

# ***In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves**

## **Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.)**

**Isela Apolonio-Rodríguez, Omar Franco-Mora\***, Martha Lydia Salgado-Siclán, Laboratorio de Horticultura, Centro de Investigación y Estudios avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México; Campus “El Cerrillo” Toluca, México, CP. 50200; **Jesús Gaudencio Aquino-Martínez**, Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). Conjunto SEDAGRO s/n, Rancho Guadalupe - San Lorenzo. Metepec, México, CP. 52140. \*Autor para correspondencia: ofrancom@uaemex.mx.

**Recibido:** 08 de noviembre, 2016. **Aceptado:** 25 de enero, 2017.

Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O, Salgado-Siclán ML, Aquino-Martínez JG. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 170-185.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1611-1

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** Extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) (*Vitis* spp.) de tres accesiones (P-178, E-200 y TN-4) se evaluaron *in vitro* a 6, 8 y 12 % v/v con el fin de medir el efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Comparativamente, se empleó resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), extracto de cítricos (EC) (3, 5 y 8 % v/v) y cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL). En promedio, SW inhibió el crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación conidial (IGC) en 88.9, 85.5 y 93.7 %, respectivamente. RVS presentó el segundo mejor resultado.

**Abstract.** The extracts of wild grapevines (*Vitis*) leaves (EHVS) from three accessions (P-178, E-200 and TN-4) at 6, 8 and 12 % v/v, were tested *in vitro* to evaluate their inhibitory effect on *Botrytis cinerea* development. Resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), citrus extracts (EC) (3, 5 and 8 % v/v) and cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL) were compared against EHVS. In average, SW presented inhibition of mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and spore germination (IGC) (88.9; 85.5 and 93.7 %, average respectively). RVS presented the second higher inhibition rate. All EHVS presented antifungal activity; specially, P-178 at 12 % resulted in 72 % ICM, 75 % IE and 62 % IGC. This dose contained phenolic compounds 19.9 mg/mL, RVS 1.7 mg/mL, gallic acid 3.8 mg/mL and ferulic acid 2.5 mg/mL.

**Key words:** Ferulic acid, gallic acid, antifungal activity, phenolic compounds, resveratrol.

Todos los EHVS tuvieron acción inhibitoria; especialmente, P-178 al 12 % tuvo 72, 75 y 62 % de ICM, IE e IGC, respectivamente. Esta dosis tuvo 19.9 mg/mL de compuestos fenólicos, RVS 1.7 mg/mL, ácido gálico 3.8 mg/mL y ácido ferúlico 2.5 mg/mL.

**Palabras clave:** Ácido ferúlico, ácido gálico, actividad fúngica, compuestos fenólicos, resveratrol.

*Botrytis cinerea* (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*), agente causal de la pudrición gris, ataca un amplio rango de plantas en todo el mundo (Piesik *et al.*, 2015). Este hongo ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas convencionales, particularmente benzimidazoles y dicarboximidas (Panbianco *et al.*, 2015). Múltiples aplicaciones de los diferentes tratamientos de control químico en frutas y hortalizas pueden generar problemas a la salud del personal de campo agrícola y al consumidor, detención de exportaciones por residuos de plaguicidas, daños al ambiente y efectos perjudiciales a organismos benéficos para la agricultura (Yadav *et al.*, 2015). Por consiguiente, es necesario reemplazar el uso de sustancias tóxicas por alternativas naturales amigables con el ambiente y la salud humana (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

Una alternativa en el manejo integrado de enfermedades es el uso de compuestos naturales producidos por algunas plantas, a los cuales se les atribuye propiedades antifúngicas (Compean y Ynalvez, 2014). Entre estos compuestos se encuentran los isoflavonoides, diterpenoides, alcaloides, aceites esenciales, estilbenos y polipéptidos (Soylu *et al.*, 2010). Particularmente, se ha reportado que *Vitis vinifera* posee diversos compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica como miricetina, ácido elágico, kaempferol, quercitina, ácido gálico, entre otros (Schnee *et al.*, 2013). Entre los compuestos

*Botrytis cinerea* (Teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*), the causal agent of gray rot, damages a wide range of plants worldwide (Piesik *et al.*, 2015). This fungus has developed resistance to some conventional fungicides, particularly benzimidazole and dicarboximide fungicides (Panbianco *et al.*, 2015). Multiple applications of the different chemical control treatments to fruit and vegetables may cause health problems to field workers and consumers, export restrictions due to pesticide residues, damage to the environment and harmful effects on organisms beneficial to agriculture (Yadav *et al.*, 2015). Therefore, it is necessary to replace the use of toxic substances with natural ones (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

An alternative for integral plant disease management is to use natural compounds produced by some plants that have antifungal properties (Compean and Ynalvez, 2014). Among those compounds are isoflavonoids, diterpenoids, alkaloids, essential oils, stilbenes and polypeptides (Soylu *et al.*, 2010). In particular, *Vitis vinifera* has been reported to produce several compounds with antimicrobial and antifungal activity, such as myricetin, ellagic acid, kaempferol, quercetin, and gallic acid, among others (Schnee *et al.*, 2013). Within the phenolic compounds present in fruit peel extracts of a mix of three Chilean cultivars of *V. vinifera*, p-coumaric acid (98.5 µg/mL) and kaempferol (100.9 µg/mL) showed the highest antifungal activity; the phenolic extract was reported to have potential against *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013).

Also, resveratrol (RVS), a compound that was isolated for the first time from white hellebores (*Veratrum album*) and belongs to the stilbene group, has been reported as being active against different pathogenic fungi in grapevine crops, i.e. *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* and *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013).

fenólicos presentes en extractos de cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *V. vinifera* se reportó la mayor actividad antifúngica de ácido p-coumarico (98.5 µg/mL) y kaempferol (100.9 µg/mL); el extracto fenólico fue reportado con potencial contra *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013).

De la misma manera, el resveratrol (RVS), compuesto aislado por primera vez de eléboro blanco (*Veratrum album*) y perteneciente al grupo de los estilbenos, ha sido reportado como compuesto activo contra diferentes hongos fitopatógenos en el cultivo de la vid, i. e. *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* y *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Adrian y Jeandet (2012) indicaron que RVS, a 60 µg/mL, ocasionó disrupción de la membrana de los conidios de *B. cinerea*. Por otra parte, el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro* se inhibió entre 50 y 70 % por acción de RVS (Salgado *et al.*, 2015). Además, al evaluar la efectividad, de manera separada, de RVS y tres compuestos relacionados con éste, (E)-3,4,5-trimethoxy-β-(2-furyl)-estireno, (E)-4-methoxy-β-(2-furyl)-estireno y (E)-3,5-dimethoxy-β-(2-furyl)-estireno a 100 µg/mL, se logró inhibir 70 % de la germinación de conidios de *B. cinerea* (Caruso *et al.*, 2011).

En el territorio de México se reporta la presencia de más de 16 especies silvestres del género *Vitis* (Cruz, 2007). Actualmente, en la localidad de Santa Cruz, Municipio de Zumpahuacán, Estado de México, México, se tiene una colección de plantas de este género; a las cuales se les estudia sistemáticamente para incrementar su aprovechamiento. Particularmente, la hoja de las especies silvestres de vid del centro de México (*Vitis* spp.), al igual que la hojas de *V. vinifera*, presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mencionan que de RVS se pueden encontrar de 0.04 a 39.5 µg/g de peso fresco; además, determinaron la existencia de

Adrian and Jeandet (2012) reported that RVS, at 60 µg/mL, ruptured the membrane of *B. cinerea* conidia. On the other hand, micelial growth of *B. cinerea in vitro* was inhibited between 50 and 70 % by the action of RVS (Salgado *et al.*, 2015). Also, when individually assessing the effectiveness of RVS and three RVS-related compounds, (E)-3,4,5-trimethoxy-β-(2-furyl)-styrene, (E)-4-methoxy-β-(2-furyl)-styrene and (E)-3,5-dimethoxy-β-(2-furyl)-styrene at 100 µg/mL, 70 % of *B. cinerea* conidia germination was inhibited (Caruso *et al.*, 2011).

Over 16 wild species of the genus *Vitis* have been reported to be present in Mexico (Cruz, 2007). Today, there is a collection of plants of this genus in Santa Cruz, municipality of Zumpahuacán, State of Mexico. These plants are being systematically studied to enhance their use. In particular, the leaves of wild grapevines (*Vitis* spp.) from central Mexico, as well as leaves of *V. vinifera*, contain significant amounts of phenolic compounds (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mentioned that they found RVS from 0.04 to 39.5 µg/g fresh weight of leaves; the authors also found the presence of gallic acid, rutin and caffeic acid. Given that the presence of phenolic compounds in wild grapevine indicates their potential as a natural control agent for plant diseases, in this study we evaluated their *in vitro* antifungal activity against *B. cinerea* using extracts of fresh leaves of wild grapevine accessions P-178, E-200 and TN-4.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal isolate

Bell peppers (*Capsicum annuum*) showing gray rot were collected at the Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho

ácido gálico, rutín y ácido caféico. Debido a que la presencia de compuestos fenólicos en hojas de vid silvestre indica su potencial como agente de control natural de enfermedades en vegetales, en el presente trabajo se evaluó *in vitro* la actividad antifúngica contra *B. cinerea* de extractos de hojas frescas de las accesiones de vid silvestre P-178, E-200 y TN-4.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa fúngica

Se colectaron frutos de pimiento morrón (*Cap-sicum annuum*) con síntomas de pudrición gris, en el Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho El Islote”, del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), localizado en Villa Guerrero, Estado de México a 18° 58' 04" latitud norte y 99° 39' 21" longitud oeste. Posteriormente, en el Laboratorio de Fitopatología del ICAMEX se tomaron fragmentos de aproximadamente 5 × 5 mm de tejido de los frutos enfermos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo avena-agar (MCAvA) acidificado, con ácido láctico al 25 % (v/v), a pH 4.5 y se incubaron a 26±2 °C durante 8 días. Posteriormente, usando la técnica de punta de hifa, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con MCAvA, con la finalidad de obtener una cepa pura del hongo. Para comprobar la patogenicidad de los aislamientos se inocularon frutos sanos de fresa (*Fragaria × ananassa*) cv. Festival, previamente desinfectados como se describió anteriormente. A los frutos se les ocasionaron tres heridas, de aproximadamente 2 mm de diámetro por 2 mm de profundidad, con agujas de

El Islote” of the Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), in Villa Guerrero, State of Mexico, at 18° 58' 04" North latitude and 99° 39' 21" West longitude. Then, at ICAMEX's Laboratory of Phytopathology, tissue fragments, measuring approximately 5 × 5 mm, were taken from the diseased bell peppers and disinfected with 1 % (v/v) sodium hypochlorite for 3 min; they were rinsed three times with sterile distilled water, and transferred to Petri dishes containing acidified at pH 4.5, with 25 % (v/v) lactic acid, oat-agar culture medium (MCAvA), and, then, incubated at 26±2 °C for 8 days. Later, using the hyphal tip technique, a portion of mycelial tissue was transferred to another Petri dish containing MCAvA to obtain a pure isolate of the fungus. To confirm the isolates' pathogenicity, we inoculated healthy (*Fragaria × ananassa*) cv. Festival strawberries that had been previously disinfected as described earlier. Three perforations measuring approximately 2 mm in diameter × 2 mm deep were made on the strawberries using previously sterilized dissection needles. The perforations were filled with 20 µL of a suspension of 1×10<sup>6</sup> conidia per millimeter. Once the typical symptoms of gray rot appeared, the fungus was identified by comparing the morphological structures observed (mycelium type and color, septation, conidiophores, conidiophore branching, conidia length and width) using the Barnett and Hunter keys (1998). The specialized descriptions by Ellis (1971) and Crous *et al.* (2007) were used to determine the species.

Samples of the fungus were also sent to the Laboratory of Phytosanitary Diagnosis of Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, where they were molecularly analyzed. The ITS sequence obtained from the fungus was compared to sequences of the most similar reference organisms through a search in the BLAST database of

disección previamente esterilizadas. En dichas heridas se depositaron 20 µL de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios por mililitro. Una vez que se observaron los síntomas típicos de pudrición gris, se procedió a la identificación del hongo comparando las estructuras morfológicas observadas (tipo y color de micelio, septación, conidióforos, ramificación de conidióforos, largo y ancho de conidios) con las claves de Barnett y Hunter (1998); mientras que para la determinación de la especie se emplearon las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2007).

Adicionalmente, se enviaron muestras del hongo al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, en donde se analizaron molecularmente. La secuencia ITS obtenida del hongo se comparó con secuencias de organismos referencia con mayor similitud, por medio de una búsqueda en la base de datos BLAST del GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Una vez comprobada la especie, el hongo fue cultivado para realizar las pruebas del presente experimento.

### Obtención de extractos vegetales

Se obtuvieron hojas sanas y uniformes en tamaño y color (Franco *et al.*, 2012) de tres accesiones de vid silvestre: (1) E-200, originaria de Tejupilco, Estado de México, (2) TN-4, originaria de Tenancingo, Estado de México y (3) P-178, originaria de Hueytamalco, Puebla; todas ellas establecidas en el banco de germoplasma de vid silvestre de Zumpahuacán, México. El tejido vegetal se trasladó al Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México; en donde se maceraron 200 g de hojas por accesión en 250 mL de metanol al 99 %; esta mezcla se dejó en reposo en oscuridad durante una semana. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró en un

GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Once the species was confirmed, the fungus was grown to perform the tests of this experiment.

### Obtaining vegetable extracts

Healthy leaves of uniform size and color were obtained (Franco *et al.*, 2012) from three wild grapevine accessions: (1) E-200, from Tejupilco, State of Mexico, (2) TN-4, from Tenancingo, State of Mexico, and (3) P-178, from Hueytamalco, Puebla; all the accessions were grown at the wild grapevine germplasm bank in Zumpahuacán, Mexico. The vegetable tissue was moved to the Laboratory of Horticulture of the Universidad Autónoma del Estado de México, in Toluca, State of Mexico, where 200 g of leaves per accession were macerated in 250 mL of 99 % methanol; these mixtures were left standing in darkness for a week. Afterwards, the extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator until 50 mL of stock solution free of the extraction solvent was obtained. The extracts were poured into amber glass jars and placed in cold storage (4 °C) for conservation.

### Identification of polyphenols

Using gallic acid as a standard, the total amount of phenols contained in extracts of wild grapevine leaves (EHVS) was determined using the method of Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009) at 760 nm on a spectrophotometer. The result was expressed in gallic acid equivalents (EAG). Some polyphenolic compounds of EHVS of each individual accession were identified using an HPLC Shimadzu isocratic pump (serial 42205) and a reversed-phase Spherisorb C18  $1 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$  column (Waters, USA). For the mobile phase we used

rotavapor, hasta tener 50 mL de la solución madre libre del solvente de extracción. Los extractos se envasaron en un frasco ámbar y se colocaron en refrigeración (4 °C) para su conservación.

### Identificación de polifenoles

Empleando como estándar ácido gálico, se determinó el contenido de fenoles totales en los extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) con el método Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009), a 760 nm en un espectrofotómetro; se expresó el resultado en equivalentes de ácido gálico (EAG). La identificación de algunos compuestos polifenólicos de los EHVS de cada accesión se realizó con un HPLC Shimadzu bomba isocrática (serie 42205), empleando una columna Spherisorb fase reversa C18 1 µm × 250 mm × 4.6 mm (Waters, USA). Como fase móvil se usó agua: acetonitrilo: ácido acético (70:29.9:0.1). El nivel de flujo fue 1 mL min<sup>-1</sup> permitiendo cinco minutos de estabilización entre cada muestra. La señal fue monitoreada a 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Las muestras fueron inyectadas por triplicado en el sistema cromatográfico; cuantificando los compuestos detectados por el método de estándar interno.

### Actividad antifúngica

En matraces con MCAvA a pH 4.5, sin solidificar, se vertieron las cantidades correspondientes (Cuadro 1) de los EHVS de cada una de las tres accesiones, resveratrol (RVS) (Sigma), extracto de cítricos (EC) (Tecnosafe), cyprodinil+ fludioxonil (funguicida Switch® 62.5 WG) (SW), además como testigo absoluto (TA) se tuvo MCAvA sin ningún ingrediente adicional.

De cada EHVS se tomaron 6, 8 y 12 mL para aforar a 100 mL de MCAvA a pH 4.5. Cada solución se vació en cajas de Petri debidamente

water: acetonitrile: acetic acid (70:29.9:0.1). The flow level was 1 mL min<sup>-1</sup> and we allowed a five-minute stabilization interval between each sample. The signal was monitored at 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). The samples were injected three times in the chromatographic system and the compounds detected using the standard internal method were quantified.

### Antifungal activity

The respective amounts (Table 1) of the EHVS of each accession, resveratrol (RVS) (Sigma), citric extract (EC) (Tecnosafe), and cyprodinil+ fludioxonil (fungicide Switch® 62.5 WG) (SW) were poured into flasks containing unsolidified MCAvA (pH 4.5); MCAvA with no ingredients added was used as the absolute tester (TA).

From each EHVS, we took 6, 8 and 12 mL for dilution at 100 mL of MCAvA at pH 4.5. Each solution was poured into properly labeled Petri dishes and allowed to solidify. Treatments with RVS (60, 90 and 120 µg/mL), EC (3, 5 and 8 % (v/v)) and SW (500, 800 and 1000 µg/mL) were prepared in the same way, using RVS diluted in: methanol 1:1, SW in distilled water, while EC was used in its liquid commercial form. Each of the 19 treatments were repeated four times using three Petri dishes per replication; each of the Petri dishes was an experimental unit. The experiment was performed twice, and because of the similarity of both results, the statistical analysis included in this report corresponds to only one experiment.

Later, a disk 5 mm in diameter of MCAvA with 5-day old active *B. cinerea* mycelium was placed in the middle of each Petri dish containing MCAvA and its corresponding treatment. The dishes were incubated at 26±2 °C and the diameter of each *B. cinerea* colony was measured every 48 h using a digital Vernier caliper. Measurement of each

**Cuadro 1. Concentración de compuestos fenólicos en medio de cultivo avena agar adicionado con extractos de hoja de vid silvestre (*Vitis* spp.).**

**Table 1. Concentration of phenolic compounds in oat-agar adding extracts of leaves of wild grapevine (*Vitis* spp).**

Extracto de hoja de vid silvestre	Concentración (%; v/v)	Fenoles totales (EAG)	Concentración (mg/mL)		
			Ácido gálico	Ácido ferúlico	resveratrol
P-178	6	20.8 d	1.9 c	1.2 c	0.9 c
	8	27.7 c	2.5 b	1.7 b	1.1 b
	12	41.4 a	3.8 a	2.5 a	1.7 a
E-200	6	13.9 e	1.9 c	1.3 c	
	8	18.5 d	2.5 bc	1.6 b	
	12	26.7 c	3.6 a	2.3 ab	
TN-4	6	18.6 d	1.5 d	1.1 d	
	8	24.5 c	1.9 c	1.4 c	
	12	35.4 b	2.8 b	2.5 a	

EAG: Equivalentes de ácido gálico. Los datos son la media de tres repeticiones; valores con letra diferente presentan diferencia estadística a  $P \leq 0.05$  / EAG: Equivalentents of gallic acid. Data are the average of three replications; values with the same letter show a statistical difference at  $P \leq 0.05$ .

etiquetadas y se dejó solidificar. Los tratamientos con RVS (60, 90 y 120  $\mu\text{g/mL}$ ), EC (3, 5 y 8 % (v/v)) y SW (500, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) se prepararon de la misma manera, empleando RVS disuelto en agua: metanol 1:1, SW en agua destilada, mientras que EC se empleó en su forma comercial líquida. Para cada uno de los 19 tratamientos se realizaron cuatro repeticiones, con tres cajas de Petri por repetición, siendo cada caja de Petri una unidad experimental. El experimento se realizó por duplicado, debido a la similitud de ambos resultados, el análisis estadístico presentado en este reporte corresponde a uno solo de los experimentos.

Posteriormente, se colocó, en el centro de cada una de las cajas de Petri con MCAvA y su respectivo tratamiento, un disco de 5 mm de diámetro de MCAvA con micelio activo de *B. cinerea* de 5 días de edad. Las cajas se incubaron a  $26 \pm 2$  °C y el diámetro de la colonia de *B. cinerea* se midió cada 48 h con ayuda de un vernier digital. Para cada repetición, las mediciones concluyeron cuando la superficie del MCAvA en todas las cajas del TA fue cubierta totalmente por el micelio. Los valores medios del crecimiento micelial fueron transformados

replicación ended when the surface of MCAvA in all the TA dishes was completely covered by mycelium. Average values of mycelium growth were converted to percentage inhibition of mycelial growth compared (ICM) to TA by applying the formula:  $\text{ICM} (\%) = [(d\text{Ta} - dt)/d\text{Ta} (\text{ICM})] \times 100$ , where dTa and dt denote the diameter of the mycelium growth of TA and of each of the other treatments, respectively (Soylu *et al.*, 2010). The Petri dishes within the incubator were arranged in a completely randomized design.

At the end of the experiment, MCAvA spores were collected from each treatment using a glass rod and sterile distilled water. For each previously described experimental unit, an aliquot of the suspension containing conidia was taken and transferred to a Neubauer chamber to count the conidia following the methodology of Moo-Koh *et al.* (2014). Data were converted to percentages, and the results were reported as inhibition of sporulation (IE) following the formula:  $\text{IE} (\%) = [(E\text{Ta} - E\text{t})/E\text{Ta}] \times 100$ , where ETa and Et denote the number of conidia in TA and in each of the remaining treatments, respectively (Soylu *et al.*, 2010).

a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) en relación con el TA utilizando la fórmula:  $ICM (\%) = [(dT_a - dt)/dT_a (ICM)] \times 100$ , donde  $dT_a$  y  $dt$  representan el diámetro del crecimiento micelial del TA y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar.

Al final del experimento, de cada tratamiento se obtuvieron esporas del MCAvA con ayuda de una varilla de vidrio y agua destilada estéril. Por cada unidad experimental previamente descrita, se tomó una alícuota de la suspensión con conidios y fue transferida a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de los conidios de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014). Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como inhibición de la esporulación (IE) siguiendo la fórmula:  $IE (\%) = [(ET_a - Et)/ET_a] \times 100$ , donde  $ET_a$  y  $Et$  representan el número de conidios en el TA y en cada uno de los tratamientos restantes, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010).

Por otro lado, a partir de un cultivo esporulado (8 días de edad), se preparó una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios por mililitro en agua destilada estéril. Se colocaron 200  $\mu$ L de esta suspensión en cajas de Petri con MCAvA suplementadas con las diferentes dosis de cada uno de los 19 tratamientos. Al final de un periodo de 48 h de incubación a  $22 \pm 2$  °C, se evaluó la germinación de 100 conidios ubicados de manera aleatoria. Se consideró germinado cuando el largo del tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño del diámetro del conidio. El porcentaje de inhibición de la germinación (IGC) se determinó mediante la fórmula empleada por Soyly *et al.* (2010):  $IGC (\%) = [(GT_a - Gt)/GT_a] \times 100$ , donde  $GT_a$  y  $Gt$  representan el número de conidios germinados en el TA y en cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente. El diseño experimental

On the other hand, using a sporulated culture medium (8 days old), a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia per milliliter was prepared in sterile distilled water. Two hundred microliters of the suspension were poured in Petri dishes with MCAvA supplemented with the different doses of each of the 19 treatments. After 48 h of incubation at  $22 \pm 2$  °C, germination of 100 randomly placed conidia was evaluated. The conidia were considered germinated when the length of the germ tube was equal to or greater than the diameter of the conidium. The percentage of spore germination inhibition (IGC) was determined with the formula used by Soyly *et al.* (2010):  $IGC (\%) = [(GT_a - Gt)/GT_a] \times 100$ , where  $GT_a$  and  $Gt$  denote the number of germinated conidia in TA and in each of the other treatments, respectively. The experimental design and number of replications per treatment were the same ones used for mycelium growth.

### Statistical analysis

ICM, IE and IGC percentages were converted to  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ . The data were processed through analysis of variance of a complete randomized design with a single factor, and when significance was found, we compared the means using Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ); all analysis were performed with the SAS® statistical software (SAS Institute, 2002).

## RESULTS

### Morphological-molecular identification.

Four days after inoculation with *Botrytis* sp., all strawberries showed symptoms of gray rot, as well as abundant fungal sporulation (Figure 1A). On the other hand, in MCAvA, colonies showed



y el número de repeticiones por tratamiento fue el mismo del trabajo de crecimiento micelial.

### Análisis estadístico

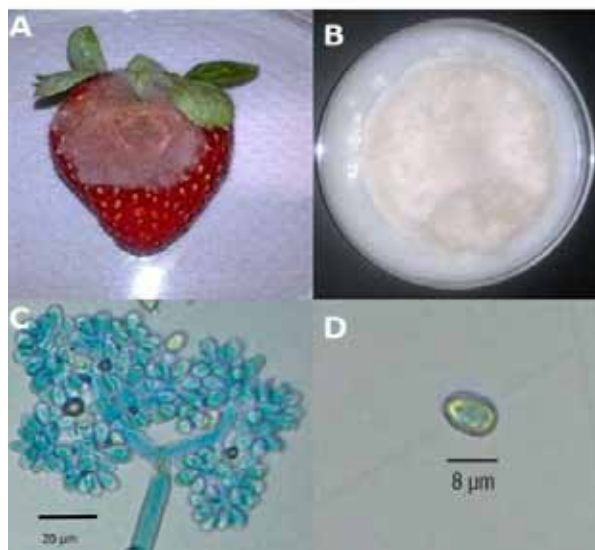
Los datos de porcentajes de ICM, IE e IGC se transformaron a  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ . Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza de bloques completamente al azar con un factor y en caso de significancia se procedió a la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS

### Identificación morfológico-molecular

Cuatro días después de la inoculación con *Botrytis* sp., todos los frutos de fresa mostraron síntomas de pudrición gris, además de abundante esporulación del hongo (Figura 1A). Por otra parte, en el MCAvA las colonias exhibieron crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color blanco y siete días después, el micelio se tornó de color gris (Figura 1B). Bajo microscopía de luz, se observaron conidióforos largos, septados, pigmentados, con pared lisa, ramificados apicalmente y con racimos de conidios (Figura 1C). Los conidios fueron unicelulares, ovoides, lisos, hialinos y de  $8-15 \times 6-9 \mu\text{m}$  (Figura 1D). Todas las características observadas correspondieron a *B. cinerea* de acuerdo con la descripción de Ellis (1971). Por otro lado, la comparación en el BLAST de la secuencia mostró 100 % de similitud con la secuencia KR055051. Basado en características morfológicas y moleculares se confirmó que el agente causal de la pudrición gris del pimiento morrón en el CITT “Rancho el Islote” del ICAMEX es *Botrytis cinerea*.

white concentric mycelium growth of velvety consistency; seven days later, the mycelium turned gray (Figure 1B). Under a light microscope, we observed long, septate, pigmented conidia with smooth walls, apically branched and with bunches of conidia (Figure 1C). The conidia were unicellular, ovoid, smooth, hyaline, and measured  $8-15 \times 6-9 \mu\text{m}$  (Figure 1D). All the features observed corresponded to *B. cinerea*, as described by Ellis (1971). On the other hand, when we compared the sequence in BLAST, it was 100 % similar to the KR055051 sequence. Based on the morphological and molecular features, we confirmed that the causal agent of gray rot on the bell pepper at CITT “Rancho el Islote” of ICAMEX is *Botrytis cinerea*.



**Figura 1.** Aislado de *Botrytis cinerea* obtenido a partir de frutos de *Capsicum annuum*. A) Síntomas de pudrición gris en fruto de fresa. B). Colonia de 4 días de edad cultivada en medio avena agar. C) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios; D) conidio de *Botrytis cinerea*.

**Figure 1.** Isolate of *Botrytis cinerea* from *Capsicum annuum* fruits. A) Symptoms of gray rot in strawberry fruits. B). Four-day old colony cultivated in oat-agar. C) Branched tip of a conidiophore with conidia bunches; D) *Botrytis cinerea* conidia.

## Compuestos fenólicos

En los EHVS de las tres accesiones se determinó la presencia de ácido gálico y ácido ferúlico, mientras que en P-178 se determinó la presencia de resveratrol. Al aumentar la cantidad de EHVS por mililitro de MCAvA, se incrementó la concentración de los diversos fenoles indicados (Cuadro 1).

## Actividad antifúngica

Todas las concentraciones de EHVS de las tres accesiones presentaron ICM. P-178 12 % presentó mayor ICM, superior al 70 % en relación a TA. SW a sus dos dosis más altas presentó 90 % de ICM, mientras que, de manera general, la ICM por RVS grado reactivo se ubicó entre SW y los EHVS. El EC inhibió no más de 25 % el crecimiento del micelio (Cuadro 2, Figura 2). La mayor IE se presentó con SW, seguida de RVS; mientras que el porcentaje de los EHVS fue entre 53 a 75 %, en relación al TA.

Por otro lado, todos los tratamientos presentaron IGC. SW, en sus tres dosis, inhibió más del 90 %, seguido de RVS, cuyo promedio de las tres dosis fue de 64 %. La mayor IGC de un EHVS fue observada en P-178 12 % cuyo porcentaje fue superior a 60 %, en relación al TA.

## DISCUSIÓN

La mayor concentración de ácido gálico, ácido ferúlico y RVS en los EHVS de P-178 en relación a E-200 y TN-4 está relacionado con la variabilidad en la presencia y concentración de polifenoles en hojas de distintas accesiones de vid silvestre de México; identificando a los factores genético, ambiental y genético-ambiental como los responsables de esta variabilidad (Katalinić *et al.*, 2009;

## Phenolic compounds

We found gallic and ferulic acids in the EHVS of the three accessions, and resveratrol in P-178. When the amount of EHVS per millimeter of MCAvA increased, the concentration of the different phenols increased (Table 1).

## Antifungal activity

All the concentrations of EHVS of the three accessions showed ICM. Accession P-178 12 % showed higher ICM, 70 % higher than TA. SW at its two highest doses showed 90 % of ICM, while the ICM per RVS reactive grade was between SW and EHVS. EC inhibited no more than 25 % of mycelium growth (Table 2, Figure 2). SW had the highest IE, followed by RVS; the percentage of the EHVS was 53 to 75 % compared to TA.

On the other hand, all the treatments showed IGC. The three doses of SW inhibited more than 90 %, followed by RVS, whose average of the three doses was 64 %. The highest IGC of an EHVS was observed in P-178 12 %, whose percentage was higher than 60 % in relation to TA.

## DISCUSSION

The highest concentration of gallic acid, ferulic acid and RVS in the EHVS of P-178 compared to E-200 and TN-4 may be related to the variability in the presence and concentration of polyphenols in leaves of different Mexican wild grapevine accessions; genetic, environmental and genetic-environmental factors have been identified as causing this variability (Katalinić *et al.*, 2009; Tobar-Reyes *et al.*, 2011). This study suggests that the difference among the accessions in the total content of phenolic compounds, and especially of the three phenols

**Cuadro 2. Actividad inhibitoria de diferentes tratamientos sobre crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación de la espora (IGC) de *Botrytis cinerea* in vitro.**

**Table 2. Inhibitory activity of different treatments on *in vitro* mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and spore germination (IGC) of *Botrytis cinerea*.**

Tratamiento	ICM (%)	IE (%)	IGC (%)	
Extracto de hoja de vid silvestre accesión P-178	6 % (v/v)	45.1 ± 3.8 f	55.9 ± 3.8 e	41.2 ± 4.6 f
	8 % (v/v)	52.5 ± 3.1 e	53.5 ± 3.1 e	41.3 ± 3.4 d
	12 % (v/v)	72.0 ± 2.2 c	75.3 ± 2.2 c	61.8 ± 1.9 c
Extracto de hoja de vid silvestre accesión E-200	6 % (v/v)	34.8 ± 2.3 g	54.7 ± 11 e	34.5 ± 4.1 ef
	8 % (v/v)	37.7 ± 1.2 g	60.6 ± 0.6 d	35.3 ± 2.1 ed
	12 % (v/v)	55.8 ± 2.4 e	61.2 ± 0.4 d	37.7 ± 6.1 g
Extracto de hoja de vid silvestre accesión TN-4	6 % (v/v)	27.5 ± 1.2 h	53.5 ± 2.3 e	34.9 ± 7.5 ef
	8 % (v/v)	35.0 ± 3.5 g	55.9 ± 0.5 e	33.3 ± 3.5 ef
	12 % (v/v)	47.9 ± 1.8 f	60.0 ± 2.4 d	35.7 ± 1.3 ed
Extracto de cítricos	3 % (v/v)	24.7 ± 3.8 h	27.1 ± 1.1 f	20.4 ± 2.3 g
	5 % (v/v)	25.3 ± 3.5 h	27.6 ± 5.1 f	28.9 ± 4.1 f
	8 % (v/v)	27.2 ± 3.8 h	24.1 ± 1.3 f	33.3 ± 2.8 ef
Resveratrol	60 µg/mL	62.2 ± 2.1 d	77.6 ± 0.7 b	59.8 ± 5.9 c
	90 µg/mL	64.0 ± 2.7 d	78.2 ± 0.6 b	63.6 ± 4.9 c
	120 µg/mL	72.9 ± 1.9 c	82.9 ± 0.5 a	70.2 ± 5.9 b
Switch (cyprodinil+fludioxinil)	500 µg/mL	85.7 ± 3.4 b	85.3 ± 0.6 a	91.4 ± 3.4 a
	800 µg/mL	89.8 ± 3.5 ab	84.7 ± 0.6 a	93.0 ± 3.5 a
	1000 µg/mL	91.4 ± 3.2 a	86.5 ± 0.3 a	96.6 ± 2.8 a
Testigo absoluto	0	0 ± 0 i	0 ± 0 g	0 ± 0 h

Los datos son la media ± EE de cuatro repeticiones, tres cajas de Petri por repetición. Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentan diferencia significativas con la prueba de Tukey a  $P \leq 0.05$  / Data are the average ± SE of four replications, three Petri dishes per replication. Averages followed by the same letter in each column show no significant difference using Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .

Tobar-Reyes *et al.*, 2011). En este trabajo, se sugiere que la diferencia entre accesiones en el contenido total de compuestos fenólicos y particular de los tres fenoles identificados, es debida principalmente a la genética, ya que los tejidos vegetales de las tres accesiones provinieron de un mismo banco de germoplasma.

El efecto inhibitorio del desarrollo de *B. cinerea* de los EHVS empleados puede deberse a la presencia de ácido gálico, ferúlico y resveratrol, polifenoles que han mostrado propiedades antifúngicas (Katalinić *et al.*, 2009; Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). Vio-Michaelis *et al.* (2012), indicaron la presencia de ácido ferúlico en los extractos etanólicos de dos especies vegetales que poseen potencial para el control de *B. cinerea*; mientras

identified, is mainly the result of genetics, as the plant tissues of the three accesions came from the same germplasm bank.

The inhibitory effect of the development of *B. cinerea* by the EHVS used may have been caused by the presence of gallic acid, ferulic acid and resveratrol, three polyphenols that have shown antifungal properties (Katalinić *et al.*, 2009; Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). Vio-Michaelis *et al.* (2012) reported the presence of ferulic acid in the ethanolic extracts of two plant species that have the potential to control *B. cinerea*, while the application of gallic acid to an *in vitro* system showed less *B. cinerea* development (Mendoza *et al.*, 2013). Thus, the higher ICM, IE and IGC of EHVS P-178 12 % compared with the other EHVS may

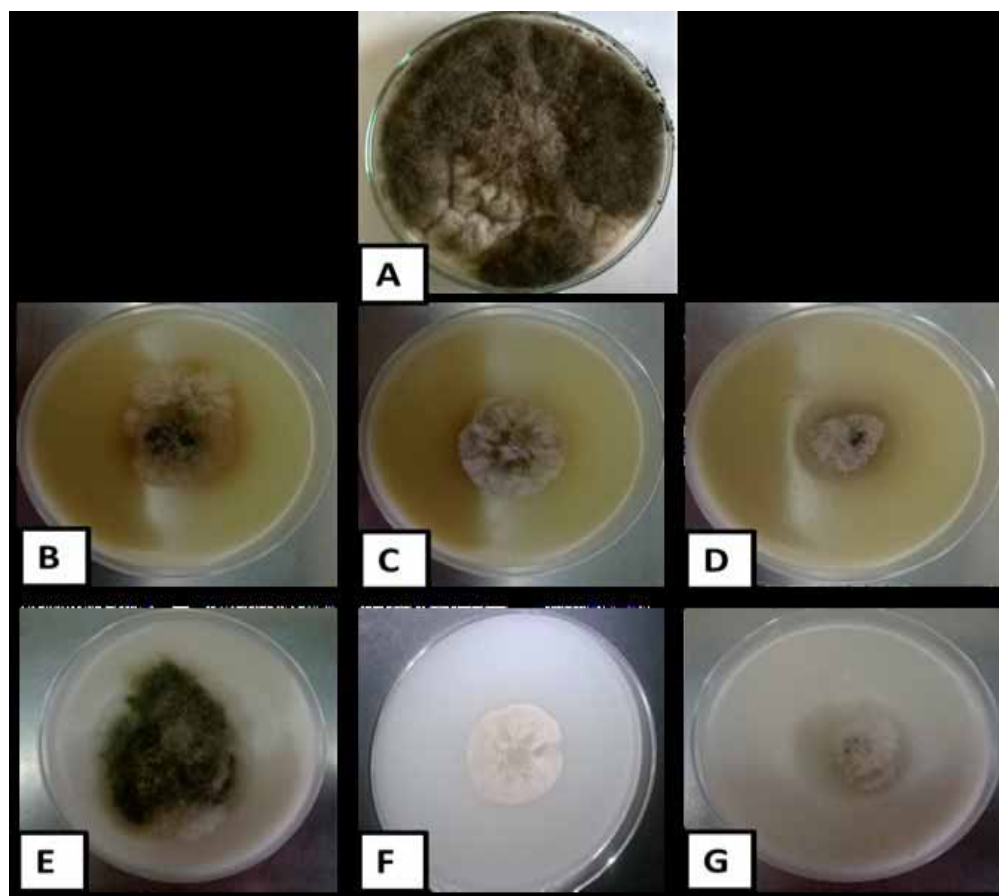


Figura 2. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en medio avena agar a los 8 días de la inoculación a  $26\pm 2$  °C A: testigo absoluto; B: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre (*Vitis* spp.) E-200 12 % (v/v); C: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre TN-4 12 % (v/v); D: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre P-178 12 % (v/v); E: extracto de cítricos 8 % (v/v); F: resveratrol 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; G: cyprodinil + fludioxonil 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Figure 2. Development of *Botrytis cinerea* in oat-agar 8 days after inoculation at  $26\pm 2$  °C A: absolute tester; B: extract of leaves of the wild grapevine accession E-200 12 % (v/v) (*Vitis* spp.); C: extract of leaves of the wild grapevine accession TN-4 12 % (v/v); D: extract of leaves of the wild grapevine accession P-178 12 % (v/v); E: citrus extract 8 % (v/v); F: resveratrol 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; G: cyprodinil + fludioxonil 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

que la aplicación de ácido gálico a un sistema *in vitro* implicó menor desarrollo de *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). Así, la mayor ICM, IE e IGC de EHVS P-178 12 % en comparación al resto de los EHVS puede estar relacionada tanto por la presencia, determinada y potencial, de más compuestos fenólicos, como por la mayor concentración de los mismos en relación a TN-4 y E-200. La elucidación completa de los polifenoles presentes en los EHVS

be related both to the real and potential presence of more phenolic compounds and to a higher concentration of phenolic compounds compared to TN-4 and E-200. Identifying all the polyphenols present in the EHVS and each compound's particular antifungal activity is a subject for further scientific study.

While the ICM, IE and IGC of P-178 12 % were lower than those of SW and RVS, the antifungal

y la actividad antifúngica particular de cada compuesto es una actividad científica a desarrollar.

Si bien la ICM, IE e IGC por P-178 12 % fue inferior a lo observado con SW y RVS, la actividad antifúngica de este extracto es importante por ser superior a 70 % para ICM e IE y superior a 60 % de IGC. En este sentido, la ICM es similar a la reportada por El- Kateeb *et al.* (2013) con extractos metanólicos al 0.4 % de hojas de *V. vinifera* 'Thompson seedless' y 'Flame seedless' (entre 63 y 72 %). Particularmente, el modo de acción de los polifenoles contra *B. cinerea* no ha sido totalmente explicado, pero se ha sugerido que actúan sobre la membrana citoplasmática, produciendo cambios en su permeabilidad, ocasionando liberación del contenido celular, coagulación del material citoplasmático y desorganización de organelos y membrana celular, todo ello inhibe el desarrollo del micelio y evita su esporulación (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha indicado que polifenoles del tipo ácido 3b-hydroxy-kaurenoico están involucrados con reducción en la germinación de *B. cinerea* (Cotoras *et al.*, 2011).

La concentración de RVS en el MCAvA con EHVS P-178, a cualquier dosis, fue superior a la obtenida con la adición de cualquiera de los tratamientos con RVS grado reactivo, pero el efecto antifúngico de los EHVS fue menor. Estos resultados pueden deberse a lo reportado por Guerrero *et al.* (2010), indicando que entre los compuestos fenólicos presentes en un extracto vegetal existen interacciones sinérgicas y/o antagónicas, las cuales pueden modificar su efecto antifúngico. A pesar del menor control *in vitro* de *B. cinerea* con EHVS en relación a SW, RVS grado reactivo e incluso otros extractos vegetales reportados en la literatura i.e. extractos de *Citrus paradisi* (Xu *et al.*, 2007); este trabajo indica el potencial de los EHVS de México como reductores de la dispersión e infección efectiva de *B. cinerea*, hongo causante de graves pérdidas económicas en diversos cultivos (Piesik *et al.*,

activity of this extract is important because it is higher than 70 % for ICM and IE, and higher than 60 % for IGC. In this sense, the ICM is similar to the ICM reported by El- Kateeb *et al.* (2013) using 0.4 % methanolic extracts of leaves of *V. vinifera* 'Thompson seedless' and 'Flame seedless' (63 to 72 %). In particular, the action mode of polyphenols against *B. cinerea* has not been fully explained, but it has been suggested that they act upon the cytoplasmic membrane and change its permeability causing the cell content to be released, the cytoplasmic material to coagulate and the organelles and cell membrane to become disorganized. All this inhibits the development of mycelium and prevents sporulation (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015). It has been suggested that polyphenols of the type 3b-hydroxy-kaurenoic acid are involved in the reduction of *B. cinerea* spores germination (Cotoras *et al.*, 2011).

The concentration of RVS in MCAvA with EHVS P-178, at any dose, was higher than that obtained by adding any of the treatments with reactive grade RVS, but the antifungal effect of the EHVS was lower. These results may be due to results reported by Guerrero *et al.* (2010) who suggest that among the phenolic compounds present in a plant extract there are synergistic and/or antagonistic interactions that may modify their antifungal effect. In spite of the lower control *in vitro* of *B. cinerea* with EHVS in relation to SW, reactive grade RVS and other plant extracts reported in literature, i.e., extracts of *Citrus paradisi* (Xu *et al.*, 2007), this study indicates the potential of Mexican EHVS as reducers of the effective spread and infection of *B. cinerea*, a fungus that causes serious economic losses in different crops (Piesik *et al.*, 2005). The widespread presence of wild grapevine in Mexico and its low cost are other factors that also contribute to the interest in fully identifying the phenols present in EHVS and their particular effect on the studied fungus.

2005). La amplia presencia de la vid silvestre en México y su bajo costo de adquisición son factores que también contribuyen al interés de identificar completamente a los polifenoles presentes en los EHVS y su efecto particular contra el hongo en estudio.

## CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de hojas tres accesiones de vid silvestre (*Vitis* spp.) mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra *B. cinerea*; particularmente, el extracto de hojas de la accesión P-178 12 % inhibió 70 % el crecimiento micelial, 75 % la esporulación y 61 % la germinación de esporas, siempre en relación al testigo absoluto. Se detectó resveratrol, ácido gálico y ácido ferúlico en los extractos de dicha accesión y se sugiere la participación de estos fenoles contra *Botrytis cinerea*. Resveratrol grado reactivo produjo mejor control del hongo que los extractos de hoja de vid silvestre; generalmente, cualquier dosis de ambos, extracto de hoja de vid silvestre y resveratrol grado reactivo, no superaron la actividad antifúngica de cyprodinil + fludioxonil.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por el financiamiento de los estudios de postgrado de Isela Apolonio-Rodríguez y al ICAMEX por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental.

## LITERATURA CITADA

Adrian M and Jeandet P. 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83:1345-1350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.004>

## CONCLUSIONS

The methanolic extracts of leaves of three wild grapevine (*Vitis* spp.) accessions showed *in vitro* antifungal activity against *B. cinerea*; in particular, the extract of leaves of accession P-178 12 % inhibited mycelial growth by 70 %, sporulation by 75 % and spore germination by 61 %, always compared to the absolute tester. Resveratrol, gallic acid and ferulic acid were detected in the extracts of accession P-178 12 %, which suggests the participation of these phenols against *Botrytis cinerea*. Reactive grade resveratrol showed better control of the fungus than the extracts of wild grapevine leaves. In general, both wild grapevine leaves and reactive grade resveratrol at any dose did not exceed the fungal activity of cyprodinil + fludioxonil.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, for funding Isela Apolonio Rodríguez' postgraduate studies, and ICAMEX for supporting and facilitating our experimental work.

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

- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL and Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:265-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Ed. Minnesota US: Burgess Publishing Company, New York. 241 p.
- Caruso F, Mendoza L, Castro P, Cotoras M, Aguirre M, Matsuhiro B, Isaacs M, Rossi M, Viglianti A and Antonioletti R. 2011. Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis* is improved using 2-furyl derivatives PLOS ONE 6:e25421. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0025421>
- Compean KL and Ynalvez RA. 2014. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 8:204-213. <http://dx.doi.org/10.3923/jrmp.2014.204.213>

- Cotoras M, Mendoza L, Muñoz A, Yáñez K, Castro P and Aguirre M. 2011. Fungitoxicity against *Botrytis cinerea* of a flavonoid isolated from *Pseudognaphalium robustum*. *Molecules* 16:3885-3895. <http://dx.doi.org/doi:10.3390/molecules16053885>
- Crous PW, Braun U and Groenewald JZ. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58:1-32. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Cruz, C. 2007. Las uvas (*Vitis*) silvestres: Distribución y usos en la región central de Veracruz, pp. 225-235. En: Nieto AR (Ed.): Frutales nativos, un recurso filogenético de México. Ed. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Ellis MB. 1971. More dematiaceous hyphomycetes. Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 608 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01989814>
- El-Khateeb AY, Elsherbiny EA, Tadros LK, Ali SM and Hamed HB. 2013. Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the mycelial growth of fungal plant pathogens. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4:1-6. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000199>
- Enríquez-Guevara EA, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro, I y Martínez-Téllez MA. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 144-155. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a7.pdf>
- Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Beasley ED, Fall LA and Brannen PM. 2013. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a blackberry field in Georgia. *Plant Disease* 98:848. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1020-PDN>
- Franco MO, Cruz CJG, González HA y Pérez LDJ. 2012. Distribución y caracterización. En: Franco MO, Cruz CJG. (Eds.): La vid silvestre en México. Actualidades y potencial, pp. 42-67. México: Universidad Autónoma del Estado de México-Altres-Costa Amic Editores. [https://www.researchgate.net/publication/262014593\\_La\\_vid\\_silvestre\\_en\\_Mexico\\_Actualidades\\_y\\_potencial](https://www.researchgate.net/publication/262014593_La_vid_silvestre_en_Mexico_Actualidades_y_potencial)
- Guerrero RF, Puertas B, Fernández MI, Palma M and Cantos-Villar E. 2010. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science Emerging Technology* 11:231-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.005>
- Katalinić V, Generalić I, Skroza D, Ljubenković I, Teskera A, Konta I and Boban M. 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1:7-15. <https://www.researchgate.net/publication/44201407>
- Lorrain B, Ky I, Pechamat L and Teissedre PL. 2013. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* 18:1076-1100. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18011076>
- Mendoza L, Yáñez K, Vivanco M, Melo R and Cotoras M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>
- Minova S, Seđična R, Voitkâne S, Metla Z, Daugavietis M and Jankevica L. 2015. Impact of pine (*Pinus sylvestris* L.) and (*Picea abies* (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences* 69: 62-67. <http://dx.doi.org/10.1515/prolas-2015-0008>
- Mora VHF, Franco-Mora OF, López-Sandoval JA, Pérez-López DJ y Balbuena-Melgarejo A. 2009. Characterization of wild plum (*Ximenia americana* L. var. americana; Olacaceae) fruit growing at Tepexi de Rodríguez, Puebla, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:719-727. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-009-9422-6>
- Moo-Koh FA, Alejo CJ, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez J M, Sandoval-Luna R y Ramírez-Pool JA. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48:833-845. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/nov-dic/art-6.pdf>
- Panebianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Polizzi G, Walters DR and Vitale A. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection* 77:65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.010>
- Piesik D, Miler N, Lemańczyk G, Bocianowski J and Buszewski B. 2015. *Botrytis cinerea* infection in three cultivars of chrysanthemum in 'Alchemist' and its mutants: Volatile induction of pathogen-infected plants. *Scientia Horticulturae* 193:127-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.040>
- Salgado M, Rodríguez-Rojo S, Alves-Santos FM and Cocero MJ. 2015. Encapsulation of resveratrol on lecithin and  $\beta$ -glucans to enhance its action against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Engineering* 165:13-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.002>
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT software: Version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis P. H, Wolfender JL and Gindro K. 2013. *Vitis vinifera* Canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5459-5467. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4010252>
- Soylu EM, Kurt Ş and Soyly S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143:183-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Tobar-Reyes JR, Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2009. Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 41: 127-37. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010)
- Tobar-Reyes JR, Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2011. Fenoles de interés farmacológico en vides silvestres (*Vitis* spp.) de México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10:167-172. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617384011](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617384011)
- Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G, Gómez M, Pena-Vera R and Montenegro G. 2012. Antifungal activity of tree

- Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. Botanical Sciences 90:179-183. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.482>
- Wu CF, Yang JY, Wang F and Wang X. 2013. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. Chinese Journal of Natural Medicines 11:1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60001-1)
- Xu W-T, Huang K-L, Guo F, Qu W, Yang JJ, Liang Z-H and Luo YB. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology 46:86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>
- Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G and Jones KC. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. Science of the Total Environment 511:123-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>