

Mulberry leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit

Extractos de hojas de morera (*Morus alba*) como una alternativa de control del moho azul en frutos de manzana en postcosecha

Nadia Landero-Valenzuela, Conacyt-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México; **Francisco M. Lara-Viveros***, Conacyt-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México; **Daniel Nieto-Angel**, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km. 36.5. 56230, Montecillo, Edo. De México, México; **Javier Aguado-Rodríguez**, Conacyt-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México; **Judith Callejas-Hernández**, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México. *Autor de correspondencia (fmlara@upfim.edu.mx)

Recibido: 10 de mayo

Aceptado: 5 de agosto

Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Nieto-Angel D, Aguado-Rodríguez J, Callejas-Hernández J. 2016. Mulberry leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit. 35 (1). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1605-2

RESUMEN

Penicillium expansum, agente causal del moho azul en manzana, causa pérdidas significativas en frutos de manzana en postcosecha, y es controlado mayormente con fungicidas sintéticos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar extractos de hojas de morera (*Morus alba*) como una alternativa de control del moho azul en frutos de manzana en postcosecha. Once tratamientos, incluyendo un testigo químico (Imazalil) y otro sin tratar, se evaluaron *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in*

ABSTRACT

Penicillium expansum, causal agent of blue mold on apple, causes significant postharvest losses in apple. This fungus is largely controlled with synthetic fungicides. The goal of this study was to evaluate the effect of leaf extracts of mulberry (*Morus alba*) as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruits. Eleven treatments including a chemical and an untreated control, were evaluated *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* experiments, mycelial growth and sporulation of the fungus were measured, and in the *in vivo* experiments severity and fruit decoloration were measured by image analysis. For the leaf extracts, asymptomatic mulberry leaves were collected, crushed and placed in a methanol or ethyl acetate as the solvent phase separation, or distilled water, each at concentrations of 4, 8 and 12%. The results

vitro se midieron el crecimiento micelial y la esporulación del hongo, y en los experimentos *in vivo* se midieron la severidad y cambio de color del fruto mediante el análisis de imágenes. Para obtener los extractos de las hojas, se colectaron hojas asintomáticas de morera, se trituraron, y se pusieron en agua destilada esterilizada, metanol y acetato de etilo como solventes de separación de fases, o agua destilada, cada uno a concentraciones de 4, 8 y 12 %. Los resultados demostraron que el extracto obtenido con metanol a 4 y 12 %, y el extracto acuoso a 12 %, inhibieron el crecimiento micelial. En cuanto a la esporulación del hongo, ésta fue menor en los extractos a base de metanol a 4 y 12 % y el de acetato de etilo a 8 %, igualando al testigo químico. La severidad de la enfermedad en frutos inoculados fue menor en el tratamiento con Imazalil, seguido por el extracto acuoso al 4 %. Solo el tratamiento con acetato de etilo al 8 % cambió la coloración de los frutos.

Palabras clave: *Malus domestica*, *Morus alba*, *Penicillium expansum*, pérdidas postcosecha

La manzana (*Malus domestica*) es uno de los frutos de mayor producción en el mundo, con un volumen global de cosecha de aproximadamente 80.8 millones de toneladas en 2013 (FAO, 2013). El principal productor de esta especie es China, con una producción anual de 39.6 millones de toneladas (49% de la producción mundial; FAO, 2013). La Unión Europea y los Estados Unidos ocupan el segundo y tercer lugar respectivamente (FAO, 2013). La producción de estas cantidades de manzana demanda el uso de plaguicidas (Sauphanor *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011) tanto en el campo como en el almacenamiento y transporte (Ticha *et al.* 2008). Uno de los fungicidas más ampliamente aplicados para extender la vida de anaquel de las

showed that the extract methanol based at 4 % and 12 % inhibited mycelial growth. A treatment with 12 % aqueous extract had the same effect. As for the sporulation of the fungus, it was also observed that the extract methanol based at 4 and 12 % decreased sporulation, and the separated phase with ethyl acetate to 8 %, equaling the chemical control. The severity of disease on inoculated fruits was inhibited by Imazalil with 75.1 %, followed by extract (4 %) with a 40.3 % effectiveness. Only treatment with ethyl acetate at 8 % caused changes on the color of the fruits.

Additional key words: *Malus domestica*, *Morus alba*, *Penicillium expansum*, postharvest losses

The apple (*Malus domestica*) is one of the most widely produced fruits in the world, with a global harvest volume of approximately 80.8 million tons in 2013 (FAO, 2013). The main producer of this species is China, with a worldwide production of 39.6 million tons (49% of the worldwide production; FAO, 2013). The European Union and the United States are the second and third largest producers, respectively (FAO, 2013). The production of these amounts of apples demands the use of pesticides (Sauphanor *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011), both on the field and in storage and transportation (Ticha *et al.* 2008). One of the fungicides that are most widely used to extend the shelf life of apples is Tiabendazole (He *et al.*, 2014). The tolerance to residues in the fruit of this product is of 5 µg/g in the United States (U.S. Government Publishing Office (GPO), 2015). Many times, with the intention of achieving a better disease control, fungicides are applied in higher doses than are recommended, surpassing the maximum residue tolerance, thus becoming a risk for consumers. Several fungicides have been related to the cause of several diseases in

manzanas es Tiabendazol (He *et al.*, 2014). La tolerancia de residuos en frutos de este producto es de 5 µg/g en los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Government Publishing Office (GPO), 2015). Muchas veces, con la intención de lograr mejor control de enfermedades, se aplican fungicidas a dosis más altas de las recomendadas, sobrepasando la tolerancia máxima de residuos, y representando así un riesgo de daño a los consumidores. Varios fungicidas se han asociado a la causa de un gran número de enfermedades que afectan la salud humana tales como cáncer, daños reproductivos y disrupción endócrina (Baldi *et al.*, 2001). Debido al conocimiento de esta información los consumidores son más conscientes de su alimentación y demandan productos más saludables, mínimamente procesados, y sin residuos químicos o que hayan sido tratados con productos alternativos a los productos sintéticos (Saucedo *et al.*, 2009, Volk *et al.*, 2015). Uno de los principales patógenos que afectan a la manzana en postcosecha es *Penicillium expansum*, conocido comúnmente como moho azul. Este microorganismo causa las mayores pérdidas en frutos de manzana (Sanzani *et al.*, 2010), y es controlado principalmente mediante el uso de fungicidas sintéticos (Zhang *et al.*, 2011). Una alternativa a los tratamientos químicos es el uso de protectantes vegetales con actividad antimicrobial, algunos de los cuales son efectivos en el control de enfermedades en postcosecha (Kim *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007), tienen menos efectos ambientales, y no dañan o incluso mejoran la salud humana (Paranagama *et al.*, 2003). La morera (*M. alba*) ha sido aprovechada en medicina humana para controlar patógenos fúngicos y bacterianos, y su composición química ha sido estudiada ampliamente (Park *et al.*, 2003; Omidiran *et al.*, 2012). Al respecto, Park *et al.* (2003) encontraron que un compuesto conocido como kuwanon extraído de raíces de morera inhibió significativamente el desarrollo

humans, such as cancer, reproductive damages, and endocrine disruption (Baldi *et al.*, 2001). Due to the knowledge of this information, consumers are more aware of their nutrition and demand healthier products, processed at a minimum, and without chemical residues, or treated with products that are not synthetic (Saucedo *et al.*, 2009, Volk *et al.*, 2015). One of the main pathogens that affect apples in postharvest is *Penicillium expansum*, commonly known as the blue mold. This microorganism causes the greatest losses in apple fruits (Sanzani *et al.*, 2010), and is controlled mainly with the use of synthetic fungicides (Zhang *et al.*, 2011). An alternative to chemical treatments is the use of plant protectors with antimicrobial activity, some of which are effective in controlling diseases in postharvest (Kim *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007), they have less environmental effects, and don't damage, or may even improve, human health (Paranagama *et al.*, 2003). The mulberry (*M. alba*) has been used in human medicine to control fungal pathogens, and its chemical composition has been widely studied (Park *et al.*, 2003; Omidiran *et al.*, 2012). In this regard, Park *et al.* (2003) found that a chemical known as kuwanon, taken from mulberry roots, inhibited the growth of *Streptococcus sobrinus* y *S. sanguinis* significantly in mouth infections. Other chemical compounds identified in the leaves of this species are alkaloids, saponins, tannins, phenolic compounds, terpenes, glycosides, and flavonoids, all considered to have antimicrobial activity (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). 2-arilbenzofuran is a compound found in *M. alba* leaves and is reported as an effective agent in the control of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Fukai *et al.*, 2005).

Other bacteria controlled with *M. alba* derivatives are *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, (Fukai *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2012), *Pseudomonas*

de *Streptococcus sobrimus* y *S. sanguinnis* en infecciones bucales. Otros compuestos químicos que han sido identificados en hojas de esta misma especie son alcaloides, saponinas, taninos, compuestos fenólicos, terpenos, glucósidos y flavonoides, considerándose estos con actividad antimicrobial (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). El 2-arilbenzofuran es un compuesto encontrado en hojas de *M. alba* que se reporta como un agente efectivo de control de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Fukai *et al.*, 2005).

Otras bacterias que han sido controladas con derivados de *M. alba* son *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, (Fukai *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Proteus vulgaricus* (Omidiran *et al.*, 2012). El efecto de algunos derivados de *M. alba* en hongos se ha estudiado en medicina humana en *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Rao *et al.*, 2012), *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* y *P. oxalicum* (Omidiran *et al.*, 2012). No obstante, poco se sabe sobre el efecto de extractos de esta especie vegetal en el control de hongos fitopatógenos. En la literatura solo se reportan estudios sobre el control de *A. niger* (Rao *et al.*, 2012), *F. guttiforme*, *Charala paradoxa* (Cerqueira *et al.*, 2016), *F. oxysporum* y *P. oxalycum* (Omidiran *et al.*, 2012). El entendimiento del efecto de extractos de morera en el control de hongos fitopatógenos podría constituir una alternativa sustentable de control del moho azul en manzana en postcosecha así como en campo y en otros cultivos.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de extractos de hojas de morera (*M. alba*) en el control de *P. expansum* *in vitro* y en frutos de manzana en postcosecha (*in vivo*).

aeruginosa, *S. faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Proteus vulgaricus* (Omidiran *et al.*, 2012). The effect of some derivatives of *M. alba* on fungi has been studied in human medicine in *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Rao *et al.*, 2012), *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* and *P. oxalicum* (Omidiran *et al.*, 2012). However, little is known of the effect of the extracts of this plant species in the control of plant pathogenic fungi. Bibliography only reports studies on the control of *A. niger* (Rao *et al.*, 2012), *F. guttiforme*, *Charala paradoxa* (Cerqueira *et al.*, 2016), *F. oxysporum*, and *P. oxalycum* (Omidiran *et al.*, 2012). Understanding the effect of the mulberry extracts on the control of pathogenic fungi could constitute a sustainable alternative for the control of the blue mold in apples in postharvest, as well as on the field and in other crops.

The aim of this investigation was to evaluate the effect of mulberry (*M. alba*) leaves on the control of *P. expansum* *in vitro* and on apple fruits postharvest (*in vivo*).

MATERIALS AND METHODS

Investigation work was carried out in the year 2015, in the Francisco I. Madero Polytechnic University, specifically in the experimentation area, located at a latitude of 20.227044° and a longitude of -99.089386°, in the municipal area of Tepatepec, Hidalgo, Mexico.

Pathogen isolation and pathogenicity tests. The *P. expansum* fungus was isolated from apple fruits with typical blue mold symptoms gathered in the Central Market (central de abasto) of Mexico City. Fruit fragments (5 x 5 mm) with approximately 20 %

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el año 2015, en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, específicamente en el área de experimentación ubicada en 20.227044° de latitud y -99.089386° de longitud, en el municipio de Tepatepec, Hidalgo, México.

Aislamiento del patógeno y pruebas de patogenicidad. El hongo *P. expansum* fue aislado de frutos de manzana con síntomas característicos de moho azul colectados en la central de abasto de la Ciudad de México. Fragmentos (5 x 5 mm) de frutos con aproximadamente 20 % de tejido sintomático y 80 % de tejido sano se sembraron en cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente (26±2 °C) durante 10 días. Después de la incubación, una porción de micelio se transfirió a otra caja de Petri con PDA para purificar las cepas. Una vez confirmada la identidad de *P. expansum* mediante las claves morfológicas de Seifer *et al.*, (2011), la cepa se sembró en medio de cultivo PDA, donde se desarrolló por un período de siete días a 28 °C en condiciones de oscuridad en una incubadora (Thermo scientific®). Al término del periodo de incubación, se preparó una suspensión de esporas (conidios) para inocular frutos de manzana sanos y para verificar la patogenicidad del aislamiento. La suspensión conidial se preparó raspando el micelio y los conidios, filtrando la suspensión, y ajustándola a una concentración de 1x10⁶ conidios mL⁻¹ mediante el uso de una cámara Neubauer. Frutos de manzana (*M. domestica*) variedad Golden Delicious fueron seleccionados de un comercio de frutas en el municipio de Actopan, Hidalgo, México. Todos los frutos seleccionados tuvieron más o menos el mismo tamaño y color y se encontraban libres de daños y signos de infección. Diez frutos se lavaron y desinfectaron con

symptomatic tissue and 80 % asymptomatic tissue were cultivated in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at room temperature (26±2 °C) for 10 days. After incubation, a portion of mycelium was transferred to another Petri dish with PDA to purify the strains. Once the identity of *P. expansum* was confirmed via the morphological keys by Seifer *et al.*, (2011), the strain was planted in a PDA culture, where it grew for 7 days at 28 °C in the dark in an incubator (Thermo scientific®). At the end of the incubation period, a suspension was prepared with spores (conidia) to inoculate healthy apple fruits and to verify the pathogenicity of the isolation. The conidial suspension was prepared by scraping the mycelium and the conidia, filtering the suspension, and adjusting it to a concentration of 1x10⁶ conidia mL⁻¹ using a Neubauer chamber. Apple (*M. domestica*) fruits of the variety Golden Delicious were selected in a fruit vending venue in Actopan, Hidalgo, Mexico. All fruits chosen were of approximately the same size and free of damage or signs of infections. Ten fruits were washed and disinfected with a 3 % v/v sodium hypochlorite solution, and two cuts, each 2 mm in diameter and 2 mm deep, were made using a sterilized dissection needle. Later, using a micropipette, 20 µL were deposited from the conidial suspension in the incision to reproduce the symptoms of the blue mold, in order to corroborate the pathogenicity of *P. expansum*. Distilled-sterilized water was added to five control fruits. Several Petri dishes in which the fungus was cultivated, were kept for use in *in vitro* and *in vivo* experiments described in this study.

Plant material and preparation of extracts. The mulberry leaves used for the extracts were taken from plants grown in 2012 in the planting area of the Francisco I. Madero Polytechnic University. From the middle section of the canopy, healthy-looking

una solución de hipoclorito de sodio al 3 % v/v, y se les realizaron dos heridas de 2 mm de diámetro y 2 mm de profundidad con una aguja de disección esterilizada. Posteriormente, usando una micropipeta, se depositaron 20 µL de la suspensión conidial en la herida para reproducir los síntomas del moho azul y así corroborar la patogenicidad de *P. expansum*. A cinco frutos testigo se les depositó agua destilada-esterilizada. Varias cajas Petri en las que cultivó el hongo, se mantuvieron para usarse en los experimentos *in vitro* e *in vivo* que se describen este estudio.

Material vegetal y preparación de los extractos.

Las hojas de morera usadas para los extractos se colectaron de plantas establecidas en el año 2012 en el área de cultivo de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. De la parte media del dosel de las plantas se seleccionaron hojas visualmente sanas y uniformes en color y tamaño, y una vez colectadas se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo en la superficie. Se pesó 1 kg de hojas, y en varias porciones se trituraron en una licuadora durante un minuto hasta que se observó savia. Las trituraciones obtenidas se mezclaron y distribuyeron por peso en cuatro frascos de vidrio ámbar de un litro para evitar la luz. En cada frasco se vertieron 600 mL de agua destilada cubriendo todas las hojas trituradas. La mezcla se dejó reposar durante 72 horas para arrastrar los metabolitos mediante la polaridad del agua. Pasado este tiempo se eliminaron los sólidos con papel filtro Whatman® grado 54 y se obtuvo una solución madre del extracto (se mezclaron los extractos obtenidos de los cuatro frascos) que se consideró como el extracto acuoso o extracto sin solvente. Después se procedió a separar las fases de dicha solución usando dos solventes diferentes: metanol y acetato de etilo. Para esto, en un matraz de separación de fases, se vertieron 100 mL del extracto acuoso y 100 mL de

and uniform leaves in color and size were selected and washed with distilled water to eliminate surface residues. One kilogram of leaves was weighed, and bit by bit, they were blended in a kitchen blender for one minute until sap was observed. The product was mixed and distributed by weight in four one-liter amber glass jars to avoid the entrance of light. In each jar we poured 600 mL of distilled water, covering all the blended leaves. The mixture was left to settle for 72 hours to drag the metabolites with the polarity of water. After this time, solids were removed using degree 54 Whatman® filter paper, and a mother solution was obtained from the extract (the extracts obtained from the four jars were mixed), which was considered the aqueous extract or the extract without a solvent. Later, the phases of the solution were separated using two different solvents: methanol and ethyl acetate. To do this, 100 mL of aqueous extract and 100 mL of ethyl acetate or methanol (of a reactive degree, 99 % pure) were poured into a phase separation beaker. The solution was left to settle until we noticed the complete separation of both phases. Using the valve of the beaker, we discarded the bottom phase and kept the one which contained the solvent with the possible antimicrobial metabolites (Bresin *et al.*, 2015). The fractions obtained with each solvent (methanol and ethyl acetate) were concentrated in a vacuum rotary evaporator (Ika®) to obtain the extract free of the extraction solvents. The extracts were stored at a temperature of 4 °C until they were to be used for the experiments. Later, for simplicity and clarity of the extracts, they were labeled aqueous extract, extract obtained in methanol and extract obtained in ethyl acetate.

Control of *P. expansum* *in vitro*. This phase of the experiment tested 11 treatments in culture medium: PDA + aqueous extract, PDA + extract obtained in methanol, and PDA + extract obtained in ethyl

acetato de etilo o metanol (de grado reactivo, con una pureza del 99 %). La solución se dejó reposar hasta que se observó la separación completa de dos fases. Empleando la válvula del matraz se eliminó la fase inferior y se obtuvo aquella que contenía el solvente con los posibles metabolitos antimicrobiales (Bresin *et al.*, 2015). Las fracciones obtenidas con los respectivos solventes (metanol y acetato de etilo) fueron concentradas en un rotavapor a presión reducida (Ika®) para obtener el extracto libre de los solventes de extracción. Los extractos se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta que se requirieron para los experimentos. En lo sucesivo, por simplicidad y claridad los extractos se denominan extracto acuoso, extracto obtenido en metanol y extracto obtenido en acetato de etilo.

Control de *P. expansum* in vitro. En esta fase del experimento se probaron 11 tratamientos en medio de cultivo: PDA + extracto acuoso, PDA + extracto obtenido en metanol, y PDA + extracto obtenido en acetato de etilo (cada uno a concentraciones de 4, 8 y 12 %), PDA + Imazalil 500 mg L⁻¹ como testigo químico, y PDA + agua destilada como testigo absoluto. Para preparar estas soluciones, en matraces separados conteniendo la cantidad complementaria de PDA sin solidificar se vertieron las cantidades correspondientes de los extractos para obtener las concentraciones deseadas (en la concentración al 4 % se vaciaron 4 mL de la solución madre obtenida con cada solvente en 96 mL de medio de PDA para completar 100 mL, y así sucesivamente con las otras concentraciones). Cada solución se vació en cajas Petri debidamente etiquetadas y se dejó solidificar el medio. Después, en el centro de cada caja se transfirió un disco de micelio de *P. expansum* de 5 mm de diámetro, el cual se obtuvo de las cajas que se prepararon anteriormente en las pruebas de patogenicidad. Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente al azar con cinco

acetate (each at concentrations of 4, 8 and 12 %), PDA + Imazalil 500 mg L⁻¹ as a chemical control, and PDA + distilled water as an absolute control. To prepare these solutions, in separate beakers with the complementary amount of unsolidified PDA, we poured the corresponding amounts of the extracts to obtain the desired concentrations (in the 4 % concentration, we poured 4 mL of the mother solution obtained with each solvent in 96 mL of PDA medium to complete 100 mL, and so on with the other concentrations). Each solution was poured into a Petri dish, properly labelled, and the medium was left to solidify. Next, in the center of each dish, we placed a *P. expansum* mycelium disc, 5 mm in diameter, obtained from the dishes prepared earlier in the pathogenicity tests. The treatments were laid out in a totally random design with five repetitions. The Petri dishes were incubated at 28 °C (Thermo Scientific® Incubator) for eight days in the dark.

To determine the efficiency of each treatment in the control of *P. expansum*, the radial growth of the fungal colonies were measured every 24 horas, and the fungal sporulation (concentration of conidia in the culture medium) was evaluated after 10 días. Each Petri dish was rinsed with distilled-sterilized water, the surface was scraped with a glass rod and filtered through a sterilized cotton mesh. Aliquots of 0.5 mL were transferred from each dish to a Neubauer chamber and the conidia were counted. The complete experiment was repeated 48 hours after the first was concluded.

Control of *P. expansum* in vivo. We selected apple fruits of the variety Golden Delicious without damages or signs of infections (healthy looking) and similarly sized and colored to be artificially inoculated with *P. expansum*. The fruits were disinfected with a 2 % sodium hypochlorite solution for three minutes, rinsed with distilled water, and dried at room temperature using paper

repeticiones. Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C (Incubadora Thermo Scientific®) durante ocho días, en oscuridad.

Para determinar la eficacia de cada tratamiento en el control de *P. expansum*, se midió el crecimiento radial de las colonias del hongo cada 24 horas, y se evaluó la esporulación del hongo (concentración de conidios en el medio de cultivo) a los 10 días. Cada caja Petri se enjuagó con agua destilada-esterilizada, la superficie se raspó con una varilla de vidrio y se filtró a través de una malla de algodón esterilizada. Alícuotas de 0.5 mL de cada caja fueron transferidas a una cámara de Neubauer y se contaron los conidios. El experimento completo se repitió una vez más a las 48 horas de haberse concluido el primero.

Control de *P. expansum* in vivo. Se seleccionaron frutos de manzana Var. Golden Delicious sin daño o signos de infección (aparentemente sanos) y de coloración y tamaño similar para inocularse artificialmente con *P. expansum*. Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante tres minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente sobre papel secante. De manera paralela se preparó una suspensión de esporas de *P. expansum* a concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} , así como concentraciones a 4, 8 y 12 % del extracto acuoso y de los extractos obtenidos en metanol y acetato de etilo en agua esterilizada, para lo cual se determinó la cantidad total por tratamiento de solución requerida para cubrir las manzanas, y basado en ello se calculó la cantidad de cada extracto que debería mezclarse con el agua esterilizada para asperjar. Al igual que en el experimento *in vitro*, se incluyó Imazalil 500 mg L^{-1} como testigo químico, y agua destilada como testigo absoluto. Las soluciones se asperjaron sobre los frutos desinfectados en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por

towels. At the same time, we prepared a suspension of *P. expansum* spores at a concentration of 1×10^6 conidia mL^{-1} , as well as concentrations of 4, 8, and 12 % of the aqueous extract and the extracts obtained in methanol and ethyl acetate in sterilized water, and for this, the total amount was determined of solution required per treatment to cover the apples, and based on that, we calculated the amount of each extract to be mixed with the sterilized water and sprayed. As with the experiment *in vitro*, we included Imazalil 500 mg L^{-1} as a chemical control and distilled water as an absolute control. The solutions were sprayed on the disinfected fruits in a completely random design with five repetitions per treatment (five fruits, each with two artificial incisions). Twenty four hours after spraying, we inoculated the pathogen on the fruits. For this, and using a sterilized dissection needle, two 2 mm deep incisions were made on the fruit (just to ensure the symptom, since the fungus needs no incisions to penetrate) and on these incisions, we deposited 20 μL of the conidial suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) of the pathogen with a micropipette (20,000 spores). The fruits were placed in a wet chambers (sealed plastic containers) at 26 ± 2 °C, and after incubation, we calculated the diameter of the incision, measuring the radius of the incision every 24 h using a digital caliper. The entire experiment was redone 48 hours after concluding the first one. The effectiveness was calculated using the following formula:

$$\frac{\text{Values of the control} - \text{Values of the treatment}}{\text{Values of the control}} \times (100)$$

Color change in fruits. To determine if there were any effects of the extracts on the coloring of the fruits treated, photographs were taken on a daily

tratamiento (cinco frutos, cada uno con dos heridas artificiales). Veinticuatro horas después de la aspersión se procedió a inocular el patógeno sobre los frutos. Para ello, con una aguja de disección esterilizada se hicieron dos heridas de 2 mm de profundidad (solo para asegurar el síntoma, ya que el hongo no necesita de heridas para penetrar) y sobre dichas heridas se depositaron 20 µL de la suspensión conidial (1×10^6 conidios mL⁻¹) del patógeno con una micropipeta (20,000 esporas). Los frutos fueron colocados en cámara húmeda a temperatura de 26 ± 2 °C, y después de la incubación se calculó el diámetro de la lesión midiendo el radio de la herida cada 24 horas con un vernier digital. Todo el experimento se repitió 48 horas después de concluirse el primero. La efectividad fue calculada con la fórmula:

$$\frac{\text{Valor del testigo} - \text{Valor del tratamiento}}{\text{Valor del testigo}} \times (100)$$

Cambio de color en frutos. Para determinar si hubo algún efecto de los extractos en la coloración de los frutos tratados, se tomaron diariamente fotografías de los frutos incubados en la cámara húmeda usando una cámara marca Fujifilm® de 12 megapíxeles. Las fotografías se tomaron a una distancia de 30 cm con iluminación proporcionada por una lámpara fluorescente de 20 w. El ángulo entre la lente de la cámara y la fuente de la iluminación fue de aproximadamente 45°. La apertura del diafragma utilizada fue f/2.8 y la velocidad del obturador de 1/30 s. Estos parámetros se mantuvieron constantes durante la toma de todas las imágenes, y éstas se guardaron en formato JPEG. Las medias de los valores correspondientes a rojo, verde y azul (RVA) que conforman el color real del fruto de manzana, se analizaron estadísticamente mediante el programa Adobe® Photoshop® CS5 versión

basis of the fruits incubated in the wet chambers (sealed plastic containers) using a 12 megapixel Fujifilm® camera. The photographs were taken at a distance of 30 cm with lighting provided by a 20 w fluorescent lamp. The angle between the lens of the camera and the source of lighting was of approximately 45°. The aperture used in the camera was f/2.8 and the shutter speed was 1/30 s. These parameters were kept constant during the capture of all the images, which were kept in a JPEG format. The averages of the values corresponding to red, green, and blu (RGB) which make up the real color of the apple fruit, were analyzed statistically using the programa Adobe® Photoshop® CS5 version 12.0.4. The values closest to the absolute control (without treating) correspond to the color demanded in markets for the species and the variety (Landero *et al.*, 2013).

Staistical analysis. Using the data of the experiment *in vitro* (length of the mycelial growth), we calculated the Area Under the Curve (AUC) using the polygon method (Liengme, 2013). The AUC of each treatment underwent an analysis of variance. For the growth of the fungus with time, we obtained averages of each of the treatments for each of the days in which the evaluation was carried out, undergoing analyses of variance and Tukey multiple average separation tests. For the variable whose data were not normal, these were transformed using the square root $\sqrt{\cdot}$. Using the severity data (diameter of the incision) of the experiment *in vivo* we determined the AUC of the disease using the method described above. The results underwent analyses of variance and Tukey multiple average separation tests using the program SAS v.9 for Windows®. To evaluate color change in the fruits, the values of R, G, and B were evaluated separately, and they underwent analyses of variance and Tukey multiple average separation tests, using the program mentioned above.

12.0.4. Los valores más cercanos a los del testigo absoluto (sin tratar) corresponden a la coloración exigida en los mercados para la especie y variedad (Landro *et al.*, 2013).

Análisis estadístico. Con los datos del experimento *in vitro* (longitud del crecimiento micelial) se calculó el área bajo la curva (ABC) usando el método de los polígonos (Liengme, 2013). El ABC de cada tratamiento se sometió a análisis de varianza. Para el crecimiento del hongo a través del tiempo, se obtuvieron medias de cada uno de los tratamientos por cada uno de los días en que se llevó a cabo la evaluación, sometiéndose a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey. Para la variable cuyos datos no fueron normales, éstos se transformaron con la raíz cuadrada $\sqrt{}$. Con los datos de severidad (diámetro de la lesión) del experimento *in vivo* se determinó el ABC de la enfermedad mediante el método antes descrito. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey mediante el programa SAS v.9 para Windows®. Para evaluar el cambio de color en los frutos, los valores de R, G y B fueron evaluados por separado, y sometidos a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey, empleando el programa mencionado previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de *P. expansum in vitro*. El crecimiento micelial del hongo en PDA varió significativamente ($P<0.0001$) entre tratamientos, siendo significativamente menor en las cajas que contenían la fase metanólica al 4 y 12 %, así como la fase acuosa a esos mismos porcentajes. El mayor crecimiento del hongo fue observado en el testigo absoluto (Cuadro 1). Según Chon *et al.* (2009), el mayor contenido de

RESULTS AND DISCUSSION

Control of *P. expansum in vitro*. The mycelial growth of the fungus in PDA varied significantly ($P<0.0001$) between treatments, and was significantly lower in the dishes that contained the methanolic phase at 4 and 12 %, as well as the aqueous phase at these same percentages. The greatest fungal growth rate was observed in the absolute control (Table 1). According to Chon *et al.* (2009), the greatest content of phenols was determined when methanol was used as a solvent to perform the extraction in mulberry leaves, which is important when considering phenols as secondary metabolites with antimicrobial properties (Wang *et al.*, 2012). However, this study obtained similar results in the tests which used methanol and water as solvents, therefore we can infer that another unknown metabolite or metabolites, different to phenols, could be responsible for the observed antimicrobial effect. In this regard, Ayoola *et al.* (2011) mention that when they used water and ethanol as solvents to obtain a crude *M. alba* leaf extract, the analysis indicated the presence of phenolic compounds and flavonoids, which have been reported as having antimicrobial activity, (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006). According to Ayoola *et al.* (2011), the crude extract inhibited the growth of the fungi *A. niger*, *A. tamari*, *F. oxysporum* and *P. oxalycum*. It is important to mention that for this variable the chemical control no showed control, making it similar to the absolute control.

When the comparison of averages was performed by the group of solvents used for the extraction, we also found a statistical difference between treatments ($P<0.0001$); showing the least mycelial growth where these were prepared based on an aqueous extract, as well as when the extract was made with methanol (Table 1). The absolute

Cuadro 1. Crecimiento micelial de *Penicillium expansum* *in vitro* bajo diferentes tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 1. Mycelial growth of *Penicillium expansum* *in vitro* under different treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias de ABC del C.M.	Tratamientos	Medias del ABC** del C.M. de acuerdo al solvente usado
TA	18.310 a*	TA	18.310 a*
TQ	12.870 ba	TQ	12.870 b
MET8 %	11.080 bc	AC	9.200 bc
AC4 %	9.9 bc	MET	7.819 c
AC8 %	8.4 bc	EXT	6.853 c
EXT4 %	7.9 bc	P	<0.0001
EXT 8 %	6.6 c	DMS	4.1102
MET 4 %	6.3 c		
EXT12 %	6.2 c		
MET 12 %	5.3 c		
P	<0.0001		
DMS	6.195		

*Letras iguales indican ausencia de diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$). **El área bajo la curva se presenta en valores adimensionales / *Same letters indicate and absence of a significant statistical difference (Tukey, $P \leq 0.05$). **The area under the curve is presented in adimensional values.

TA= control sin tratar, TQ= Testigo químico, MET8 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 8% en medio de cultivo PDA, AC4 %= Separación de fase empleando acetato de etilo, a una concentración de 4% en medio de cultivo PDA, AC8 %= Separación de fase empleando acetato de etilo, a una concentración de 8 % en medio de cultivo PDA, EXT4 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 4 % en medio de cultivo PDA, EXT8 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 8 % en medio de cultivo PDA, MET4 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 4 % en medio de cultivo PDA, EXT12 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 12 % en medio de cultivo PDA, MET12 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 12 % en medio de cultivo PDA. C.M.=Crecimiento micelial. DMS=Diferencia mínima significativa / TA= untreated control, TQ= chemical control, MET8 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 8 % in a PDA culture medium, AC4 %= Phase separation using ethyl acetate, at a concentration of 4 % in PDA culture medium, AC8 %= Phase separation using ethyl acetate, at a concentration of 8 % in PDA culture medium, EXT4 %= *Morus alba* extract at a concentration of 4 % in PDA culture medium, EXT8 %= *Morus alba* extract at a concentration of 8 % in PDA culture medium, MET4 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 4 % in PDA culture medium, EXT12 %= *Morus alba* extract at a concentration of 12 % in PDA culture medium, MET12 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 12 % in PDA culture medium. C.M.=Mycelial growth. DMS=Minimum significant difference.

fenoles fue determinado cuando se empleó metanol como solvente para realizar el extracto en hojas de morera, lo cual es de importancia al considerar a los fenoles como metabolitos secundarios que poseen propiedades antimicrobiales (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente trabajo, se obtuvieron resultados similares en los ensayos en los

control was the only one that showed a difference with all the treatments, showing the greatest mycelial growth. Asli *et al.* (2014) reported that the extract obtained with methanol from *M. alba* leaves presented antimicrobial activity against *C. albicans* and *A. niger*, which confirms the results of this study.

que se empleó el metanol y el agua como solventes, por lo que se infiere que otro u otros metabolitos desconocidos diferentes a los fenoles podrían ser los responsables del efecto antimicrobial observado. Al respecto Ayoola *et al.* (2011) mencionan que cuando emplearon agua y etanol como solventes para obtener extracto crudo de hojas de *M. alba* el análisis mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, que han sido reportados con actividad antimicrobial (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006). De acuerdo a Ayoola *et al.* (2011), el extracto crudo inhibió el crecimiento de los hongos *A. niger*, *A. tamari*, *F. oxysporum* y *P. oxalicum*. Es de importancia mencionar que para esta variable el testigo químico no tuvo control alguno, siendo similar al testigo absoluto.

Cuando la comparación de medias se llevó a cabo por el grupo de solventes empleados para la extracción, también se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos ($P < 0.0001$); presentándose el menor desarrollo del micelio cuando éstos fueron preparados a base de extracto acuoso, así como cuando la extracción fue hecha con metanol (Cuadro 1). El testigo absoluto fue el único que mostró diferencia con todos los tratamientos, mostrando el mayor crecimiento micelial. Asli *et al.* (2014) reportaron que el extracto obtenido con metanol de hojas de *M. alba* exhibieron actividad antimicrobial en contra de *C. albicans* y *A. niger*, lo cual corrobora lo obtenido en el presente estudio.

Se puede observar que con los extractos acuosos y metanólicos se obtuvo la menor ABC (Cuadro 1), esto coincide con los tratamientos con los cuales se obtuvo el menor crecimiento micelial del patógeno. Omidirán *et al.* 2012, mencionan que al aplicar extractos acuosos de *M. alba* sobre hongos o bacterias, estos tuvieron un menor crecimiento que cuando se hicieron aplicaciones de extractos etanólicos, lo cual refuerza lo obtenido en el presente trabajo.

The use of aqueous and methanolic extracts evidently produced the lowest AUC (Table 1), which coincides with the treatments which produced the lowest mycelial growth in the pathogen. Omidirán *et al.* 2012, mention that when applying aqueous extracts of *M. alba* on fungi or bacteria, these had a lower growth rate than the applications with ethanolic extracts, which reinforces the results obtained in this investigation.

In the analysis of fungal development in time, it was observed that the increase in the intensity of the disease was homogenous. After the second evaluation, all the treatments showed significant statistical differences between them. The absolute control showed the highest values for mycelial growth in each of the readings taken (Figure 1). The treatments based on aqueous and methanolic extract remained as the ones that showed the least pathogen development in time; only during readings 3 and 5 were all treatments equal, with the exception of the absolute control, which displayed the highest values.

The treatments that showed the lowest number of conidia per mL were those for which the culture medium was mixed with a 4 % aqueous extract, ethyl acetate at 8 % and aqueous extract at 12 %, statistically equaling the chemical control (DMS=63.01; Table 2). This is relevant because spores are an effective dispersal and infection mechanism, and with the application of the treatments mentioned earlier, these are reduced. This may be due to the fact that methanol was the solvent with one of the best results, and used for the extraction of *M. alba* leaves, it presents an drag of phenolic compounds, which, as we mentioned earlier, have antimicrobial activity (Chon *et al.*, 2009). This is also confirmed with the mycelial inhibition of the pathogen when the same solvent was used. On the other hand, the greatest amount of conidia was observed in the absolute control. As for the favorable result with the application of the

En el análisis del desarrollo del hongo a través del tiempo se observó que el incremento en intensidad de la enfermedad fue homogéneo. A partir de la segunda evaluación, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellas. El testigo absoluto mostró los mayores valores de crecimiento micelial en cada una de las lecturas tomadas (Figura 1). Los tratamientos a base de extracto acuoso y metanólico se mantuvieron como los que mostraron el menor desarrollo del patógeno a lo largo del tiempo, únicamente durante las lecturas tres y cinco todos los tratamientos fueron iguales, a excepción del testigo absoluto que presentó los mayores valores.

Los tratamientos en los que se observó el menor número de conidios por mL fueron aquellos para los cuales el medio de cultivo fue mezclado con extracto acuoso al 4%, acetato de etilo al 8% y extracto acuoso al 12%, igualando estadísticamente al testigo químico (DMS=63.01; Cuadro 2). Lo anterior es relevante, ya que las esporas son un mecanismo de dispersión e infección efectivo, y con la aplicación de los tratamientos mencionados anteriormente, estas disminuyen. Lo anterior puede

aqueous extract, Cerqueira *et al.* (2016) found that the inhibition halos on *F. guttiforme* were observed precisely in the treatment based on aqueous extract of the *Bonetia stricta* leaf. Regarding this, we can mention that an extract is the complete mixture of the metabolites that plant leaves contain, and this condition may be what causes the lower mycelial growth or the lower number of spores in the pathogen; although the application of only one metabolite may be less effective, this is not the case in all extracts.

The sporulation of *P. expansum* was significantly different between the treatments with two solvents (ethyl acetate and methanol). However, sporulation was lower in both solvents than in the untreated control. Results indicate that the aqueous extract was statistically different to the absolute control, though no better than the extract obtained with methanol and with ethyl acetate (Table 2). In this case, the chemical control displayed the greatest effectiveness, with no spores presented.

Control of *P. expansum* in vivo. The results showed statistical differences between treatments

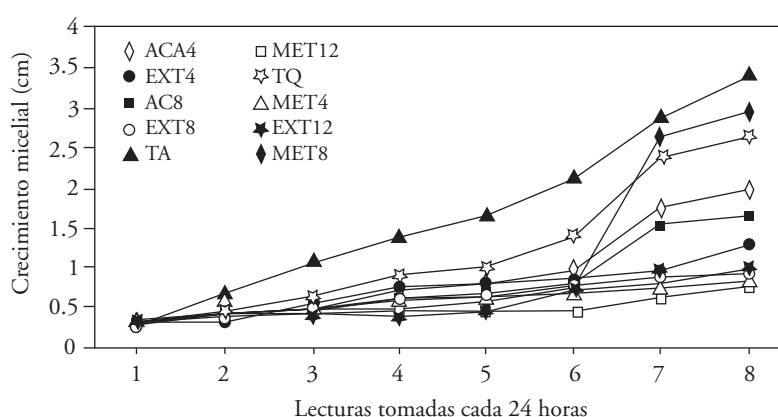


Figura 1. Crecimiento micelial por lectura de *Penicillium expansum* bajo diferentes concentraciones de extractos de *Morus alba* obtenidos con tres solventes. Cada línea con diferente color indica un tratamiento.

Figure 1. Mycelial growth by reading of *Penicillium expansum* under different concentrations of *Morus alba* extracts obtained with three solvents. Each line with a different color indicates a treatment.

Cuadro 2. Número medio de esporas de *Penicillium expansum* debido a diferentes tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 2. Average number of *Penicillium expansum* spores due to different treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias del número de esporas	Tratamientos	Medias del número de esporas de acuerdo al solvente usado
TA	137.7 a*	TA	137.7 a*
EXT8%	101.5 ba	EXT	55.3 b
MET8%	61.8 bc	MET	48.1 cb
MET4%	42.4 bc	AC	33.3 cb
MET12%	40.2 bc	TQ	0.0 c
AC4%	38.5 bc	P	<0.0001
EXT12%	36.88 c	DMS	54.3
AC8%	28.22 c		
EXT4%	27.44 c		
TQ	0.0 c		
P	0.001		
DMS	63.013		

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$). Datos fueron transformados a $\sqrt{}$, se muestran los valores reales para una mejor comprensión / *Same letters do not indicate significant difference (Tukey, $P \leq 0.05$). Data were converted to $\sqrt{}$, real values showed for a better comprehension.

deberse a que el metanol que fue el solvente con uno de los mejores resultados y utilizado para la extracción de hojas de *M. alba* presenta un arrastre de compuestos fenólicos, los cuales ya se ha mencionado previamente tienen actividad antimicrobial (Chon *et al.*, 2009), esto se confirma también con la inhibición del crecimiento micelial del patógeno cuando se empleó el mismo solvente. Por otro lado, la mayor cantidad de conidios se observó en el testigo absoluto. En cuanto al favorable resultado con la aplicación del extracto acuoso, Cerqueira *et al.* (2016) encontraron que los mayores halos de inhibición sobre *F. guttiforme* se observaron precisamente con tratamiento a base de extracto acuoso de hoja de *Bonetia stricta*. Al respecto se puede mencionar que un extracto es la mezcla completa de los metabolitos que poseen las hojas de la planta, pudiendo ser esta condición lo que logra el menor crecimiento micelial o menor número de esporas

($P < 0.0001$). The treatment with the lowest area under the disease progression curve was the one which used 4 % aqueous extract (Table 3), surpassed only by the chemical control. The extract of the leaves from the species under study was tested against *A. niger* and *C. albicans*, revealing that all concentrations presented a notorious antimicrobial activity (Rao *et al.*, 2012). It is worth mentioning that *M. alba* has been widely studied in its phytochemical composition, as well as its effect on pathogenic human microorganisms (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011 Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). However, the information on its effect on microorganisms that cause losses in agriculture is precarious. This work documents information on the effect of leaf extracts on an economically important plant pathogen. Likewise, antibacterial activity has also been reported, due to Kuwanon G,

del patógeno; mientras que la aplicación de un solo metabolito es posible que sea menos efectiva, esto no aplica en todos los casos de extractos.

La esporulación de *P. expansum* fue significativamente diferente entre los tratamientos con dos solventes (acetato de etilo y metanol). Sin embargo, en ambos solventes la esporulación fue menor comparada con el testigo sin tratar. En lo que respecta al extracto acuoso, los resultados indican que fue estadísticamente diferente al testigo absoluto pero no mejor que el extracto obtenido con metanol y con acetato de etilo (Cuadro 2). En este caso el testigo químico mostró la mayor efectividad, sin presentarse esporas.

Control de *P. expansum* in vivo. Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.0001$). El tratamiento con la menor ABC del progreso de la enfermedad fue aquel donde se utilizó el extracto acuoso al 4 % (Cuadro 3), solo siendo superado por el testigo químico. El extracto de hojas de la especie en estudio fue probado en contra de *A. niger* y *C. albicans*, revelando que todas las concentraciones mostraron una notoria actividad antimicrobial (Rao *et al.*, 2012). Cabe mencionar que *M. alba* ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su composición fitoquímica, así como su efecto sobre microorganismos humanos patógenos (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011 Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013); sin embargo, la información acerca de su efecto en microorganismos que causan pérdidas en la agricultura es precaria. El presente trabajo documenta información sobre el efecto de extractos de hoja en un fitopatógeno de importancia económica. De igual manera, actividad antibacteriana también ha sido reportada, debida a Kuwanon G, compuesto aislado de raíces de *M. alba* (Rao *et al.*, 2012).

Por otro lado, el tratamiento en el que se observó un área mayor fue el extracto obtenido con

a compound isolated from *M. alba* roots (Rao *et al.*, 2012).

On the other hand, the treatment with the highest area concerned the extract obtained with ethyl acetate at 12 %, which favored the development of the pathogen, while the rest of the treatments and the untreated control displayed a similar behavior amongst them, including the extract obtained with methanol, which, in mycelial growth and production of spores, was one of the treatments which produced the lowest growth values. Ethyl acetate is a solvent of medium polarity that extracts more compounds than methanol or other solvents. Among these are carbohydrates (Mumammad *et al.*, 2014), which function as a source of food and growth for microorganisms, such as fungi.

Cuadro 3. Severidad media causada por *Penicillium expansum* en frutos de manzana tratados con extractos de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 3. Average severity caused by *Penicillium expansum* in apple fruits with extracts of *Morus alba* leaves as aqueous, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias de severidad del ABCPE**
AC12	201.6 a*
AC8	185.2 ba
AC4	184.5 ba
EXT12	174.6 bac
MET12	170.2 bac
MET4	168.1 bac
EXT8	156.9 bac
TA	155.0 bac
MET8	120.2 bc
EXT4	92.6 c
TQ	38.6 d
P	<0.0001
DMS	46.173

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) / *Same letters do not indicate statistical significance (Tukey, $P \leq 0.05$).

**Los valores mostrados para ABCPE son adimensionales. ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad /

**The values showed for ABCPE are adimensional. AUDPC= area under the disease progress curve.

acetato de etilo al 12 %, que favoreció el desarrollo del patógeno, el resto de los tratamientos así como el testigo sin tratar mostraron un comportamiento similar entre ellos, incluyendo extracto obtenido con metanol que en crecimiento micelial y producción de esporas fue de los tratamientos donde se obtuvieron los menores valores de crecimiento. El acetato de etilo es un solvente de mediana polaridad que extrae más compuestos que el metanol u otros solventes. Dentro de ellos se encuentran los carbohidratos (Mumammad *et al.*, 2014) que sirven como fuente de alimento y crecimiento para microorganismos, tales como los hongos. El testigo químico mostró el menor desarrollo de la enfermedad (75.09 % de efectividad), seguido por el tratamiento en el cual se empleó extracto acuoso al 4 % para control de la enfermedad (40.26 % de efectividad), estos resultados concuerdan con lo obtenido por Omidiran *et al.* (2012), quien encontró que al aplicar extractos acuosos de *M. alba* sobre ciertos hongos y bacterias, estos se vieron inhibidos en su crecimiento.

El análisis de imágenes para evaluar el cambio de coloración en los frutos mostró que el tratamiento extracto obtenido con acetato de etilo al 8% causó decoloración de frutos comparado con testigo absoluto, el cual no indujo ningún cambio de color y tiene la coloración requerida por el mercado (Cuadro 4). El resto de los tratamientos se mostraron estadísticamente similar al testigo sin tratar, que indica que no se presentaron cambios en la coloración debida a los tratamientos. El cambio en la coloración en los frutos por el extracto obtenido con acetato de etilo al 8 % se explica por el uso de este solvente, que extrae compuestos diferentes que el metanol, como son antraquinonas, carbohidratos y flavonoides (Mumammad *et al.*, 2014), posiblemente en cantidades mayores que otros solventes.

Lo anterior sugiere que si se usan extractos de hojas de morera para controlar el moho azul

The chemical control appeared to have the lowest development of the disease (75.09% de efectividad), followed by the treatment in which aqueous extract at 4% was used for the control of the disease (40.26% effectiveness). These results coincide with those obtained by Omidiran *et al.* (2012), who found that applying aqueous extracts of *M. alba* on certain fungi and bacteria causes the inhibition of their growth.

The analysis of images for the evaluation of the change in coloring of the fruits showed that

Cuadro 4. *Penicillium expansum* y medias de RVA sobre frutos de manzana después de aplicar tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Tabla 4. *Penicillium expansum* and RVA averages on apple fruits after applying treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and ethyl acetate.

Tratamiento	Medias** para R ^x	Medias** para V ^x	Medias** para A ^x
TQ	157.7 a*	112.1 a	36.7 ba
MET12x %	154.7 ba	102.9 ba	37.3 ba
EXT4x %	154.5 ba	102.3 ba	40.0 a
MET4 %	152.6 ba	101.3 ba	36.3ba
EXT8 %	152.6 ba	99.9 ba	36.4 ba
EXT12 %	152.2 ba	93.6 ba	33.2 ba
TA	151.5 ba	99.2 ba	36.4 ba
AC4 %	146.6 ba	96.1 ba	35.6 ba
AC12 %	145.3 ba	96.5 ba	35.7ba
MET8 %	144.5 ba	99.8 ba	37.9 ba
AC8 %	137.5 b	87.3 b	29.9 b
P	0.02	0.01	0.03

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) / *Same letters do not indicate statistic significance (Tukey, $P \leq 0.05$).

**Medias para RVA son adimensionales. R=rojo, V=verde, A=azul / **Averages for RVA are adimensional. R=red, V=green, A=blue.

* Los valores más cercanos a los obtenidos para el testigo absoluto corresponden a la coloración normalmente exigida en los mercados para la especie y variedad, mientras que los más alejados podrían indicar cambio de coloración normal del fruto / * The values nearest to those obtained for the absolute control correspond to the coloring normally required in markets for the species and variety, while those furthest could indicate a normal change in the coloring of the fruit.

en frutos cosechados, no se recomienda el uso de acetato de etilo como solvente extractor, pues éste cambia la coloración del fruto y estimula el desarrollo del hongo (Cuadro 3). Los resultados demuestran que el uso de metanol o agua son menos influyentes en la coloración del fruto. Además, como se mencionó previamente, el metanol es el solvente con el cual se extrae la mayor cantidad de fenoles (Wang *et al.*, 2012) y es preferible por ser menos contaminante y costoso que otros solventes.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que los extractos de hojas de morera tienen potencial para usarse como una alternativa de control de *P. expansum* en frutos de manzana en postcosecha. En la extracción de los metabolitos antimicrobiales de esta planta, se recomienda usar metanol a 4% or 12% y no acetato de etilo, ya que éste último podría decolorar los frutos y estimular el desarrollo del hongo. Este trabajo motiva la realización de otros estudios sobre el efecto de extractos de *M. alba* en patógenos en otros cultivos de importancia económica. Es pertinente indicar que para un manejo más efectivo del moho azul, la aplicación del extracto de morera debe de complementarse con otras medidas sostenibles de control, por ejemplo, con el manejo de las condiciones ambientales en atmósferas controladas. Otros solventes más efectivos para extraer metabolitos de *M. alba* y de menor riesgo de uso o toxicidad deben probarse para la extracción. El presente trabajo no consideró la determinación de la composición química de *M. alba* bajo las condiciones de clima, suelo y diversidad vegetal del lugar de estudio. Esta parte de investigación sería de interés para futuros trabajos en control de hongos con productos orgánicos. La decoloración de los frutos que se observó por el efecto del acetato

the treatment with the extract obtained with ethyl acetate at 8% caused the decoloring of fruit in comparison with the absolute control, which did not induce any color change and has the color required by the market. The rest of the treatments proved to be statistically similar to the untreated control, indicating that there are no changes in the color due to treatments. The change in the coloring of the fruits due to the extract obtained with ethyl acetate at 8% is explained by the use of this solvent, which extracts different compounds to methanol, such as anthraquinones, carbohydrates, and flavonoids (Mumammad *et al.*, 2014), possibly in greater amounts than other solvents.

The above suggests that if mulberry leaf extracts are used to control blue mold in harvested fruits, the use of ethyl acetate is not recommended for use as an extraction solvent, since it changes the color of the fruit and stimulates fungal development (Table 3). The results show that the use of methanol or water are less influential on the coloring of the fruit. Also, as mentioned earlier, methanol is the solvent used to extract the most phenols (Wang *et al.*, 2012) and is preferred since it is less pollutant and costly than other solvents.

CONCLUSIONS

The results of this study suggest that the mulberry leaf extracts have the potential to be used as an alternative in the control of *P. expansum* in apple fruits in postharvest. In the extraction of the antimicrobial metabolites of this plant, we recommend using methanol at 4% or 12% and not ethyl acetate, since the latter could decolor the fruits and stimulate fungal development. This investigation motivates further studies on the effect of *M. alba* extracts in pathogens in other economically important crops. It is worth pointing

de etilo es un tema de investigación para conocer que compuestos o metabolitos son responsables de tal efecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente a la dra. Julia María Domínguez Soto, quien labora en la UPFIM, por su apoyo y disposición con el material que se necesitó en los experimentos. Asimismo agradecemos a todas aquellas personas que contribuyeron directa o indirectamente en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Andallu B., Suryakantham V., Srikanthi B.L. and Reddy G.K. 2001. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clinica Chemical Acta* 314:47. Doi:10.1016/S0009-8981(01)00632-5
- Asli E. A., Avci E., Ozcelik B., Alp A. G. and Ali K. D. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities with GC/MS analysis of the *Morus alba* L. leaves. *Hittite Journal of Science and Engineering* 1:137-141. Doi: 10.17350/HJSE19030000006
- Ayoola O.A., Baiyewu R.A., Ekunola J.N., Olajire B.A., Egunjobi J.A., Ayeni E.O. and Ayodele O.O. 2011. Phyto-constituent screening and antimicrobial principles of leaf extracts of two variants of *Morus alba*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 19:2161-2165. Doi: 10.5897/AJPP11.590
- Baldi I., Filleul L., Mohammed-Brahim B., Fabrigoule C., Dartigues J.F., Schwall S. 2001. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: results from the French Phytoneer study. *Environmental Health Perspectives* 109:839-44. Doi: 10.1136/oem.2009.047811
- Bresin P., Piol M., Fabbro D., Mancini M.A., Casseta B. and Del Bianco C. 2015. Analysis of organo-chlorine pesticides residue in raw coffee with a modified "quick easy cheap effective rugged and safe" extraction/clean up procedure for reducing the impact of caffeine on the gas chromatography-mass spectrometry measurement. *Journal of Chromatography A*, 1376:167-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.016> 0021-9673
- Cerqueira S.M.D., Barcellos C.H., Bueno F.P.M., Aires V.J. and Dummer M.D. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6:26-31. Doi:10.1016/j.apjtb.2015.09.026.
- Chon S.U., Kim Y.M., Park Y.J., Heo B.G., Park Y.S. and Gorinstein S. 2009. *European Food Research and Technology* 2:231-237. Doi:10.1007/s00217-009-1165-2
- Cushnie T.P. and Lamb A.J. 2006. Antimicrobial activity of flavonoid. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26:342-356. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002

out that for a more effective control of the blue mold, the application of mulberry extract must be complemented with other sustainable control measures, such as the control of weather conditions in controlled environments. Other more effective solvents for the extraction of *M. alba* metabolites and of a lower risk when using or toxicity must be tested for the extraction. This investigation did not consider the determination of the chemical composition of *M. alba* under the weather, soil and plant iversity conditions of the place of study. This part of the investigation would be of interest for future investigations in fungal control with organic products. The decoloring of fruits observed by the effect of the ethyl acetate is a topic of investigation to know what compounds or metabolites are responsible for this effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would especially like to thank Dr. Julia María Domínguez Soto, who works in the UPFIM, for her support and willingness with the material required for the experiments. Likewise, we would like to thank everyone who directly or indirectly contributed in the completion of this study.

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

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012. FAOSTAT Production Database. [2016-07.21]. [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAOSTAT Production Database. [2016-3-15]. <http:// faostat.fao.org>
- Fukai T., Kaitou K. and Terada S. 2005. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 76:708-711. Doi:10.1016/j.fitote.2005.06.012
- He L., Chen T., and Labuza T. P. 2014. Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 148: 42-46. Doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.003

- Kim H. O., Park S. W., and Park H. D. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology* 21:105-110. Doi:10.1016/S0740-0020(03)00010-8
- Landero V.N., Nieto A. D., Téliz O. D., Alatorre R. R. y Ortíz G. C. F. 2013. Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1:047-062. <https://doaj.org/article/14a83e0b1ce841a29a0d995d1af3bfe9>
- Liengme B. 2013. A Guide to Microsoft Excel 2013 for Scientists and Engineers. Elsevier Science and technology. 382 p.
- Mumammad A.M., Ismail M.A., Jaafar, K.M. and Garba M.M. 2014. Phytochemical screening and anticonvulsant studies of ethyl acetate fraction of *Globimetula braunii* on laboratory animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4:285-289 Doi:10.12980/APJTB.4.2014C925
- Oh J., Jo H., Cho A.R., Kim S.J. and Hn J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food control* 31:403-409. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.10.021
- Omidiran M. O., Baiyewu R. A., Ademola I. T., Fakorede O. C., Toyinbo E. O., Adewumi O. J. and Adekunle E. A. 2012. Phytochemical Analysis, Nutritional Composition and Antimicrobial Activities of White Mulberry (*Morus alba*). *Pakistan Journal of Nutrition* 11: 456-460. <http://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2012.456.460>
- Paranagama P. A., Abeysekera K. H. T., Abeywickrama K. and Nugaliyadd L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology* 37:86-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12803563>
- Park K. M., You J. S., Lee H.Y., Baek N.I. and Hwang J.K. 2003. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 84:181-185. Doi:10.1016/S0378-8741(02)00318-5
- Rao T. G., Baku K.S., Ujwal K. J., Sujana P., Veerabhadra R. A. and Sreedhar A. S. 2011. Anti-microbial principles of selected remedial plants from Southern India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1:298-305. Doi:10.1016/S2221-1691(11)60047-6
- Rao S.J.A., Ramesh C.K. and Mahmood R. 2012. Anthelmintic and antimicrobial activities in some species of mulberry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 4:335-338. <http://www.ijppsjournal.com/Vol-4Suppl5/4992.pdf>
- Saucedo P. S., Jasso C. D., Ventura S. J., Sáenz G. A., Rodríguez H. R. and Aguilar C. N. 2007. Effect of candelilla wax with natural antioxidants on the shelf life quality of fresh-cut fruits. *Journal of Food Quality* 30:823-836. Doi: 10.1111/j.1745-4557.2007.00165.x
- Saucedo P. S., Rojas M. R., Aguilera C. A. F., Sáenz G. A., Garza H. L. and Jasso C. D. 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International* 42:511-515. Doi:10.1016/j.foodres.2009.02.017
- Sauphanor B., Dirwimmer C., Boutin S., Chaussabel A.L., Dupont N., Fauriel J. 2009 Analyse comparative de différents systèmes en arboriculture fruitière. In: INRA, editor. Ecophyto R&D: vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires. Rapport d'Expertise Collective Inra, Tome IV.
- Seifert K., Morgan J. G., Gams W. and Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands. 997 p.
- Simon S., Brun L., Guinaudeau J., Sauphanor B. 2011. Pesticide use in current and innovative apple orchard Systems Agronomy. *Agronomy Sustainability Development* 31:541-55. Doi 10.1007/s13593-011-0003-7
- Singh G., Maurya S., Lampasona M.P. and Catalán A. N. C. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45:1650-1661. Doi:10.1016/j.fct.2007.02.031
- Sanzani S. M., Schena L., Girolamo A., Ippolito A., and Gonzalez C. L. 2010. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. *Postharvest Biology and Technology* 56:1-11. Doi:10.1016/j.postharvbio.2009.11.010
- Soetan K., Oyecunle M.A., Aiyelaagbe O.O. and Fafunso M.A. 2006. Evaluation of antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor*. *African Journal of Biotechnology* 23:2405-2407. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Ticha J., Hajslova J., Jech M., Honzicek J., Lacina O., Khouthkova J. 2008. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. *Food Control* 19:247-56. Doi:10.1016/j.foodcont.2007.03.011
- U.S. Government Publishing Office (GPO). 2015. Part-180 Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. 2016-07-21 [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID%45370c30aabced019b313754fe0b0c682&node%40pt40.24.180&rgn%4div5#\\_top](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID%45370c30aabced019b313754fe0b0c682&node%40pt40.24.180&rgn%4div5#_top).
- Volk G.M.C., Chao T., Norelli J., Brown S.K., Fazio G., Peace C., McFerson J., Zhong G.-Y., Bretting P. 2015. The vulnerability of US apple (*Malus*) genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62:765-794. Doi:10.1007/s10722-014-0194-2
- Wang W., Zu Y., Fu Y. and Effert T. 2012. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Extracts from *Morus alba* L. Leaves, Stems and Fruits. *American Journal of Chinese Medicine* 40:349. Doi: <http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X12500279>
- Zhang C., Wang J., Zhang J., Hou C. and Wang G. 2011. Effects of  $\beta$ -aminobutyric acid on control of postharvest blue mold of apple fruit and its possible mechanisms of action. *Postharvest Biology and Technology* 61:145-151. Doi:10.1016/j.postharvbio.2011.02.008.