticamente significativa $*=p \leq 0.05$. Se incluyeron agua destilada como control negativo y Captan (0.25 % p/v) como control positivo, con 15 repeticiones para cada tratamiento. Las plantas se colocaron en cámaras húmedas 24 h antes de la inoculación por aspersión con una suspensión de conidios (10^6 mL⁻¹). Las plantas inoculadas se incubaron 72 h en cámaras húmedas, después se asperjaron los tratamientos y se llevaron a invernadero (32°C , 75% HR, aproximadamente). Después de la primera aplicación, los tratamientos se asperjaron cada 7 días hasta la floración y se evaluó la incidencia como la fracción de unidades experimentales por tratamiento con síntomas (tizón de hojas, clorosis, defoliación o marchitez) y la severidad de la enfermedad como la fracción de hojas dañadas respecto al total de hojas de cada unidad experimental por cada tratamiento (Terna *et al.*, 2016). Las evaluaciones se realizaron 7, 30 y 60 días después de la inoculación (DDI).

the most *the most in vitro* mycelial inhibition (%) statistically significant. Distilled water was included as a negative control and Captan (0.25% w/v) as a positive control, with 15 repetitions per treatment. The plants were placed in wet chambers for 24 h before inoculation by spraying a suspension of conidia (10^6 mL⁻¹). Inoculated plants were incubated for 72 h in wet chambers, and the treatments were later sprayed and taken to a greenhouse (32°C , 75% HR, approximately). After the first application, the treatments were sprayed every 7 days until flowering. Incidence was evaluated as the fraction of experimental units per treatments with symptoms (leaf smut, chlorosis, defoliation or wilting) and the severity of the disease as the fraction of leaves damaged in regard to the total of leaves of each experimental unit per treatment (Terna *et al.*, 2016). Evaluations were carried out 7, 30 and 60 days after inoculation (DAI).

Data analysis. For the treatments *in vitro* and in greenhouse, a completely random design was used, and they were analyzed using an ANOVA; the treatments were compared using Tukey's Test ($*=p \leq 0.05$). Before the analysis, the severity data as percentages were transformed with a logarithm [$\log(x + 1)$]. The analyses were carried out using SAS® 9.4.

RESULTS AND DISCUSSION

Biological material. The *P. fluorescens* bacteria isolated in strawberry stolons was Gram negative; in the specific yeast-dextrose-calcium carbonate (YDC) growth medium, the colonies displayed a creamy-white color after 48 h in incubation; in King B agar (KB), after 48 h of incubation, the colonies produced a yellow pigment that surrounded the

Análisis de datos. Para los tratamientos *in vitro* y en invernadero se utilizó un diseño completamente al azar y se analizaron por medio de un ANDEVA, los tratamientos se compararon con la prueba Tukey ($*=p \leq 0.05$). Antes del análisis, los datos de severidad en porcentaje se transformaron con logaritmo [$\log(x + 1)$]. Estos análisis se realizaron con SAS® 9.4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material biológico. La bacteria *P. fluorescens* aislada en estolones de fresa fue Gram negativa, en el medio de crecimiento específico levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) las colonias mostraron coloración crema-blanco después de 48 h de incubación; en agar B de King (KB), después de 48 h de incubación, las colonias produjeron un pigmento amarillo que rodeó la colonia y que bajo condiciones de luz ultravioleta fue verde-amarillo fluorescente (Figura 1). Las colonias blancas en YDC pueden corresponder a los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia* o *Agrobacterium*, mientras que la

colony, which was fluorescent greenish-yellow under UV light (Figure 1). The white colonies in YDC may belong to the genera *Pseudomonas*, *Erwinia* or *Agrobacterium*, while pigmentation and fluorescence in King's B agar are typical of *P. fluorescens* (Schaad, 1988).

The result of the culture characterization was corroborated using molecular characterization (Table 1) with the analysis of the gene 16s and the alignment of the sequence of base pairs (bp) with those from the NCBI Gene Bank. The DNA had a molecular weight of 425 bp; the sequence was aligned in first, second and third places, respectively with *Pseudomonas lutea* (Access number NZ_JRMB01000004.1, NZ_JRMB01000003.1 and NZ_JRMB01000002.1, Kwak *et al.*, 2016), with a similarity index of 99% and 467 bp for all sequences; the difference was two nucleotides (NZ_JRMB01000004.1) and three nucleotides (NZ_JRMB01000003.1, NZ_JRMB01000002.1) and maximum scores of 774, 769 and 769, respectively, out of a total score of 774. In seventh place, it aligned with *P. fluorescens* (access number NR113647, Redondo *et al.*, 2012) with a value

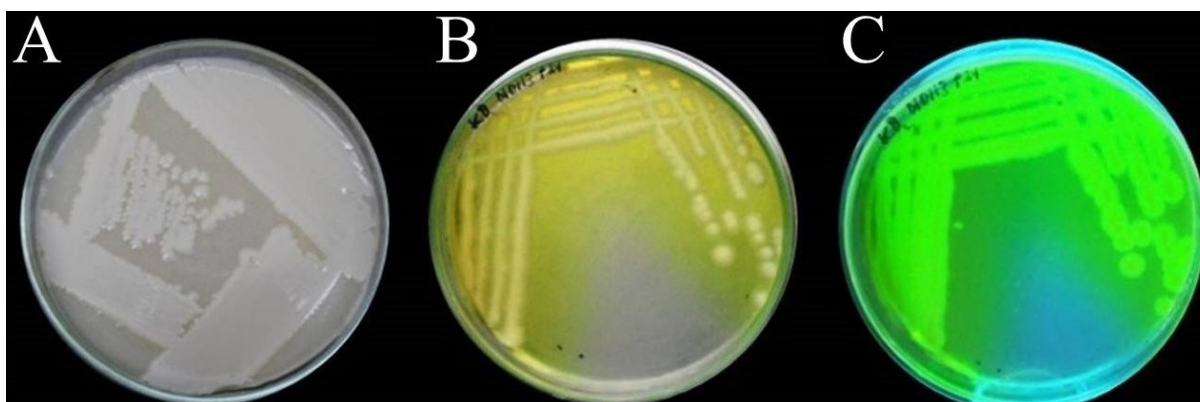


Figura 1. Características culturales de *P. fluorescens*. Colonias en medio YDC (A), pigmento amarillo en agar King B (B), y fluorescencia bajo luz UV (C).

Figure 1. Cultural characteristics of *P. fluorescens*. Colonies in YDC medium YDC (A), yellow pigment in King's B agar (B), and fluorescence under UV light (C).

pigmentación y fluorescencia en agar B de King es característico de *P. fluorescens* (Schaad, 1988).

El resultado de la caracterización cultural se corroboró con la caracterización molecular (Cuadro 1) mediante el análisis del gen 16s y el alineamiento de la secuencia de los pares de bases (pb) con las del Banco de Genes del NCBI. El ADN tuvo un peso molecular de 425 pb, la secuencia se alineó en primer, segundo y tercer lugar respectivamente con *Pseudomonas lutea* (Número de acceso NZ_JRMB01000004.1, NZ_JRMB01000003.1 y NZ_JRMB01000002.1, Kwak *et al.*, 2016), con un índice de similaridad del 99% y 467 pb para todas las secuencias, la diferencia fue de dos nucleótidos (NZ_JRMB01000004.1) y tres nucleótidos (NZ_JRMB01000003.1, NZ_JRMB01000002.1) y puntuaciones máximas de 774, 769 y 769 respectivamente de una puntuación total de 774. En séptimo lugar se alineó con *P. fluorescens* (Número de acceso NR113647, Redondo *et al.*, 2012) con un valor de 763 y un índice de 99 %, con una diferencia de cuatro nucleótidos, ambas secuencias con 425 pb. Las diferencias entre nucleótidos de *P. fluorescens* y la secuencia de estudio se encuentran distribuidas de manera aleatoria a lo largo de toda la secuencia, a diferencia de *P. lutea*, donde las diferencias se localizan en los mismos codones para las tres secuencias; la diferencia de los nucleótidos y pares de bases entre la secuencia de estudio y *P. lutea* indica diferencias moleculares que caracterizan a cada especie, mientras que las diferencias

of 763 and an index of 99 %, with a difference of four nucleotides, both sequences with 425 pb. The differences between *P. fluorescens* nucleotides and the sequence under study are distributed at random throughout the sequence, unlike *P. lutea*, where the differences are found in the same codons for the three sequences; the difference of the nucleotides and the base pairs between the sequence under study and *P. lutea* indicates molecular differences that distinguish such species, whereas the differences between *P. fluorescens* and the sequence under study may be due to polymorphisms by substitution of base pairs, attributable to a possible mutation; based on the high molecular homology and culture characterization, the biocontrol agent was concluded to be *P. fluorescens*.

***In vitro* A. alternata control tests: mycelial growth and conidia germination.** The radial growth in the negative control *A. alternata* in PDA medium covered 100% of the Petri dish after 26 days of incubation. All treatments had a reduction mycelial growth statistically significant ($*=p\leq 0.05$) in regard to the negative control, as well as an inhibiting effect (Table 2, Figure 2).

In the treatments containing only Qs, the mycelial growth of *A. alternata* was inhibited between 9 and 33%, although in other studies the inhibiting effect was observed with concentrations starting at 0.5% of chitosan and higher than those reported in the present paper, with an inhibition of 54.6%

Cuadro 1. Secuencia de pares de bases de *P. fluorescens* aislada en Villa Guerrero, Estado de México
Table 1. Sequence of base pairs of *P. fluorescens* isolated in Villa Guerrero, State of Mexico.

CCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT-GCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTGTACCGACCATTGTA-GCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGG-CAGTCTCCTTAGAGTGTCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCA-CATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTG-GAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTC

entre *P. fluorescens* y la secuencia de estudio puede deberse a polimorfismos por sustitución de pares de bases, atribuibles a una posible mutación; con base a la alta homología molecular y la caracterización cultural, se concluye que el agente de biocontrol fue *P. fluorescens*.

Pruebas de control *in vitro* de *A. alternata*: crecimiento micelial y germinación de conidios. El crecimiento radial en el control negativo de *A. alternata* en medio PDA cubrió el 100% de la caja de Petri después de 26 días de incubación. Todos los tratamientos tuvieron una reducción en el crecimiento micelial estadísticamente significativo ($*=p\leq 0.05$) con respecto al control negativo, así como un efecto inhibitorio (Cuadro 2, Figura 2).

En los tratamientos que contenían únicamente Qs, el crecimiento micelial de *A. alternata* se inhi-

for *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (Prapagdee *et al.*, 2007) and 100% for *Botrytis cinerea* (Liu *et al.*, 2007) and *Alternata chikunkiana* (Meng *et al.*, 2008).

On the other hand, the individual antifungal effect of the EPfs were higher than for Qs in all cases, with a maximum inhibition of 47%; in comparison with other cell extracts, the extracts of *Streptomyces griseus* reduced the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Zacky and Ting, 2013) by 33% and *Bacillus subtilis* extracts inhibited the *in vitro* mycelial development of *Penicillium digitatum* by 94% (Waewthongrak *et al.*, 2015).

The mixtures of Qs and EPfs had a higher inhibition in comparison with the individual effects in all cases; the mixture with the highest concentration of both components (Qs 1.5% +

Cuadro 2. Crecimiento micelial e inhibición (%) *in vitro* de las mezclas de quitosano y extractos de *P. fluorescens* sobre *A. alternata*.

Table 2. *In vitro* mycelial growth and inhibition (%) of the mixtures of chitosan and extracts of *P. fluorescens* on *A. alternata*.

Tratamiento (Qs % + EPf %)	Crecimiento de <i>A. alternata</i> (mm)	Inhibición (%) de <i>A. alternata</i>
Captan (0.25 % p/v) ^x	24.8 ^h	70.8 ^h
Qs 0.0 + EPf 0.0 ^y	85.0 ^a	0.0 ^a
Qs 0.5 + EPf 0.0	77.2 ^b	9.2 ^b
Qs 1.0 + EPf 0.0	75.6 ^b	11.0 ^b
Qs 1.5 + EPf 0.0	56.8 ^c	33.2 ^c
Qs 0.0 + EPf 15	55.1 ^c	35.2 ^c
Qs 0.0 + EPf 30	46.3 ^d	45.5 ^d
Qs 0.0 + EPf 50	44.4 ^{d e}	48.8 ^{d e}
Qs 0.5 + EPf 15	52.7 ^c	38.0 ^c
Qs 0.5 + EPf 30	43.5 ^{d e}	48.8 ^{d e}
Qs 0.5 + EPf 50	39.6 ^{e f}	54.9 ^{e f}
Qs 1.0 + EPf 15	43.8 ^{d e}	48.5 ^{d e}
Qs 1.0 + EPf 30	41.6 ^{d e f}	51.0 ^{d e f}
Qs 1.0 + EPf 50	38.3 ^{f g}	56.9 ^{f g}
Qs 1.5 + EPf 15	44.4 ^d	47.8 ^d
Qs 1.5 + EPf 30	39.6 ^{e f}	53.4 ^{e f}
Qs 1.5 + EPf 50	33.8 ^g	60.2 ^g

^x Control positivo. ^y Control negativo. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey $*=p\leq 0.05$) / ^x Positive control. ^y Negative control. Means with different letters are statistically different (Tukey's Test $*=p\leq 0.05$).

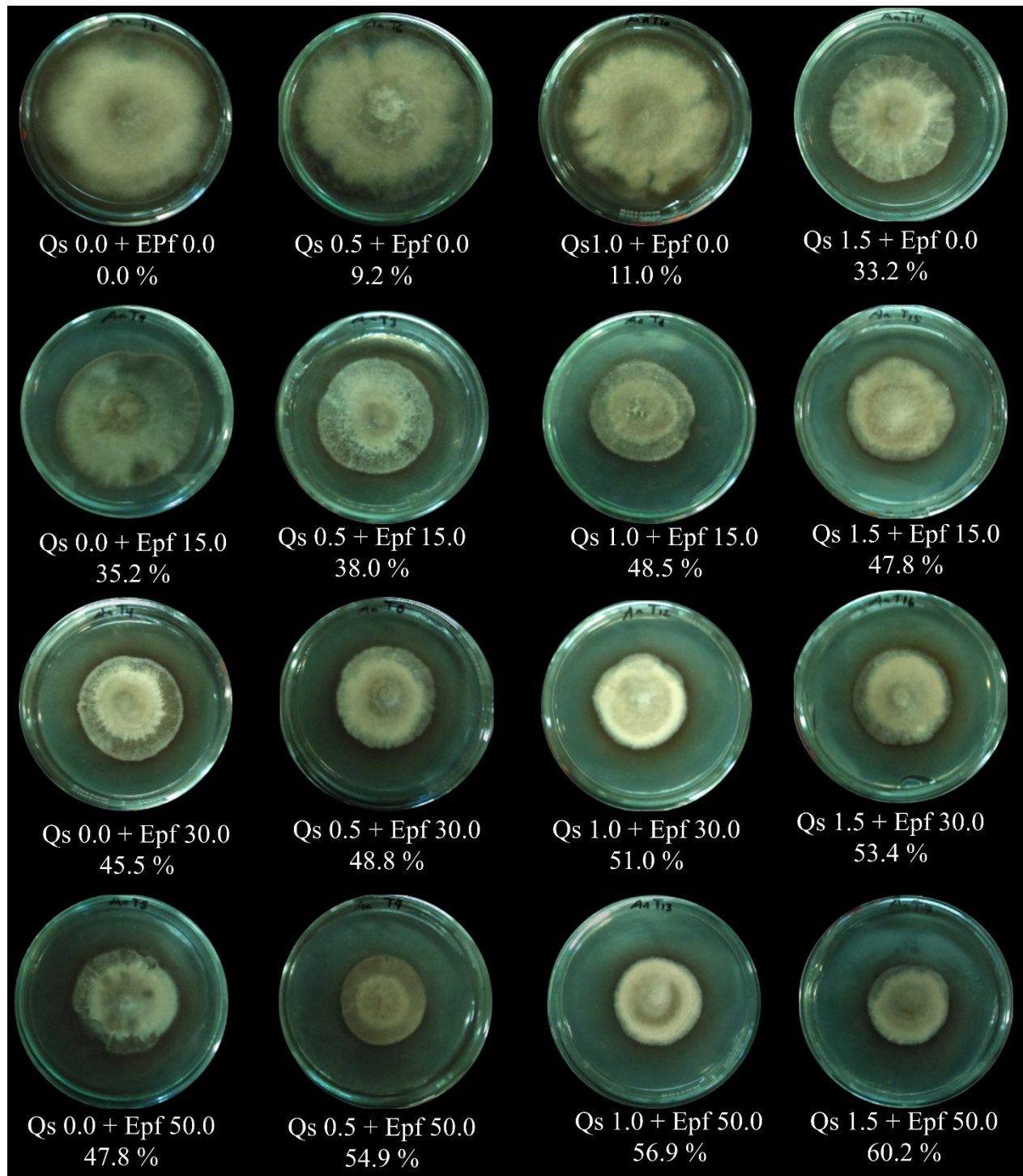


Figura 2. Efecto de control *in vitro* de las mezclas de quitosano y extractos de *P. fluorescens* (Qs % + Epf %) sobre *A. alternata*.

Figure 2. Effect of the control *in vitro* of the mixtures of chitosan and extracts of *P. fluorescens* (Qs % + Epf %) on *A. alternata*.

bió entre 9 y 33%, sin embargo, en otros estudios el efecto inhibitorio se observó con concentraciones desde 0.5% de quitosano y mayores a las reportadas en el presente trabajo, con una inhibición del 54.6% para *Fusarium solani* f.sp. *glycines* (Prapagdee *et al.*, 2007) y del 100% para *Botrytis cinerea* (Liu *et al.*, 2007) y *Alternata chikunkiana* (Meng *et al.*, 2008).

Por otro lado, el efecto antifúngico individual de los EPf fue mayor que la del Qs en todos los casos, con una inhibición máxima del 47 %; en comparación con otros extractos celulares, los extractos de *Streptomyces griseus* redujeron un 33 % el desarrollo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Zacky y Ting, 2013) y extractos de *Bacillus subtilis* inhibieron un 94% el desarrollo micelial *in vitro* de *Penicillium digitatum* (Waewthongrak *et al.*, 2015).

Las mezclas de Qs y EPf tuvieron mayor inhibición en comparación con los efectos individuales en todos los casos, la mezcla con la mayor concentración de ambos componentes (Qs 1.5 % + EPf 50%) tuvo el mayor efecto de control en el crecimiento micelial de *A. alternata*; ya se reportó el efecto de la mezcla de quitosano y otros compuestos antifúngicos para el control de hongos fitopatógenos, la mezcla de quitosano con cera de abeja y aceite esencial de limón inhibe el 100% el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ramos-García *et al.*, 2012), la mezcla de quitosano con etanol (Qs 0.5% + etanol 20%) redujo hasta 94% el deterioro por *B. cinerea* en uva (Romanazzi *et al.*, 2007), la mezcla de quitosano con extractos de hojas de papaya y chirimoya redujeron el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporoides* hasta 50% con respecto al control (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

La mayor inhibición del crecimiento micelial de este estudio (60.2%) fue menor respecto a ensayos anteriores, en donde los agentes antifúngicos se mezclaron con el sustrato (PDA) como un medio

EPf 50%) had the greatest effect of controlling the mycelial growth of *A. alternata*. The effect of the mixture of chitosan and other antifungal effects for the control of phytopathogenic fungi was reported earlier; the mixture of chitosan with beeswax and essential lemon oil inhibits the mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* (Ramos-García *et al.*, 2012) by 100%, the mixture of chitosan with ethanol (Qs 0.5% + ethanol 20%) reduced by up to 94% the deterioration caused by *B. cinerea* in grapes (Romanazzi *et al.*, 2007), whereas the mixture of chitosan with papaya and custard apple leaf extracts reduced the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporoides* by up to 50% in comparison with the control (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

The greatest inhibition of mycelial growth in this study (60.2%) was lower than in previous studies, where antifungal agents were mixed with the substrate (PDA) as poisoned medium; for this investigation, it was applied as a cover on the surface of the culture medium to simulate the conditions of *in vivo* applications, where the biocontrol agents are sprayed on the surface of leaves and fruits (Feliziani *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2016). The mixture of Qs 1.5% + EPf 50% was used to evaluate the conidia germination, and had an inhibiting effect of 100%, equal to the effect of the commercial fungicide, in comparison with the negative control, 4 days after applying the treatments (Figure 3).

The control effect of the mixture Qs 1.5% + EPf 50% is related to the antifungal capacity of the components. The polycationic nature of the chitosan interferes with the negative charges of the cell membrane, modifies permeability and causes the leak of intracellular material, as well as the separation between cell membrane and wall of hyphae and conidia (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). The slimming of hyphae and the loss of cytoplasmic content is due

envenenado; para este trabajo, se aplicó como recubrimiento en la superficie del medio de cultivo, que simula las condiciones de aplicaciones *in vivo* en donde los agentes de biocontrol se asperjan sobre la superficie de hojas y frutos (Feliziani *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2016). La mezcla de Qs 1.5% + EPF 50% se utilizó para evaluar la germinación de conidios y tuvo un efecto inhibitorio de 100 %, igual al efecto del fungicida comercial, en comparación con el control negativo, después de 4 días de aplicar los tratamientos (Figura 3).

El efecto de control de la mezcla Qs 1.5% + EPF 50%, se relaciona con la capacidad antifúngica de los componentes. La naturaleza policatiónica del quitosano interfiere con las cargas negativas de la membrana celular, modifica la permeabilidad y provoca la fuga del material intracelular, así como la separación entre membrana y pared celular de hifas y conidios (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). El adelgazamiento de hifas y pérdida del contenido citoplasmático se debe al aumento en la permeabilidad de la membrana, inducida por la interacción electrostática de los

to the increase in membrane permeability, induced by the electrostatic interaction of the amino groups of the chitosan with the negative charges of the membrane (Palma *et al.*, 2008).

The use of *P. fluorescens* extracts (Epf) is an interesting option for tackling the limitations of the use of cell biomass. *P. fluorescens* is commonly used as a biocontrol agent by the application of viable cells in the soil or plants, with variable results due to the lack of long term viability and inability to produce specialized resistance structures (endospores) like other biocontrol genera do (Narayasamy, 2003). In addition, inoculation is inconsistent between fields and between years, due to the variability in colonization, which results in a variable expression of the biocontrol mechanisms as antibiotics (Mark *et al.*, 2006). Another limitation of the use of *P. fluorescens* is the environmental impact on the native saprophytic populations, with negative effects on the rhizosphere (Couillerot *et al.*, 2008). In addition, there is the possible antibiotic transference (Nwosu, 2001) to other bacteria, it been documented the transference

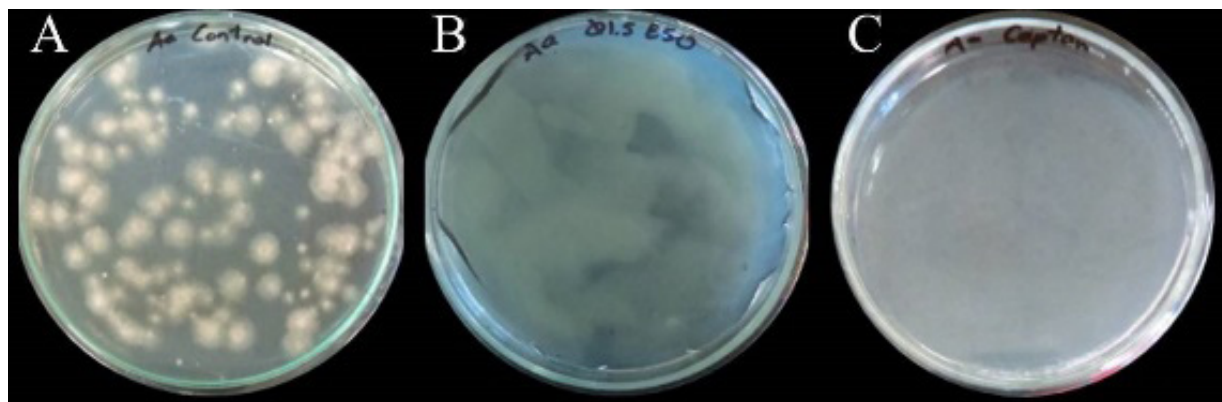


Figura 3. Germinación de conidios de *Alternaria alternata* en PDA; control negativo (A), mezcla de Qs 1.5% + EPf 50% (B), Captan 0.25% p/v (C).

Figure 3. Conidia germination of *Alternaria alternata* in PDA; negative control (A), mixture of Qs 1.5% + EPf 50% (B), Captan 0.25% w/v (C).

grupos amino del quitosano con las cargas negativas de la membrana (Palma *et al.*, 2008).

El uso de extractos de *P. fluorescens* (EpF) representa una interesante opción para abordar las limitaciones del uso de biomasa celular. Comúnmente *P. fluorescens* se usa como agente de biocontrol mediante la aplicación de células viables en el suelo o plantas, con resultados variables debido a la falta de viabilidad a largo plazo e incapacidad para producir estructuras especializadas de resistencia (endosporas) como otros géneros de biocontrol (Narayasamy, 2003). Adicionalmente la inoculación es inconsistente de un campo de cultivo a otro y de un año a otro, debido a la variabilidad en la colonización que resulta en una expresión variable de los mecanismos de biocontrol como antibióticos (Mark *et al.*, 2006). Otra limitante del uso de *P. fluorescens* es el impacto ecológico en las poblaciones saprofitas indígenas, con efectos negativos sobre la rizosfera (Couillerot *et al.*, 2008). Además, existe la posible transferencia a antibióticos (Nwosu, 2001) a otras bacterias, ya que se ha documentado la transferencia de plásmidos entre cepas introducidas e indígenas de bacterias del suelo (Daane *et al.*, 1996). El uso de los extractos producidos por *P. fluorescens* (EpF) de este estudio demuestra el efecto antifúngico *in vitro*, como una alternativa viable para el control de *A. alternata*.

En los extractos de *P. fluorescens* del presente estudio, no se determinaron las identidades de los compuestos antifúngicos, pero el control biológico por *P. fluorescens* se atribuye a la producción de compuestos extracelulares como fenazinas, fluoroglucinos, pirrolidina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos, sideróforos y cianuro de hidrógeno (Gerhardson, 2002; Hass y Defago, 2005). Se ha propuesto que estos compuestos actúan como inhibidores enzimáticos en el metabolismo de la glucosa, que se difunden a través de la membrana, actúan como agentes reductores, producen com-

of plasmids due to the transference of plasmids between introduced and native strains of soil bacteria (Daane *et al.*, 1996). The use of extracts produced by *P. fluorescens* (EpF) in this study show the *in vitro* antifungal effect as a viable alternative for the control of *A. alternata*.

In the extracts of *P. fluorescens* in this study, the identities of the antifungal compounds were not determined, yet the biological control by *P. fluorescens* is attributed to the production of extracellular compounds such as phenazines, fluoroglucinos, pyrrolidine, pyrrolnitrine, cyclic lipopeptides, siderophores and hydrogen cyanide (Gerhardson, 2002; Hass and Defago, 2005). It has been suggested that these compounds act as enzyme inhibitors in the metabolism of glucose, which diffuse through the membrane, act as reduction agents, produce toxic compounds that affect the morphology of hyphae and conidia, and speed up the death process (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003; Premachandra *et al.*, 2016).

***A. alternata* control trials in tomato in greenhouse.** The incidence of the disease caused by *A. alternata* was 100 %. All plants treated showed the characteristic symptoms, such as leaves with dark brown to black circle-shaped spots and wilting. The severity of the disease showed variations throughout the application of the treatments; at the end of the applications we observed a behavior with no statistical difference between Qs 1.5 % + EPF 50 % and Captan (Table 3).

The success of a biological control product depends on the pathogen's control ability, although reaching high effectiveness levels (95-98%) with the use of one single biocontrol agent is difficult (Guetsky *et al.*, 2002). Nowadays there is a search for the mixtures of biological agents or additives to overcome the variable performance of the

puestos tóxicos que afectan la morfología de hifas y conidios y aceleran el proceso de muerte (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003; Premachandra *et al.*, 2016).

Pruebas de control de *A. alternata* en plantas de jitomate en invernadero. La incidencia de la enfermedad causada por *A. alternata* fue 100%, todas las plantas tratadas mostraron los síntomas característicos, como hojas con manchas circulares de color café oscuro a negro y marchitez. La severidad de la enfermedad mostró variaciones a lo largo de la aplicación de los tratamientos, al final de las aplicaciones se observó un comportamiento sin diferencia estadística entre Qs 1.5% + EPf 50% y Captan (Cuadro 3).

El éxito de un producto de control biológico, depende de la capacidad de control del patógeno, sin embargo alcanzar niveles de efectividad altos (95-98%), mediante el uso de un único agente de biocontrol resulta difícil (Guetsky *et al.*, 2002). Actualmente se busca el uso de mezclas de agentes de biológicos o aditivos para superar el rendimiento variable de los agentes de biocontrol y aumentar la efectividad del control (Droby, 2006). El uso de mezclas de agentes de biocontrol que exhiben varios o distintos mecanismos de acción dará lugar a efectos sinérgicos y en algunos casos antagónicos (Guetsky *et al.*, 2001).

biocontrol agents and increase the effectiveness of the control (Droby, 2006). The use of mixtures of biocontrol agents that display various or different action mechanisms will give rise to synergistic, and in some cases, antagonistic effects (Guetsky *et al.*, 2001).

There are diverse reports about the management of diseases caused by fungi in crops of nutritional interest with the application of mixtures of chitosan with extracts of biocontrol microorganisms or their viable cells, yet results are variable. Contrary to this study, Postma *et al.*, (2009) observed that a mixture of extract of *Lysobacter enzymogenes* and chitosan (1.0%) did not inhibit the disease caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber plants, but the mixture with viable biomass reduced the incidence of the disease by 74 %. On the other hand, concentrations starting at 0.01 % of chitosan reduce the number of viable cells of the biocontrol agent *Cryptococcus laurentii* (Ting *et al.*, 2012), therefore a mixture of both agents is not viable.

The combination of chitosan with the extracts of *P. fluorecens* (Qs + Epf) proved to be effective for the control of *A. alternata*. The mode of action of the chitosan can be attributed to a direct antimicrobial effect on the pathogen or the induction of resistance of the plant (Bakeer *et al.*, 2016). On the other hand, the main mechanism of action attributable

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de la mezcla Qs 1.5% + EPf 50% en la severidad en plantas de jitomate en invernadero.
Table 3. Effect of the application of the mixture Qs 1.5% + EPf 50% on the severity in tomato plants in the greenhouse.

Tratamiento	Severidad (%)		
	7 DDI ^x	30 DDI ^x	60 DDI ^x
Control negativo (agua)	57.4 ^a	36.0 ^a	21.3 ^a
Control positivo (Captan)	38.9 ^b	21.0 ^b	16.9 ^b
Qs1.5 % + EPf50 %	51.8 ^a	29.8 ^{ab}	16.2 ^b

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey * $p \leq 0.05$) / Means with different letters in each column are statistical different (Tukey's Test * $p \leq 0.05$).

^xDDI (días después de la inoculación) / ^xDAI (days after inoculation).

Existen diversos reportes sobre el manejo de las enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés alimentario mediante la aplicación de mezclas de quitosano con extractos de microorganismos de biocontrol o células viables de éstos, pero los resultados son variables. Contrario a este estudio, Postma *et al.*, (2009) observaron que una mezcla de extracto de *Lysobacter enzymogenes* y quitosano (1.0%) no inhibió la enfermedad causada por *Pythium aphanidermatum* en plantas de pepino, pero la mezcla con biomasa viable redujo en 74% de la incidencia de la enfermedad. Por otro lado, concentraciones a partir de 0.01% de quitosano disminuyen el número de células viables del agente de biocontrol *Cryptococcus laurentii* (Ting *et al.*, 2012) por lo que una mezcla de ambos agentes no es viable.

La combinación del quitosano en combinación con los extractos de *P. fluorecens* (Q + Epf) demostró ser efectiva para el control de *A. alternata*. El modo de acción del quitosano puede ser atribuido a un efecto antimicrobiano directo sobre el patógeno o inducción de resistencia de la planta (Bakeer *et al.*, 2016). Por otro lado, el principal mecanismo de acción atribuible a *P. fluorecens* es la producción de diferentes tipos de antibióticos (Walsh *et al.*, 2001). En el presente estudio la reducción de la severidad de *A. alternata* podría atribuirse la combinación de los distintos mecanismos de acción de ambos agentes.

Los mejores resultados de inhibición de las enfermedades se obtienen con quitosano en concentraciones superiores a 0.5% (Miranda, 2016), pero los mecanismos de acción que se ejercen sobre los hongos fitopatógenos también podrían inhibir el crecimiento de algunos microorganismos de biocontrol (Xing *et al.*, 2015). Por lo tanto, la mezcla antifúngica de este estudio es una alternativa a este comportamiento, ya que no existe un efecto antagónico del quitosano sobre el inóculo o las células

to *P. fluorecens* is the production of different types of antibiotics (Walsh *et al.*, 2001). In this study, the reduction of the severity of *A. alternata* may be due to the combination of the different action mechanisms of both agents.

The best results of disease inhibition are obtained with chitosan in concentrations above 0.5% (Miranda, 2016), although the action mechanisms exerted on the phytopathogenic fungi could also inhibit the growth of some biocontrol microorganisms (Xing *et al.*, 2015). Therefore, the antifungal mixture of this study is an alternative to this behavior, since there is no antagonistic effect of chitosan on the inoculum or on the cells of *P. fluorecens*, and the effect of both antifungal agents is maintained.

CONCLUSIONS

The *P. fluorecens* extracts, chitosan and the mixture of both agents inhibited mycelial growth and the conidia germination of *A. alternata* in trials *in vitro*. In the trials in greenhouse, all plants presented the typical symptoms of the *A. alternata* fungus. The antifungal effect of the mixtures of chitosan and extracts of *P. fluorecens* was greater than the control agents used individually. The trials in the greenhouse show that there is no significant difference between the use of the mixture of chitosan and extracts of *P. fluorecens* and the commercial agrochemical, hence the mixture could be a strategy for the control of phytopathogenic fungi in fruit and vegetable crops.

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

de *P. fluorescens* y se mantiene el efecto de ambos agentes antifúngicos.

## CONCLUSIONES

Los extractos de *P. fluorescens*, el quitosano y la mezcla de ambos agentes, inhibieron el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata* en pruebas *in vitro*. En las pruebas en invernadero todas las plantas mostraron los síntomas típicos del hongo *A. alternata*. El efecto antifúngico de las mezclas de quitosano y extractos de *P. fluorescens*, fue mayor respecto a los agentes de control usados de forma individual. Las pruebas en invernadero muestran que no hay diferencia significativa entre el uso de la mezcla de quitosano y extractos de *P. fluorescens* y el agroquímico comercial, por lo que la mezcla podría ser una estrategia para el control de hongos fitopatógenos en cultivos hortofrutícolas.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press. San Diego, California, USA. 300-303. <https://doi.org/10.1017/S0014479700015507>
- Alemu F, and Alemu T. 2013. Antifungal activity of secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* isolates as a biocontrol agent of chocolate spot disease (*Botrytis fabae*) of faba bean in Ethiopia. African Journal of Microbiology Research. 7: 5364-5373. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5899>
- Bakeer AR, El-Mohamedy RSR, Saied NM, Abd-El-Kareem. 2016. Field suppression of *Fusarium* soil borne diseases of tomato plants by the combined applications of bio agents and chitosan. 3: 1-10. <https://doi.org/10.9734/bbj/2016/24985>
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, and Wilson CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection 22: 1087-1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Bautista-Baños S, Barrera NL, Hernández-López M, and Rodríguez-González F. 2016. Morphological and ultrastructural modifications of chitosan-treated fungal phytopathogens. (251-275). In: Bautista-Baños S, Romanazzi G. and Jiménez-Aparicio A. (Eds.). Chitosan in the preservation of agricultural commodities. Academic Press/Elsevier USA 394p. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-03033-x>
- Chin A Woeng TFC, Bloemberg GV and Lugtenberg BJJ. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New Phytologist. 157: 503-523. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00686.x>
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J and Moëgne-Loccoz. 2008. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. Letters in Applied Microbiology. 48: 505-512. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2009.02566.x>
- Daane LL, Molina JA, Berry EC and Sadowsky MJ. 1996. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. Applied Environmental Microbiology. 62: 515-521. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593052>.
- Dean R, Van Kan JAL, Petrorius ZA, Hammond KE, Di Pietro AD, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- De Oliveira ENJ. 2016. Fungal growth control by chitosan and derivatives (62-76). In: Sultan S (Eds). Fungal Pathogenicity. IntechOpen. USA. <https://doi.org/10.5772/63308>
- Droby, S. 2006. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. Acta Horticulturae. 709:45-51. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.709.5>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAOSTAT Statistics Database. [www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat) (consulta noviembre 2018).
- Feliziani E, Landi L, and Romanazzi G. 2015. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. Carbohydrate Polymers. 132: 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.078>
- Gerhardson B. 2002. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology 20: 338-343. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)02021-8)
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. The American Phytopathological Society. 91: 1024:1031. <https://doi.org/10.1094/phyto.2001.91.7.621>
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Biological Control. 92: 976:985. <https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.9.976>
- Hass D and Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. 3: 307-319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>.
- Korsten, L, and Jager EE. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. SAAGA Yearbook 18: 124-130. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ZA9600511>



- Kwak Y, Park GS, Shin, JH. 2016. High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. *Standards in Genomic Sciences*. 11: 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0173-7>
- Liu J, Tian S, Meng X and Xu Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 44: 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>
- Logrieco A, Moretti A and Solfrizzo M. 2009. *Alternaria* Toxins and plant diseases: an overview of of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*. 2: 129-140. <https://doi.org/10.3920/wmj2009.1145>
- Maqbool M, Ali A, Ramachandran S, Smith DR and Alderson PG. 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Protection*. 29:1136 – 1141. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.06.005>
- Mark GL, Morrissey PJ, Higgins P and O'Hara F. 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *Federation of European Microbiological Societies*. 56:167-177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00056.x>
- Meng X, Li B, Liu J and Tian S. 2008. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*. 106: 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012>
- Miranda CS 2016. Application of Chitosan in Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *In: Bautista-Baños S, Romanazzi G. and Jiménez-Aparicio A. (Eds.). Chitosan in the preservation of agricultural commodities*. Academic Press/Elsevier USA 394p. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-03033-x>
- Mishra S and Arora NK. 2012. Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2,4- diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. *Biological Control* 61: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.011>
- Narasamy P. 2003. Development of formulations and commercialization of biological products. *In: Hokkanen MTH (Eds). Biological Management of Diseases*. Springer USA 382p. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6377-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6377-7_2)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2018. Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consulta agosto 2018).
- Nwosu V. 2001. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology*. 152:421-430. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01215-3](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01215-3)
- Orberá TM, Serrat MJ, Ortega E. 2014. Potential applications of *Bacillus subtilis* strain SR/B-16 for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops. *Biotecnología Aplicada*. 31:13-17. <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v31n1/bta02114.pdf>
- Pal KK, and McSpadden BG. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25p. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Palma GJ, H BJ, Salina J and Lopez LLV. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal Applied Microbiology*. 104: 541-553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x>
- Petriacq P, López A and Luna E. 2018. Fruit decay to diseases: Can Induced Resistance and Priming Gelp?. *Plants*. 7: 1-16. <https://doi.org/10.3390/plants7040077>
- Postma J, Stevens L, Wieggers G, Davelaar E, and Nijhuis E. 2009. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1T8 and chitosan. *Biological Control* 48: 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.11.006>
- Prapagdee B, Kotchadat K Kumsopa A and Visarathanonth N. 2007. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Bioresource Technology*. 98:1353-1358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.029>
- Premachandra D, Hudek L and Brau L. 2016. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *Journal of Biotechnology and Biomaterials* 6: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.029>
- Ramos-García M, Bosquez-Molina E, Hernández-Romano J, Zavala-Padilla G, Terrés-Rojas E, Alia-Tejagal I, Barrera-Necha L, Hernández-Lopez M, and Bautista-Baños S. 2012. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection*. 38:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.016>
- Redondo-Nieto M, Barret M, Morrissey JP, Germaine K, Martínez-Granero F, Barahona E, Navazo A, Sánchez-Contreras M, Moynihan JA, Giddens SR, Coppoolse ER, Muriel C, Stiekeme WJ, Rainey PB, Dowling DO, Fergal M, and Rivilla MR. 2012. Genome Sequence of the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology* 1273–1274. <https://doi.org/10.1128/JB.06601-11>
- Romanazzi G, Karabulut OA and Smilanick JL. 2007. Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 45: 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.004>
- Saavedra GM, Figueroa NE, Poblete LA, Cherian S and Figueroa CR. 2016. Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. *Food Chemistry* 190: 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.107>
- Sánchez-Bayo F and Tennekes HA. 2015. Environmental Risk Assessment of Agrochemicals - A Critical Appraisal of Current Approaches. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. Chapter 1: 2-37. <https://doi.org/10.5772/60739>
- Sánchez Dominguez D, Ríos MY, Castillo-Ocampo P, Zavala-Padilla G, Ramos GM, and Bautista BS. 2011. Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*-tomato. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:250–255. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.01.003>

- Schaad NW. 1988. Identification schemes. In: N.W. Schaad (Ed.). Laboratory guide of identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. American Phytopathological Society. Press, USA. 1-15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- Strange NR, and Scott PR. 2005. A threat to global food security. Annual Review of Phytopathology. 43:83-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Terna TP, Okoro JK, Bem AA, Okogbaa JI and Waya JI. 2016. Incidence and severity of diseases associated with rain-fed tomatoes in Benue State, Nigeria. 9: 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.184>
- Ting Y, Chen Y, Fangxia C, Kuang S, Tao Z, Mahbuba Z, Ornisa A, Sheng Y, and Xiaodong Z. 2012. Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride. Postharvest Biology and Technology 69: 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.007>
- Trigos A, Ramírez K, y Salinas A. 2008. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Revista Mexicana de Micología 28:125-129. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88319381015>
- Waewthongrak W, Pisuchpen S and Leelasuphakul W. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 99: 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.016>
- Walsh F, Morrissey P, O'Gara F. 2001. *Pseudomonas* for bio-control of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Environmental biotechnology. 12: 289-295. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00212-3)
- Xing K, Zhu X, Peng X and Qin S. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. Agronomy for Sustainable Development. 35:1-20. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>
- Yanes ML, De La Fuente L, Altier N and Arias A. 2012. Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. Biological Control. 63: 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.006>
- Zacky FA and Ting ASY. 2013. Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Biological Control 66: 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.06.001>
- Zargar V, Asghari M and Dashti A. 2015. A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. ChemBioEng Reviews. 2: 204-226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>