

Chitosan effects on phytopathogenic fungi and seed germination of *Jatropha curcas* L.

Efectos del quitosano en hongos fitopatógenos y en la germinación de semillas de *Jatropha curcas* L.

Diana Pabón-Baquero¹; Miguel G. Velázquez-del Valle¹; Silvia Evangelista-Lozano²; Renato León-Rodríguez³; Ana N. Hernández-Lauzardo¹.

¹Departamento de Interacciones Planta-Insecto, ²Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla, km 6, calle CEPROBI núm. 8, col. San Isidro. C. P. 62731. Yautepec, Morelos, México.

Correo-e: anhernandez@ipn.mx Tel.: (52) 55 5729 6000 ext. 82511 (*Autora para correspondencia).

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer circuito exterior s/n, edificio C, Ciudad Universitaria. C. P. 04510. Coyoacán, México, D. F.

Abstract

Jatropha curcas is a plant with great agricultural and industrial potential. In this study, two fungal species were isolated from ungerminated seeds. The fungal isolates were morphologically and molecularly identified as *Fusarium equiseti* and *Curvularia lunata*. Effects of chitosan on mycelial growth, sporulation and spore germination of *F. equiseti* and *C. lunata* were evaluated. In addition, its effect on seed germination of *J. curcas* was studied. The results showed that all tested chitosan concentrations (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg·mL⁻¹) inhibited the mycelial growth of the fungi. Sporulation and spore germination responses differed depending on the fungal species. Chitosan completely inhibited sporulation of *C. lunata* and spore germination of *F. equiseti*. Inoculation with *F. equiseti* and *C. lunata* reduced seed germination of *J. curcas* by 20 and 26.6 %, respectively. However, application of chitosan before inoculation inhibited pathogenic activity. Therefore, chitosan did not affect seed germination and caused inhibitory effects on *F. equiseti* and *C. lunata*. This is the first report on the effect of chitosan on *J. curcas*.

Keywords: Fungal diseases, polymer, oil seeds, *Fusarium equiseti*, *Curvularia lunata*.

Resumen

Jatropha curcas es una planta con gran potencial agrícola e industrial. En este estudio se aislaron dos hongos de semillas no germinadas. Los aislamientos fúngicos se identificaron morfológica y molecularmente como *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata*. Los efectos del quitosano se evaluaron sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas de *F. equiseti* y *C. lunata*. Además, se estudió el efecto sobre la germinación de las semillas de *J. curcas*. Los resultados demostraron que todas las concentraciones probadas de quitosano (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg·mL⁻¹) inhibieron el crecimiento micelial de los hongos. Las respuestas de esporulación y germinación de esporas fueron diferentes dependiendo de la especie fúngica; el quitosano inhibió completamente la esporulación *C. lunata* y la germinación de esporas de *F. equiseti*. La inoculación con *F. equiseti* y *C. lunata* redujo la germinación de semillas de *J. curcas* 20 y 26.6 %, respectivamente; sin embargo, la aplicación de quitosano antes de la inoculación inhibió la actividad patogénica. En conclusión, el quitosano no afectó la germinación de las semillas y causó efectos inhibitorios en *F. equiseti* y *C. lunata*. Este es el primer reporte del efecto del quitosano en *J. curcas*.

Palabras clave: Enfermedades fúngicas, polímero, semillas oleaginosas, *Fusarium equiseti*, *Curvularia lunata*.

Introduction

Mexico has been identified as the center of origin and domestication of *Jatropha curcas* L. (Dias, Missio, & Dias, 2012). It is a species with many attributes and considerable potential. Its seeds contain oil that can be processed to obtain biodiesel fuel. On the other hand, edible varieties of *J. curcas* have been identified in Mexico; their seeds have high protein content and can be used for preparation of various traditional dishes and for animal feed (Martínez-Herrera et al., 2012).

However, there are reports of several diseases affecting *J. curcas*, such as root rot and collar rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (Latha et al., 2009), black rot caused by *Botryosphaeria diplobotrya* (Moug.) Ces. & De Not. (Rao, Kumari, Wani, & Marimuthu, 2011), root rot caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taubenh.) E. J. Butler (Kumar, Sharma, Pathak, & Beniwal, 2011), anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. (Kwon, Choi, Kim, & Kwak, 2012), and inflorescence blight caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Espinoza-Verduzco et al., 2012), among others. The presence of some species of phytopathogenic fungi has been found on *J. curcas* seeds in storage (Dharmaputra, Worang, Syarief, & Miftahudin, 2009). At the beginning of storage, the seed-infecting fungi were field fungi (*Cladosporium* spp., *Colletotrichum* sp., and *Fusarium* spp.). These fungal populations decreased with increased storage time and were replaced by postharvest fungi (*Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.). The lipid content, viability and vigor of seeds decreased with increasing storage time (Dharmaputra et al., 2009). Additionally, other authors reported that *Aspergillus flavus* (Link.) and *Rhizopus nigricans* (Ehrenb.) affected germination and seedling vigor of *J. curcas* (Anjorin, Omolewa, & Salako, 2011). Synthetic chemical fungicides are widely used to combat seed pathogenic fungi. However, these chemicals pose risks to the environment and human health (Alavanja, Ross, & Bonner, 2013). Therefore, it is necessary to use natural alternatives for the control of phytopathogenic fungi.

Chitosan is a deacetylated derivative of chitin with excellent antimicrobial properties. It has been used to control phytopathogenic fungi and to enhance plant defenses and development. Positive effects of chitosan application as a seed coating have been reported for various plant species such as wheat (*Triticum* spp.), rice (*Oriza* spp.), maize (*Zea mays* L.), peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and carrots (*Daucus carota* L.) (El Hadrami, Adam, El Hadrami, & Daayf, 2010). Additionally, Ziani, Ursúa, & Maté (2010) showed that chitosan coating significantly increased seed germination and plant growth of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and resulted in decreased fungal contamination. Other authors have observed

Introducción

México ha sido identificado como el centro de origen y domesticación de *Jatropha curcas* L. (Dias, Missio, & Dias, 2012). *Jatropha curcas* es una especie con muchos atributos y potencial considerable; sus semillas contienen aceite que se puede procesar para obtener biodiesel. En México se han identificado distintas variedades comestibles de *J. curcas*; sus semillas tienen alto contenido de proteína y pueden usarse para la preparación de varios platillos tradicionales y para la alimentación animal (Martínez-Herrera et al., 2012).

Existen informes de varias enfermedades que afectan a *J. curcas*, tales como la pudrición de raíz y pudrición del pedúnculo causado por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (Latha et al., 2009), pudrición negra causada por *Botryosphaeria diplobotrya* (Moug.) Ces. & De Not. (Rao, Kumari, Wani, & Marimuthu, 2011), pudrición de raíz por *Rhizoctonia bataticola* (Taubenh.) E. J. Butler (Kumar, Sharma, Pathak, & Beniwal, 2011), antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. (Kwon, Choi, Kim, & Kwak, 2012) y tizón en la inflorescencia causado por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Espinoza-Verduzco et al., 2012). Por otro lado, Dharmaputra, Worang, Syarief, y Miftahudin (2009) reportaron la presencia de algunas especies de hongos fitopatógenos en semillas de *J. curcas* durante el almacenamiento. Al comienzo del almacenamiento, los hongos que infectaron las semillas procedieron de campo (*Cladosporium* spp., *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* spp.). Estas poblaciones de hongos disminuyeron con el aumento del tiempo de almacenamiento y fueron reemplazadas por hongos postcosecha (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.). Dharmaputra et al. (2009) también reportaron que el contenido de lípidos, la viabilidad y el vigor de las semillas disminuyó al aumentar el tiempo de almacenamiento. Además, otros autores informaron que *Aspergillus flavus* (Link.) y *Rhizopus nigricans* (Ehrenb.) afectaron la germinación y el vigor de las plántulas de *J. curcas* (Anjorin, Omolewa, & Salako, 2011). Los fungicidas químicos sintéticos son utilizados ampliamente para combatir hongos patógenos de semillas; sin embargo, estos químicos representan riesgos para el medio ambiente y la salud humana (Alavanja, Ross, & Bonner, 2013). Por tanto, es necesario utilizar alternativas naturales para el control de hongos fitopatógenos.

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina con propiedades antimicrobianas que se ha utilizado para el control de hongos fitopatógenos y para mejorar las defensas y desarrollo de la planta. Los efectos positivos de la aplicación del quitosano como recubrimiento han sido reportados en diversas especies de plantas como trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oriza* spp.), maíz (*Zea mays* L.), maní (*Arachis hypogaea*

that chitosan coating resulted in a lower incidence of fungal infections of chili (*Capsicum* spp.) seeds, but it did not significantly affect moisture content and germination of seeds (Chookhongkha, Sopondilok, & Photchanachai, 2013). In the case of lentil (*Lens culinaris* Medikus) seeds, chitosan coating induced the highest germination percentage, hypocotyl length, radical length, hypocotyl dry weight and radical dry weight (Al-Tawaha & Al-Ghzawi, 2013). However, there are no reports about the influence of chitosan on *J. curcas*. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effects of chitosan on phytopathogenic fungi and seed germination of *J. curcas*.

Materials and methods

Isolation of fungi from *J. curcas* seeds

Jatropha curcas seeds were disinfected with captan (0.2 %) for 5 min, then washed three times with sterile distilled water and dried on sterilized paper towels. Dry seeds were placed in glass flasks with 50 % Murashige and Skoog (MS) medium and incubated for 6 days at 25 ± 2 °C. Thereafter, fragments of mycelia of 18 fungi from the ungerminated seeds were transferred to Petri plates with potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 ± 2 °C for 7 days.

Pathogenicity test (Koch's postulates)

Mycelial discs (5 mm) of the 18 isolated fungi were placed on *J. curcas* seeds in glass flasks with 50 % MS medium. The same medium without mycelia was used as a control. The flasks were incubated at 25 ± 2 °C for 6 days. To confirm Koch's postulates, the fungal isolates that grew on ungerminated seeds were re-isolated from the seeds on PDA. The colonies formed were purified by serial dilutions to obtain monosporic cultures.

Morphological and molecular identification of the fungal isolates

Mycelial discs (5 mm) of each isolate were placed in the center of Petri plates containing PDA. For morphological characterization, the description of mycelia and spores was carried out in accordance with taxonomical keys (Barnett & Hunter, 1998; Leslie & Summerell, 2006), and the information deposited in the MycoBank (2012). For molecular identification, genomic DNA was isolated from fungal mycelium grown on PDA, according to the protocol of Doyle and Doyle (1990). A region of ribosomal DNA was amplified by PCR using the ITS1 and ITS4 primers (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990); the amplification products were examined by electrophoresis and sequenced. The sequences were compared against sequences

L.) y zanahorias (*Daucus carota* L.) (El Hadrami, Adam, El Hadrami, & Daayf, 2010). Además, Ziani, Ursúa, y Maté (2010) mostraron que el recubrimiento con quitosano aumentó significativamente la germinación de semillas y el crecimiento de la planta de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y disminuyó la contaminación por hongos. Otros autores han observado que el revestimiento con quitosano da como resultado menor incidencia de infecciones fúngicas de las semillas de chile (*Capsicum* spp.), pero no afecta el contenido de humedad y germinación de las semillas significativamente (Chookhongkha, Sopondilok, & Photchanachai, 2013). En el caso de las semillas de lenteja (*Lens culinaris* Medikus), el recubrimiento con quitosano indujo el porcentaje más alto de germinación, la longitud del hipocótilo, la longitud radical, el peso seco del hipocótilo y el peso seco radical (Al-Tawaha & Al-Ghzawi, 2013); sin embargo, no hay informes sobre su influencia en *J. curcas*. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del quitosano sobre los hongos fitopatógenos y la germinación de semillas de *J. curcas*.

Materiales y métodos

Aislamiento de hongos de semillas de *J. curcas*

Las semillas de *J. curcas* se desinfectaron con captan (0.2 %) por 5 min, después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel esterilizadas. Las semillas secas se colocaron en frascos de vidrio con 50 % de medio Murashige y Skoog (MS) y se incubaron por 6 días a 25 ± 2 °C. Posteriormente, los fragmentos de micelio de 18 hongos de las semillas no germinadas se transfirieron a placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 7 días.

Prueba de patogenicidad (postulados de Koch)

Discos de micelio (5 mm) de 18 hongos aislados se colocaron sobre las semillas de *J. curcas* en frascos de vidrio con 50 % de medio MS. El mismo medio sin micelio se utilizó como testigo. Los frascos se incubaron a 25 ± 2 °C durante 6 días. Para confirmar los postulados de Koch, los aislados fúngicos que crecieron en semillas no germinadas se reaislaron de las semillas en PDA. Las colonias formadas se purificaron mediante diluciones seriadas para obtener cultivos monospóricos.

Identificación morfológica y molecular de aislados fúngicos

Los discos de micelio (5 mm) de cada aislado se colocaron en el centro de las placas de Petri que contenían PDA. La caracterización morfológica se hizo mediante la descripción de micelios y esporas de acuerdo con claves taxonómicas (Barnett & Hunter, 1998; Leslie & Summerell, 2006) y la información depositada en el

in databases using the BLAST Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2012).

Chitosan solutions

To prepare a stock solution ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 3 g of chitosan (Sigma-Aldrich) of low molecular weight were dissolved in 150 mL of distilled water with 3 mL of acetic acid on a stirrer for 24 h, and the volume was adjusted to 300 mL with distilled water. The pH was adjusted to 5.6 with NaOH (1 M). The chitosan solution was autoclaved for 15 min. Corresponding aliquots were taken to obtain different chitosan concentrations (0.5 , 1.0 , 2.0 and $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Inhibition of mycelial growth of the fungal isolates by chitosan

One mycelial disc (5 mm) of phytopathogenic fungal isolates was placed in the center of Petri plates containing PDA with chitosan concentrations of 0.5 , 1.0 , 2.0 and $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Control Petri plates contained only PDA. The Petri plates were incubated at $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. The mycelial growth was measured with a digital vernier (Thomas Scientific model 1235C55, USA) when mycelium reached the edges of the control plates and expressed as an average diameter (mm). The mean diameter of fungal growth in the presence of chitosan was compared with that of the control cultures in order to determine the inhibition percentage of the mycelial growth. All experiments were repeated twice with five replicates each.

Effect of chitosan on sporulation of the fungal isolates

Fungal isolates were incubated on PDA supplemented with chitosan (0.5 , 1.0 , 2.0 and $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and without chitosan (control) for 21 days. Thereafter, Petri plates were rinsed with 10 mL of distilled water, and the surface was scraped with a sterile glass rod. Spores were counted using a Neubauer hemocytometer under a light microscope (Nikon Alphaphot-2YS2, Japan) at 40x magnification. The data obtained were expressed as the number of spores $\cdot\text{mL}^{-1}$.

Effect of chitosan on spore germination of the fungal isolates

Spore suspensions ($\sim 300 \text{ spores}\cdot\text{mL}^{-1}$) were obtained from cultures of the fungal isolates after 15 days of incubation. An aliquot (300 μL) was spread over PDA containing chitosan (0.5 , 1.0 , 2.0 , and $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in a Petri dish. The control treatment contained no chitosan. The plates were incubated for 48 h, and the remaining spores were counted. The data obtained

MycoBank (2012). La identificación molecular se hizo con el ADN genómico aislado del micelio fúngico cultivado en PDA, de acuerdo con el protocolo de Doyle y Doyle (1990). Una región de ADN ribosomal se amplificó por PCR utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990); los productos de amplificación se examinaron mediante electroforesis y se secuenciaron. Las secuencias se compararon con las secuencias en las bases de datos utilizando la herramienta BLAST Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2012).

Soluciones de quitosano

Para preparar una solución madre de quitosano ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 3 g de quitosano (Sigma-Aldrich) de bajo peso molecular se disolvieron en 150 mL de agua destilada con 3 mL de ácido acético en un agitador durante 24 h. El volumen se ajustó a 300 mL con agua destilada y el pH se ajustó a 5.6 con NaOH (1 M). La solución de quitosano se trató en autoclave durante 15 min. Posteriormente, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de quitosano (0.5 , 1.0 , 2.0 and $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Efecto del quitosano en la inhibición de crecimiento de micelio de aislados fúngicos

Un disco de micelio (5 mm) de aislados fúngicos de fitopatógenos se colocó en el centro de las placas de Petri que contenían PDA con concentraciones de quitosano de 0.5 , 1.0 , 2.0 y $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las placas de Petri testigo sólo contenían PDA. El crecimiento micelial se expresó como diámetro medio (mm), el cual se midió con un vernier digital (Thomas Scientific modelo 1235C55, EE.UU.) cuando el micelio alcanzó los bordes de las placas testigo. El diámetro medio de crecimiento de hongos en presencia de quitosano se comparó con el de los cultivos testigo, con el fin de determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. El experimento se repitió dos veces con cinco réplicas cada uno.

Efecto del quitosano en la esporulación de aislados fúngicos

Los aislados fúngicos se incubaron en PDA complementado con quitosano (0.5 , 1.0 , 2.0 y $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y sin quitosano (testigo) durante 21 días. Posteriormente, las placas de Petri se enjuagaron con 10 mL de agua destilada y la superficie se raspó con una varilla de vidrio estéril. Las esporas se contaron usando un hemocitómetro Neubauer en un microscopio de luz (Nikon Alphaphot-2YS2, Japón) con aumento 40x. Los datos obtenidos se expresaron como el número de esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$.

were expressed as a percentage of spore germination (Al-Hetar, Zainal, Sariah, & Wong, 2011). Six repetitions per treatment were made, and each experiment was replicated twice.

Effect of chitosan on seed germination of *J. curcas* (*in vivo* study)

J. curcas seeds were disinfected with captan (0.2 %) for 5 min, then washed three times with sterile distilled water and dried on sterilized paper towels. Thereafter, 10 seeds per treatment were placed in humid chambers (70 %) to be treated as follows: control seeds (without chitosan), seeds treated with chitosan (2.0 or 4.0 mg·mL⁻¹), seeds inoculated with *F. equiseti* (10⁴ spores·mL⁻¹), seeds inoculated with *F. equiseti* (10⁴ spores·mL⁻¹) and treated with chitosan (2.0 or 4.0 mg·mL⁻¹), seeds inoculated with *C. lunata* (10⁴ spores·mL⁻¹), and seeds inoculated with *C. lunata* (10⁴ spores·mL⁻¹) and treated with chitosan (2.0 or 4.0 mg·mL⁻¹). The chambers were put into plastic bags, and the bags were tied up with rubber bands. Ten repetitions were made for each treatment in three replicates. The humid chambers were incubated at 28 ± 2 °C for 3 days, and percentages of seed germination were evaluated.

Statistical analysis

Experiments were conducted using a completely randomized design. The analysis of the data was performed by ANOVA. All experiments were repeated at least twice. Means separation was carried out by use of the Holm-Sidak test ($P < 0.05$) using the SigmaPlot 11.0 program (Systat Software Inc., 2009).

Results and discussion

Pathogenicity test and identification of the fungal isolates

A total of 18 isolates were obtained from ungerminated *J. curcas* seeds. However, a pathogenicity test indicated that only two isolates (A1 and A2) inhibited the seed germination process (Figure 1). Figure 1c shows the germination of uninoculated *J. curcas* seeds in 50 % MS. Normal root development can be observed in Figure 1d. Subsequently, the A1 and A2 fungal isolates were re-isolated from ungerminated seeds on PDA. The results of morphological and molecular identification of the fungal isolates obtained from ungerminated *J. curcas* seeds are shown in Table 1. A relationship between the morphological and molecular identification was found for both A1 and A2 isolates. The BLAST results revealed that two fungal species were isolated from ungerminated seeds. The percentages of identity with GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2012) sequences are shown in

Efecto del quitosano en la germinación de esporas de aislados fúngicos

Las suspensiones de esporas (~300 esporas·mL⁻¹) se obtuvieron a partir de cultivos de aislados fúngicos después de 15 días de incubación. Una alícuota (300 µL) se distribuyó sobre el PDA que contenía quitosano (0.5, 1.0, 2.0, y 4.0 mg·mL⁻¹) en una placa de Petri. El tratamiento testigo no contenía quitosano. Las placas se incubaron por 48 h y se contaron las esporas restantes. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de germinación de las esporas (Al-Hetar, Zainal, Sariah, & Wong, 2011); se tuvieron seis repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Efecto del quitosano en la germinación de semillas de *J. curcas* (estudio *in vivo*)

Las semillas de *J. curcas* se desinfectaron con captan (0.2 %) durante 5 min, después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel esterilizadas. Posteriormente, 10 semillas por tratamiento se colocaron en cámaras húmedas (70 %) para tratarse de la siguiente manera: semillas testigo (sin quitosano), semillas tratadas con quitosano (2.0 o 4.0 mg·mL⁻¹), semillas inoculadas con *F. equiseti* (10⁴ esporas·mL⁻¹), semillas inoculadas con *F. equiseti* (10⁴ esporas·mL⁻¹) y tratadas con quitosano (2.0 o 4.0 mg·mL⁻¹), semillas inoculadas con *C. lunata* (10⁴ esporas·mL⁻¹), y semillas inoculadas con *C. lunata* (10⁴ esporas·mL⁻¹) y tratadas con quitosano (2.0 o 4.0 mg·mL⁻¹). Las cámaras se colocaron en bolsas de plástico atadas con ligas. Diez repeticiones se hicieron para cada tratamiento en tres réplicas. Las cámaras húmedas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 3 días y se determinaron los porcentajes de germinación de las semillas.

Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un diseño completamente al azar. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. La separación de medias se llevó a cabo mediante el uso de la prueba de Holm-Sidak ($P < 0.05$) utilizando el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., 2009).

Resultados y discusión

Prueba de patogenicidad e identificación de aislados fúngicos

Un total de 18 aislados se obtuvieron a partir de semillas no germinadas de *J. curcas*; sin embargo, una prueba de patogenicidad indicó que sólo dos aislados (A1 y A2) inhibieron el proceso de germinación de semilla (Figura 1). En la Figura 1c se muestra la germinación

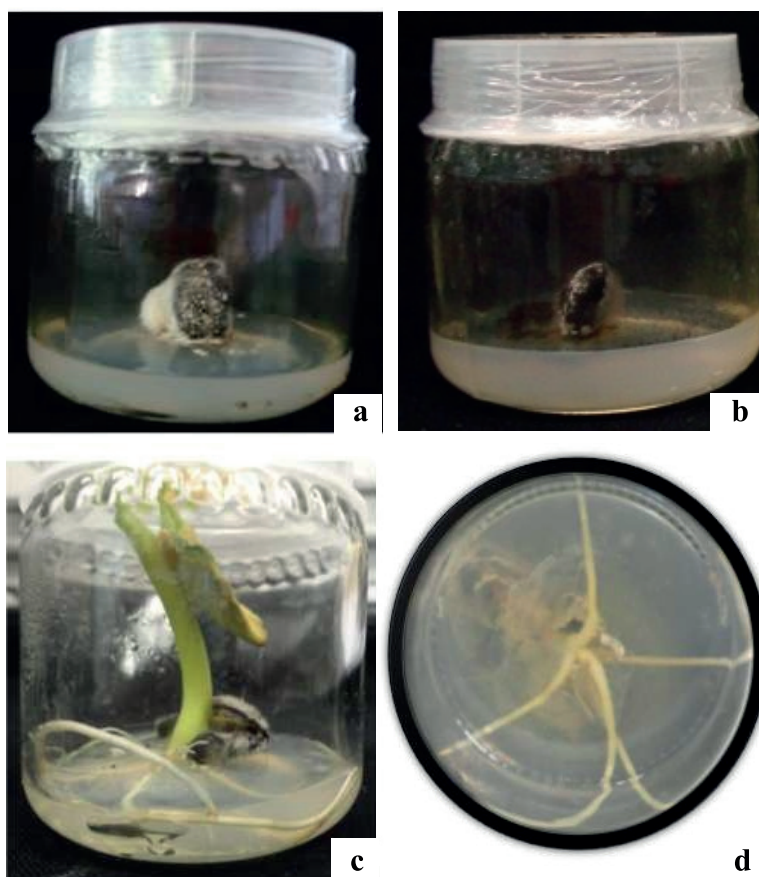


Figure 1. Pathogenicity test *Jatropha curcas*. Seeds inoculated with A1 (a) and A2 (b) fungal isolates. Non-inoculated seeds (c, d).

Figura 1. Prueba de patogenicidad en semillas de *Jatropha curcas*. Semillas inoculadas con aislados fúngicos A1 (a) y A2 (b). Semillas no inoculadas (c, d).

Table 1. Morphological and molecular identification of the fungal isolates obtained from ungerminated seeds of *Jatropha curcas*.

Cuadro 1. Identificación morfológica y molecular de aislados fúngicos obtenidos a partir de semillas no germinadas de *Jatropha curcas*.

Isolates/ Aislados	Morphological characteristics/ Características morfológicas		Molecular identification/Identificación molecular		
	Mycelium (colony and texture)/Micelio (colonia y textura)	Spores (color and shape)/ Esporas (color y forma)	GenBank (accession number)/ GenBank (número de acceso)	Identity (%)/ Identidad (%)	Identification/ Identificación
A1	White to yellow, cottony, no aerial/ Blanco a amarillo, algodonoso, sin micelio aéreo	Hyaline, ellipsoidal curved/Hialina, elipsoidal curvada	JF773657.1	100	<i>Fusarium equiseti</i>
A2	Medium brown, velvety, no aerial/ Café, aterciopelado, sin micelio aéreo	Brown, obovoidal curved/Café, curvada obovoidal	JQ885447.1	98	<i>Curvularia lunata</i>

Table 1. Isolate A1 was identified as *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., and its colonies showed the following characteristics: white to yellow color, cottony texture and no aerial mycelium. The release of a yellow pigment into the media was also observed for this fungal species. On the other hand, isolate A2 was identified as *Curvularia lunata* (Wakker) Boedjin. This species formed medium brown, velvety colonies and no aerial mycelium. It was demonstrated that both fungi affected seed germination of *J. curcas*. *Fusarium* is one of the most important genera of fungi, causing plant diseases, producing mycotoxins, and affecting human health (Summerell & Leslie, 2011). The pathogenicity of *F. equiseti* has been reported in previous studies on *Pinus ponderosa* Douglas ex C. Lawson seeds, and it has been demonstrated to cause damping-off and root rot on seedlings (Salerno & Lori, 2007). Additionally, *F. equiseti* is prevalent in ginseng (*Panax quinquefolius* L.) soil causing the discoloration of the root surface (Punja et al., 2008). In a recent study, *F. equiseti* obtained from seeds caused foliar necrosis and wilt on pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) (Lazarotto et al., 2014). On the other hand, *C. lunata* has been isolated from seeds of plants of economic importance such as rice (Kapse, Bhale, & Jogi, 2012), wheat (Pathak & Zaidi, 2013) and sorghum (*Sorghum* spp.) (Funnell-Harris, Prom, & Pedersen, 2013). In previous studies, *C. lunata* caused the deterioration of *J. curcas* seeds during storage (Srivastava, Sinha, & Srivastava, 2011). However, to date there have been no reports about the presence and potential damage that can be caused by *F. equiseti* and *C. lunata* to *J. curcas* seeds. Taking into account the agricultural and industrial potential of *J. curcas*, it is necessary to evaluate natural alternatives for the control of phytopathogenic fungi affecting this crop.

Effects of chitosan on mycelial growth of *F. equiseti* and *C. lunata*

The antifungal effects of chitosan on the mycelial growth of *F. equiseti* and *C. lunata* are shown in Table 2. The mycelial growth of the two fungal isolates was reduced on media supplemented with chitosan at all tested concentrations. According to the percentages of inhibition of mycelial growth, all treatments showed statistically significant differences ($P < 0.05$) at all chitosan concentrations evaluated compared to the control. The highest inhibitory effects were observed at chitosan concentrations of 2.0 and 4.0 mg·mL⁻¹ against both *F. equiseti* (92.0 and 98.7 %, respectively) and *C. lunata* (88.8 and 92.3 %, respectively). In earlier studies, antifungal effects of chitosan were demonstrated on mycelial growth of *Fusarium lunatum* (Ellis & Everhart) Arx, *Fusarium oxysporum* Shtdl. and *C. lunata*. However, there were differences in sensitivity between the species (Flores-Flores et al., 2013). Likewise, it was

de semillas de *J. curcas* sin inoculación en medio MS (50 %). El desarrollo normal de la raíz se puede observar en la Figura 1d. Posteriormente, los aislados fúngicos A1 y A2 se reaislaron de las semillas germinadas en PDA. El Cuadro 1 presenta los resultados de la identificación morfológica y molecular de aislados fúngicos obtenidos de semillas de *J. curcas* sin germinar. Se encontró relación entre la identificación morfológica y molecular de los aislados A1 y A2. Los resultados de BLAST revelaron que dos especies de hongos fueron aislados a partir de semillas no germinadas. En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de identidad con las secuencias GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2012). El aislado A1 se identificó como *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. y sus colonias mostraron las siguientes características: color blanco a amarillo, textura algodonosa y sin micelio aéreo. La liberación de un pigmento amarillo en los medios también se observó para esta especie de fúngica. Por otro lado, el aislado A2 se identificó como *Curvularia lunata* (Wakker) Boedjin. Esta especie tuvo color café, colonias aterciopeladas y sin micelio aéreo. Se demostró que ambos hongos afectaron la germinación de semillas de *J. curcas*. *Fusarium* es uno de los géneros más importantes que causan enfermedades en las plantas, producen micotoxinas y afectan la salud humana (Summerell & Leslie, 2011). La patogenicidad de *F. equiseti* ha sido reportada en estudios previos sobre semillas de *Pinus ponderosa* Douglas ex C. Lawson y se ha demostrado que causa caída de almácigos y pudrición de raíz en plántulas (Salerno & Lori, 2007). Además, *F. equiseti* es frecuente en suelo de ginseng (*Panax quinquefolius* L.), provocando la decoloración de la superficie de la raíz (Punja et al., 2008). En un estudio reciente, *F. equiseti*, obtenido a partir de semillas, causó necrosis foliar y marchitamiento en pacana (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) (Lazarotto et al., 2014). Por otro lado, *C. lunata* se ha aislado de semillas de plantas de importancia económica tales como arroz (Kapse, Bhale, & Jogi, 2012), trigo (Pathak & Zaidi, 2013) y sorgo (*Sorghum* spp.) (Funnell-Harris, Prom, & Pedersen, 2013). En estudios anteriores, *C. lunata* causó el deterioro de las semillas de *J. curcas* durante el almacenamiento (Srivastava, Sinha, & Srivastava, 2011). Sin embargo, hasta la fecha no hay informes sobre la presencia y posibles daños que *F. equiseti* y *C. lunata* pueden causar en semillas de *J. curcas*. Tomando en cuenta el potencial agrícola e industrial de *J. curcas*, es necesario evaluar las alternativas naturales para el control de hongos fitopatógenos que afectan este cultivo.

Efectos del quitosano en el crecimiento micelial de *F. equiseti* y *C. lunata*

Los efectos antifúngicos del quitosano en el crecimiento micelial de *F. equiseti* y *C. lunata* se muestran en el Cuadro 2. El crecimiento de micelio de los dos aislamientos

demonstrated that responses of different types of fungal cells to chitosan were different; spores were clearly more sensitive than hyphae (Palma-Guerrero, Hansson, Salinas, & López-Llorca, 2008).

Effects of chitosan on sporulation of *F. equiseti* and *C. lunata*

Sporulation is an important stage in the development of fungi. The results obtained in this study were different depending on the fungal species (Table 2). Chitosan effects on the sporulation of *F. equiseti* were concentration-dependent, and the highest effect was observed for the chitosan concentration of 4 mg·mL⁻¹. However, chitosan completely inhibited the sporulation of *C. lunata* at all concentrations tested. Therefore, *C. lunata* demonstrated greater sensitivity to chitosan than *F. equiseti*, although the sporulation of both phytopathogenic fungi was affected in its presence. Similar results were obtained for *F. oxysporum* treated with chitosan at 8 mg·mL⁻¹ (Al-Hetar et al., 2011).

Effects of chitosan on spore germination of *F. equiseti* and *C. lunata*

Spore germination of *F. equiseti* was completely inhibited in all chitosan treatments (Table 2). There were statistically significant differences ($P < 0.05$) between the *C. lunata* control and the chitosan treatments at all

fúngicos se redujo en medios suplementados con quitosano en todas las concentraciones probadas. De acuerdo con los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, todos los tratamientos (concentraciones de quitosano) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en comparación con el testigo. Las concentraciones de quitosano de 2.0 y 4.0 mg·mL⁻¹ tuvieron los mayores efectos inhibidores ($P < 0.05$) en contra de *F. equiseti* (92.0 y 98.7 %, respectivamente) y *C. lunata* (88.8 y 92.3 %, respectivamente). En estudios anteriores, los efectos antifúngicos del quitosano se demostraron en el crecimiento micelial de *Fusarium lunatum* (Ellis & Everhart) Arx, *Fusarium oxysporum* Schtdl. y *C. lunata*; sin embargo, hubo diferencias en la sensibilidad entre las especies (Flores-Flores et al., 2013). Asimismo, se demostró que las respuestas de diferentes tipos de células fúngicas al quitosano fueron distintas; las esporas fueron claramente más sensibles que las hifas (Palma-Guerrero, Hansson, Salinas, & López-Llorca, 2008).

Efectos de quitosano en la esporulación de *F. equiseti* y *C. lunata*

La esporulación es una etapa importante en el desarrollo de los hongos. Los resultados obtenidos en este estudio fueron diferentes dependiendo de las especies de hongos (Cuadro 2). Los efectos de quitosano en la esporulación de *F. equiseti* dependieron de la concentración y el

Table 2. Effect of chitosan on mycelial growth, sporulation and germination of *Fusarium equiseti* and *Curvularia lunata*.

Cuadro 2. Efecto del quitosano en el crecimiento micelial, esporulación y germinación de *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata*.

Chitosan (mg·mL ⁻¹)/ Quitosano (mg·mL ⁻¹)	Mycelial growth (%) / Crecimiento micelial (%)		Sporulation / Esporulación		Spore germination (%) / Germinación de esporas (%)	
	<i>F. equiseti</i>	<i>C. lunata</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>C. lunata</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>C. lunata</i>
			(10 ⁷ spores·mL ⁻¹) / <i>F. equiseti</i> (10 ⁷ esporas·mL ⁻¹)	(10 ⁷ spores·mL ⁻¹) / <i>C. lunata</i> (10 ⁷ esporas·mL ⁻¹)		
0	0.0a	0.0a	7.7a	2a	100a	100.0a
0.5	56.8b	48.8b	2.9bc	0b	0.0b	65.9b
1.0	56.5b	66.9c	4.3b	0b	0.0b	20.1c
2.0	92.0c	88.8d	1.1cd	0b	0.0b	0.0d
4.0	98.7c	92.3d	0d	0b	0.0b	0.0d

Different letters within columns indicate significant differences according to the Holm-Sidak method ($P < 0.05$).

Letras distintas dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con el método de Holm-Sidak ($P < 0.05$).

concentrations used, and complete inhibition of spore germination was observed at 2.0 and 4.0 mg·mL⁻¹ of chitosan. The germination of *F. equiseti* spores was more affected than that of *C. lunata*. It was demonstrated earlier that responses of different types of fungal cells to this polymer were different. For example, hyphae and spores of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. behaved differently in the presence of chitosan (Hernández-Lauzardo et al., 2008). Some authors pointed out that chitosan was transported into conidia of *F. oxysporum* through an energy-dependent process and caused an ultrastructural damage. In other cases, the germination of spores was completely inhibited by chitosan (Palma-Guerrero et al., 2008). There are no previous reports showing an effect of chitosan on spore germination of *C. lunata*. In general, the use of chitosan for inhibiting the development of phytopathogenic fungi without affecting the germination of *J. curcas* seeds would be considered a favorable alternative.

Studies on *J. curcas* seeds

The results demonstrated that chitosan did not affect seed germination (Table 3). Seed germination of *J. curcas* inoculated with *F. equiseti* and *C. lunata* was inhibited in this study by 20.0 and 26.6 %, respectively. The chitosan treatments did not show statistically significant differences, regardless of fungal inoculation. Thus, chitosan did not affect the seed germination but showed an inhibitory effect against the pathogenic activities of *F. equiseti* and *C. lunata* (Figure 2). Total inhibition of seed germination or inhibition of root growth and the oxidation process were observed in the presence of *F. equiseti*. Similar effects were caused by *Fusarium graminearum* Schwabe, on barley seeds (Yang, Svensson, & Finnie, 2011). In other reports, it was demonstrated that *A. flavus* and *R. nigricans* affected seed germination and seedling vigor of *J. curcas* (Anjorin et al., 2011). It should be noted that the above species were obtained from fungal collections and not directly from *J. curcas* seeds, and even though each inhibited germination, greater effects on seed germination were obtained when the two species were inoculated together. The presence of phytopathogenic fungi in seeds should not only be considered in terms of seed viability; it also causes changes in the content of chemical compounds such as lipids. In particular, Worang, Dharmaputra, Syarief and Miftahuddin (2008) reported that *J. curcas* seeds, when colonized by fungi during storage, showed a significant decrease in the content of lipids and an increase in the content of free fatty acids and in lipase activity. Recent studies indicated that species of the genera *Fusarium* and *Curvularia* produced significant quantities of extracellular lipases (Iftikhar et al., 2011) In particular, it was demonstrated that *F. equiseti* produced elevated levels of extracellular lipases under certain environmental conditions (Kakde & Chavan,

mayor efecto se observó en la concentración de quitosano de 4 mg·mL⁻¹; sin embargo, el quitosano inhibió completamente la esporulación de *C. lunata* en todas las concentraciones probadas. Por lo tanto, *C. lunata* demostró mayor sensibilidad al quitosano en comparación con *F. equiseti*, aunque la esporulación de ambos hongos fitopatógenos se vio afectada. Resultados similares se obtuvieron para *F. oxysporum* tratado con quitosano a 8 mg·mL⁻¹ (Al-Hetar et al., 2011).

Efectos del quitosano en la germinación de esporas de *F. equiseti* y *C. lunata*

La germinación de esporas de *F. equiseti* se inhibió completamente en todos los tratamientos de quitosano (Cuadro 2). En el caso de *C. lunata*, hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre el testigo y los tratamientos de quitosano en todas las concentraciones utilizadas; la inhibición completa de la germinación de esporas se observó con 2.0 y 4.0 mg·mL⁻¹ de quitosano. La germinación de esporas de *F. equiseti* resultó más afectada que la de *C. lunata*. Se ha demostrado anteriormente que las respuestas de diferentes tipos de células fúngicas a este polímero son distintas. Por ejemplo, las hifas y esporas de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. se comportaron de manera distinta en presencia del quitosano (Hernández-Lauzardo et al., 2008). Algunos autores señalaron que el quitosano se transportó al interior de los conidios de *F. oxysporum* a través de un proceso dependiente de energía y causó daño ultraestructural. En otros casos, la germinación de esporas fue completamente inhibida por el quitosano (Palma-Guerrero et al., 2008). Por otra parte, no existen informes previos que muestren efecto del quitosano en la germinación de esporas de *C. lunata*. En general, el uso de quitosano para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos sin afectar la germinación de semillas de *J. curcas* podría considerarse una alternativa favorable.

Estudios en semillas de *J. curcas*

Los resultados demostraron que el quitosano no afectó la germinación de semillas (Cuadro 3). La germinación de semillas de *J. curcas* inoculadas con *F. equiseti* y *C. lunata* se inhibió a 20.0 y 26.6 %, respectivamente. Los tratamientos de quitosano no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.001$), independientemente de la inoculación de hongos; por lo tanto, el quitosano no afectó la germinación de las semillas, pero mostró efecto inhibitorio contra las actividades patógenas de *F. equiseti* y *C. lunata* (Figura 2). La inhibición total de la germinación de semillas o la inhibición del crecimiento de raíz y el proceso de oxidación se observaron en presencia de *F. equiseti*. Efectos similares fueron causados por *Fusarium graminearum* Schwabe. en semillas de cebada (Yang,

Table 3. Effect of chitosan on germination of *Jatropha curcas* seeds treated with chitosan inoculated with *Fusarium equiseti* or *Curvularia lunata*.

Cuadro 3. Efecto del quitosano en la germinación de semillas de *Jatropha curcas* tratadas con quitosano e inoculadas con *Fusarium equiseti* o *Curvularia lunata*.

Treatments/Tratamientos	Germination of <i>J. curcas</i> seeds (%) / Germinación de semillas de <i>J. curcas</i> (%)
Control/Testigo	90.0 ± 1.0b
Chitosan (2.0 mg·mL ⁻¹) / Quitosano (2.0 mg·mL ⁻¹)	96.6 ± 0.5b
Chitosan (4.0 mg·mL ⁻¹) / Quitosano (4.0 mg·mL ⁻¹)	93.3 ± 0.5b
<i>F. equiseti</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / <i>F. equiseti</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	20.0 ± 1.0a
Chitosan (2.0 mg·mL ⁻¹) + <i>F. equiseti</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / Quitosano (2.0 mg·mL ⁻¹) + <i>F. equiseti</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	83.3 ± 2.0b
Chitosan (4.0 mg·mL ⁻¹) + <i>F. equiseti</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / Quitosano (4.0 mg·mL ⁻¹) + <i>F. equiseti</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	80.0 ± 1.0b
<i>C. lunata</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / <i>C. lunata</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	26.6 ± 2.5a
Chitosan (2.0 mg·mL ⁻¹) + <i>C. lunata</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / Quitosano (2.0 mg·mL ⁻¹) + <i>C. lunata</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	70.0 ± 1.0b
Chitosan (4.0 mg·mL ⁻¹) + <i>C. lunata</i> (10 ⁴ spores·mL ⁻¹) / Quitosano (4.0 mg·mL ⁻¹) + <i>C. lunata</i> (10 ⁴ esporas·mL ⁻¹)	86.6 ± 0.5b

*Different letters indicate significant differences according to the Holm-Sidak method ($P \leq 0.001$).

*Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el método de Holm-Sidak ($P \leq 0.001$).



**Figure 2. Seeds of *Jatropha curcas* without chitosan (a), treated seeds with chitosan at 2.0 mg·mL⁻¹ (b) and 4.0 mg·mL⁻¹ (c).
Figura 2. Semillas de *Jatropha curcas* sin quitosano (a), semillas tratadas con quitosano a 2.0 mg·mL⁻¹ (b) y 4.0 mg·mL⁻¹ (c).**

2011). This enzymatic activity can negatively affect biodiesel production from *J. curcas*. Therefore, it may be of significance that the treatments with chitosan (2 and 4 mg·mL⁻¹) before the fungal inoculation prevented unfavorable effects on seed germination caused by the phytopathogenic fungi. To date, there have been no reports of chitosan applications on *J. curcas* seeds. Based on the results obtained in this research, chitosan has high potential as a control agent of *F. equiseti* and *C. lunata* in *J. curcas* seeds.

Conclusions

Chitosan did not affect the seed germination of *J. curcas* but showed inhibitory effects against the pathogenic activities of *F. equiseti* and *C. lunata*.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Instituto Politécnico Nacional (IPN) of Mexico for financial support.

End of English version

References / Referencias

- Alavanja, M. R. K., Ross, M. K., & Bonner, M. R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63, 120–142. doi: 10.3322/caac.21170
- Al-Hetar, M. Y., Zainal, A. M. A., Sariah, M., & Wong, M. Y. (2011). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434–2439. doi: 10.1002/app.33455
- Al-Tawara, A. R. M., & Al-Ghzawi, A. L. A. (2013). Effect of chitosan coating on seed germination and salt tolerance of lentil (*Lens culinaris* L.). *Research on Crops*, 14(2), 489–491. Obtenido de <https://eis.hu.edu.jo/deanshipfiles/pub106215042.pdf>
- Anjorin, S. T., Omolewa, O. R., & Salako, E. A. (2011). Germinability and seedling vigour of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds inoculated with seed-borne fungi. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 2655–2659. doi: 08.5897/AJAR09.480
- Barnett, H. L., & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press.
- BLAST (2012). BLAST. Basic local alignment search tool. Consultado 04-09-2012 en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Chookhongkha, N., Sopondilok, T., & Photchanachai, S. (2013). Effect of chitosan and chitosan nanoparticles on fungal growth and chilli seed quality. *Acta Horticulturae*, 973, 231–238. Obtenido de http://www.actahort.org/books/973/973_32.htm
- Svensson, & Finnie, (2011). En otro informe, se demostró que *A. flavus* y *R. nigricans* afectaron la germinación de semillas y el vigor de las plántulas de *J. curcas* (Anjorin et al., 2011). Cabe señalar que las especies anteriores se obtuvieron a partir de colecciones de hongos y no directamente de las semillas de *J. curcas*, y aunque la germinación se inhibió, se obtuvieron mayores efectos en la germinación de semillas cuando las dos especies se inocularon juntas. La presencia de hongos fitopatógenos en semillas no debe solo considerarse en términos de viabilidad; también provoca cambios en el contenido de compuestos químicos como los lípidos. En particular, Worang, Dharmaputra, Syarief y Miftahuddin (2008) informaron que las semillas de *J. curcas*, colonizadas por hongos durante el almacenamiento, mostraron disminución significativa en el contenido de lípidos y aumento en el contenido de ácidos grasos libres y en la actividad de la lipasa. Estudios recientes indican que las especies de los géneros *Fusarium* y *Curvularia* producen cantidades significativas de lipasa extracelular (Iftikhar et al., 2011). En particular, Kakde y Chavan (2011) demostraron que *F. equiseti* produjo niveles elevados de lipasa extracelular en ciertas condiciones ambientales. Esta actividad enzimática puede afectar negativamente la producción de biodiesel a partir de *J. curcas*; por lo tanto, puede ser de importancia que los tratamientos con quitosano (2 y 4 mg·mL⁻¹), antes de la inoculación de hongos, prevengan efectos desfavorables en la germinación de semillas causada por hongos fitopatógenos. Hasta la fecha, no ha habido informes de aplicaciones de quitosano en semillas de *J. curcas*. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, el quitosano tiene alto potencial como agente de control de *F. equiseti* y *C. lunata* en semillas de *J. curcas*.

Conclusiones

El quitosano no afectó la germinación de las semillas de *J. curcas*, pero mostró efectos inhibidores contra las actividades patógenas de *F. equiseti* y *C. lunata*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México por el apoyo financiero proporcionado.

Fin de la versión en español

- Dharmaputra, O. S., Worang, R. L., Syarif, R., & Miftahudin, M. (2009). The quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seed affected by water activity and duration of storage. *Microbiology Indonesia*, 3, 139–145. Obtenido de <http://www.jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/18/15>
- Dias, L. A., Missio, R. F., & Dias, D. C. (2012). Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potential for biodiesel production. *Genetics and Molecular Research*, 11, 2719–2728. doi: 10.4238/2012.June.25.6
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- El Hadrami, A. L., Adam, R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8, 968–987. doi: 10.3390/md8040968
- Espinoza-Verduzco, M., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Espinoza-Mancillas, M. G., Chávez-Medina, J. A., Bermúdez-Alvarez, E. M., ... Leyva-López, N. E. (2012). First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34, 455–458. doi: 10.1080/07060661.2012.688770
- Flores-Flores, R., Velázquez-del Valle, M. G., León-Rodríguez, R., Flores-Moctezuma, H. E., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2013). Identification of fungal species associated to cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. *Journal of phytopathology*, 161, 544–552. doi: 10.1111/jph.12104
- Funnell-Harris, D. L., Prom, L. K., & Pedersen, J. F. (2013). Isolation and characterization of the grain mold fungi *Cochliobolus* and *Alternaria* spp. from sorghum using semiselective media and DNA sequence analyses. *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 87–96. doi: 10.1139/cjm-2012-0649
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montevalvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73, 541–547. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.12.020
- Iftikhar, T., Niaz, M., Anwer, M., Abbas, S. Q., Saleem, M., & Jabeer, R. (2011). Ecological screening of lipolytic cultures and process optimization for extracellular lipase production from fungal hyperproducer. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1343–1349. Obtenido de [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(2\)1343.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(2)1343.pdf)
- Kakde, R. B., & Chavan, A. M. (2011). Extracellular lipase enzyme production by seed-borne fungi under the influence of physical factors. *International Journal of Biology*, 3, 95–100. doi: 10.5539/ijb.v3n1p94
- Kapse, V., Bhale, M. S., & Jogi, M. (2012). Detection of seed associate mycoflora from rice. *Pestology*, 36, 52–55.
- Kumar, S., Sharma, S., Pathak, D. V., & Beniwal, J. (2011). Integrated management of jatropha root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*. *Journal of Tropical Forest Science*, 23, 35–41. Obtenido de <http://www.jatropha.pro/PDF%20bestanden/Rootrot.%20Kumar.pdf>
- Kwon, J. H., Choi, O., Kim, J., & Kwak, Y. S. (2012). First report of anthracnose disease on *Jatropha curcas* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Korea. *Journal of Phytopathology*, 160, 255–257. doi: 10.1111/j.1439-0434.2012.01890
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchander, T., Paramathma, M., & Samiyapapan, R. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 19–20. doi: 10.1071/DN09008
- Lazarotto, M., Muniz, M. F. B., dos Santos, R. F., Blume, E., Harakawa, R., & Hamann, F. A. (2014). First report of *Fusarium equiseti* associated on pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil. *Plant Disease*, 98, 847. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0976-PDN
- Leslie, J., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. London: Blackwell.
- Martinez-Herrera, J., Jimenez-Martinez, C., Martinez-Ayala, A., Garduño-Siciliano, L., Mora-Escobedo, R., Dávila-Ortiz, G., ... Becker, K. (2012). Evaluation of the nutritional quality of nontoxic kernel flour from *Jatropha curcas* L. in rats. *Journal of Food Quality*, 35, 152–158. doi: 10.1111/j.1745-4557.2011.00432.x
- Mycobank. (2012). Fungal databases nomenclature and species banks. Consultado 04-09-2012 en <http://www.mycobank.org/>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2012). Consultado 04-09-2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- Palma-Guerrero, J., Hansson, H. B., Salinas, J., & López-Llorca, J. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 541–553. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x
- Pathak, N., & Zaidi, R. K. (2013). Studies on seed-borne fungi of wheat in seed health testing programme. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46, 389–401. doi: 10.1080/03235408.2012.741978
- Punja, Z. K., Wan, A., Rahman, M., Goswami, R. S., Barasubiye, T., Seifert, K. A., & Lévesque, C. A. (2008). Growth, population dynamics, and diversity of *Fusarium equiseti* in ginseng fields. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 173–184. doi: 10.1007/s10658-007-9261-2
- Rao, C. S., Kumari, M. P., Wani, S. P., & Marimuthu, S. (2011). Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Current Science*, 100, 1547–1549. Obtenido de <http://www.ias.ac.in/currsci/25may2011/1547.pdf>
- Salerno, M. I., & Lori, G. A. (2007). Association of seed-borne *Fusarium* species on *Pinus ponderosa* with germination and seedling viability in Argentina. *Forest Pathology*, 37, 263–271. doi: 10.1111/j.1439-0329.2007.00505.x
- Systat Software Inc. (2009). SigmaPlot 11.0 program. Exact graphs and data analysis. San Jose, California, USA: Author.

- Srivastava, S., Sinha, A., & Srivastava, C. P. (2011). Screening of seed-borne mycoflora of *Jatropha curcas* L. *Research Journal of Seed Science*, 4, 94–105. doi: 10.3923/rjss.2011.94.105
- Summerell, B. A., & Leslie, J. (2011). Fifty years of *Fusarium*: How could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, 50, 135–144. doi: 10.1007/s13225-011-0132-y
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (315–332). New York, USA: Academic Press.
- Worang, L. R., Dharmaputra, O. S., Syarief, R., & Miftahuddin (2008). The quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds packed in plastic material during storage. *Biotropia*, 15, 25–36. doi: 10.11598/btb.2008.15.1.3
- Yang, F., Svensson, B., & Finnie, C. (2011). Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1362–1368. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.07.004
- Ziani, K., Ursúa, B., & Maté, J. I. (2010). Application of bioactive coating based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 29, 853–859. doi: 10.1016/j.cropro.2010.03.002