

Antifungal activity of winged cudweed [*Gnaphalium luteo-album* L. (*Pseudognaphalium luteo-album* (L.) Hilliard & Burt)] against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3

Actividad antifúngica de la hierba de tomento [*Gnaphalium luteo-album* L. (*Pseudognaphalium luteo-album* (L.) Hilliard & Burt)] contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3

Sombra-Argüelles, Víctor I.^{1*}; Ruiz-Posadas, Lucero del Mar^{1*}; Nava-Díaz, Cristian¹;
Delgadillo-Martínez, Julián¹; San-Miguel-Chávez, Rubén¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230.

*Autores para correspondencia: navictor2@gmail.com; lucpo@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: To describe the antifungal activity of propanone, hexane, methylene chloride and methanol extracts of winged cudweed [*Gnaphalium luteo-album* L. (*Pseudognaphalium luteo-album* (L.) Hilliard & Burt)] against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3.

Design/methodology/approach: Winged cudweed individuals were grown from seed and extracts were obtained using propanone, hexane, methylene chloride and methanol from the aerial part of mature plants. The extracts were subjected to antifungal activity tests against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 corresponding to the agar disk diffusion method for mycelium, a microconidia germination test and a Riddell test. It was also carried out a test for toxicity of acetone and dimethyl sulfoxide.

Results: None of the extracts of winged cudweed showed antifungal activity against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3. Acetone and dimethyl sulfoxide were toxic to the fungus from 15%.

Limitations on study/implications: The results are restrained to the tested genotypes of winged cudweed, their growth environmental conditions and the fungus *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3.

Findings/conclusions: It is not recommended to use any extract of *P. luteoalbum* to control *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3.

Key words: Winged cudweed, extracts, disk diffusion test, microconidia germination.

RESUMEN

Objetivo: Describir la actividad antifúngica de los extractos de la hierba de tomento [*Gnaphalium luteo-album* L. (*Pseudognaphalium luteo-album* (L.) Hilliard & Burt)] obtenidos con propanona, hexano, cloruro de metileno y metanol contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3.

Agroproductividad: Vol. 13, Núm. 5, mayo. 2020. pp: 11-16.

Recibido: junio, 2019. **Aceptado:** marzo, 2020.

Diseño/metodología/aproximación: Se cultivaron ejemplares de la hierba de tomento establecidos a partir de semilla y se obtuvieron extractos con propanona, hexano, cloruro de metileno y metanol de la parte aérea de plantas maduras. Los extractos fueron sometidos a pruebas de actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3 correspondientes al método de difusión de disco en agar para micelio, una prueba de germinación de microconidios y una prueba de Riddell. También se realizó una prueba de toxicidad de los disolventes acetona y dimetilsulfóxido

Resultados: Ninguno de los extractos de la hierba de tomento mostró actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. La acetona y el dimetil sulfóxido fueron tóxicos para el hongo a una concentración desde 15%.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Los resultados obtenidos se limitan a los genotipos probados de la hierba de tomento, así como a sus condiciones ambientales durante su crecimiento y al hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

Hallazgos/conclusiones: No se recomienda utilizar ningún extracto de la hierba de tomento para controlar a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

Palabras clave: Hierba del tomento, extractos, difusión en agar, germinación de microconidios.

mejores solventes para obtener estos compuestos (Goli *et al.*, 2005; Roby *et al.*, 2013).

En la investigación de Aderogba *et al.* (2014) no se especifica sobre qué parte del hongo se llevó a cabo la prueba, pero se presume que el ensayo se realizó sobre micelio, pues se reporta una incubación por 12 h. El efecto antifúngico sobre los hongos puede diferir dependiendo de la estructura predominante en el inóculo (Fernández-Torres *et al.*, 2003).

En contraste, en algunos casos se ha reportado que los flavonoides pueden estimular la germinación de microconidios, como es el caso de la luteolina que en *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* incrementó el porcentaje de germinación de los microconidios a partir de 25 μM (Steinkellner & Mammerler, 2007).

En el presente estudio se probaron los extractos obtenidos de la hierba de tomento con hexano, cloruro de metileno, propanona, metanol y la mezcla de todos ellos en contra de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) mediante: 1) prueba de difusión en agar, 2) medición del porcentaje de germinación de microconidios y, 3) para los extractos obtenidos con propanona y cloruro de metileno, una prueba antifúngica de cultivo en portaobjetos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y cosecha. Las semillas fueron colectadas de un individuo de la hierba del tomento ubicado en una parcela en el Campus Montecillos del Colegio de Postgraduados, en las coordenadas 19.4670°, -98.9188°. El 9 de octubre del 2017 se sembraron diez semillas en cada una de 40 bolsas para vivero de 30×30 cm que contenían una

INTRODUCCIÓN

El extracto de la hierba de tomento [*Gnaphalium luteo-album* L. (*Pseudognaphalium luteo-album* (L.) Hilliard & Burt) con propanona fue probado por Aderogba *et al.* (2014) contra *Fusarium oxysporum* Schltdl, quienes reportan la inhibición del hongo a una concentración del extracto de 0.16 mg mL⁻¹. *Fusarium oxysporum* es la quinta especie más importante (científica y económicamente) de hongos fitopatógenos de acuerdo a la revista *Molecular Plant Pathology* (Dean *et al.*, 2012).

La hierba de tomento es de origen eurasiático pero se encuentra distribuida en todo el mundo (Calderón y Rzedowski, 2005). Es una especie ruderal y en ocasiones crece en grandes manchones, por lo que podría recolectarse en grandes cantidades o bien cultivarse fácilmente, sin necesidad de agroquímicos o cuidados especiales. En el estudio de Aderogba *et al.* (2014) se utilizó propanona como extractante basado en un artículo previamente publicado en el que se comparan los resultados obtenidos de solo dos especies (Eloff, 1998). Con el objeto de corroborar el efecto antifúngico de individuos de esta especie que crecen en México, se decidió evaluar los extractos obtenidos con otros solventes como hexano, cloruro de metileno, propanona y metanol que son de uso común y se encuentran distribuidos en la escala de polaridad (Snyder, 1974).

La mayor parte de los fitoquímicos reportados en *P. luteoalbum* son compuestos fenólicos (Saleh *et al.*, 1988; Cuadra *et al.*, 1997; Aderogba *et al.*, 2014). En otros cultivos se ha observado que el agua y el metanol son los

mezcla de tezontle y suelo agrícola (70:30 v/v). El sustrato fue previamente humedecido y durante el primer mes se mantuvo la humedad regando dos o tres veces al día con atomizador. Posteriormente los riegos se espaciaron gradualmente a cada dos o tres días, conforme a las condiciones ambientales y la edad de la planta. Se mantuvieron dos plantas por bolsa, las más homogéneas, y el resto se eliminaron.

A los 158 días después de la siembra, cuando la última planta finalizó su primera fructificación, se cortó la parte aérea de las plantas. El material se colocó en bolsas de papel kraft y en un horno (Blue M) a 45 °C, y fue retirado al alcanzar un peso constante.

Obtención de extractos. El material vegetal seco se trituró dos veces en un molino de mano. Se determinó su masa (254.3 g) y fue colocado en frascos para cubrirlo con hexano para la primera extracción. Los frascos se agitaron cada 24 horas durante 3 días. Los extractos se filtraron con papel filtro de poro grueso (Whatman No. 1). El hexano residual del material vegetal fue evaporado durante cinco horas para posteriormente adicionar cloruro de metileno. Éste se procesó mediante rotavapor a 45 °C y entre 20 y 30 cm Hg de presión. El extracto crudo se recogió en un frasco previamente etiquetado y pesado, donde se dejó evaporar el cloruro de metileno. El procedimiento de extracción se repitió de la misma manera para los solventes hexano, cloruro de metileno, propanona y metanol, en ese orden (dejando macerar siempre por al menos dos días y agitando los frascos), salvo que las temperaturas y presiones negativas para evaporar los extractos fueron: 40 °C y alrededor de 20 cm Hg, 45 °C y alrededor de 10 cm Hg, y 60 °C y de 0 a 30 cm Hg para cloruro de metileno, propanona y metanol, respectivamente.

Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar. Se utilizó la técnica de difusión en agar (o Kirby-Bauer) (Bauer et al., 1966, con modificaciones). Para ello, se utilizaron los cuatro extractos obtenidos (hexano, cloruro de metileno, propanona y metanol), un testigo positivo (fungicida Captán), la mezcla de los cuatro extractos en partes iguales y agua. Para poder mezclar los cuatro extractos se encontró una mezcla de cloruro de metileno y metanol 1:1 (v/v) que logra disolver todos los extractos, además de que esta mezcla de solventes se evapora rápidamente, en menos de 1 min si se coloca en papel filtro seco. Se utilizaron cajas Petri de 5 cm de diámetro, en las cuales se colocó por un lado el papel

filtro impregnado de 10 μ L del respectivo tratamiento y del lado opuesto un disco de agar de papa y dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) con micelio de Fol 3 de aproximadamente 2 mm de diámetro. Se realizaron 3 repeticiones. Después de 5 días de incubación a 25 °C se cuantificaron los halos de inhibición.

Prueba de germinación de microconidios. La medición de la germinación de microconidios se realizó mediante observación microscópica como propusieron Steinkellner et al. (2005), con modificaciones. Para este experimento se probaron los siguientes tratamientos: Cuatro extractos obtenidos (hexano, cloruro de metileno, propanona y metanol); un testigo positivo (fungicida Captán); la mezcla de los cuatro extractos; y un testigo negativo (agua). Para cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones. Los extractos fueron disueltos a una concentración de 100 mg mL⁻¹ con el disolvente utilizado para su extracción. El fungicida Captán se disolvió en agua a una concentración de 30 mg mL⁻¹ y la mezcla se compuso de partes iguales de los cuatro extractos disueltos en una mezcla de cloruro de metileno y metanol (1:1 v/v).

Para cada repetición se colocaron en un portaobjetos 100 μ L de agar de papa y dextrosa estéril no solidificado (caliente), procurando esparcirlo en un círculo. Una vez solidificado se colocaron 10 μ L del extracto o tratamiento en este círculo.

Con el solvente ya evaporado de los tratamientos se adicionaron 10 μ L de una suspensión de microconidios a una concentración de 1×10^5 microconidios mL⁻¹.

Los portaobjetos fueron cubiertos e incubados durante 36 h a 28 °C antes de evaluar la germinación de microconidios bajo microscopio compuesto a 40x, contando el número de microconidios germinados de un total de 100 por cada repetición, con el fin de obtener porcentajes de germinación.

A los datos obtenidos se les aplicó el análisis de varianza de una vía y la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el programa informático InfoStat y las herramientas de Microsoft Office Excel.

Prueba de Riddell. La prueba de Riddell (1950) o cultivo en portaobjetos es más sensible para la detección de actividad antifúngica. Se realizaron tres repeticiones por cada uno de los tratamientos: extracto obtenido y

disuelto con propanona (100 mg mL⁻¹), extracto obtenido y disuelto con cloruro de metileno (100 mg mL⁻¹), propanona (testigo negativo) y Captán disuelto en agua (30 mg mL⁻¹, testigo positivo).

Cada repetición constó de una caja Petri, una varilla de vidrio en forma de "u" o "v", un portaobjetos, un cubreobjetos, un disco de papel filtro, 10 µL del tratamiento a probar y 15 mL de glicerol al 10%. También se prepararon cajas Petri con medio de cultivo PDA. De este medio de cultivo solidificado se obtuvieron discos de 1 cm de diámetro.

En una campana de flujo laminar en condiciones asépticas se colocó la varilla de vidrio dentro de la caja de Petri, y encima de la varilla se colocó el portaobjetos, se adicionó glicerol al 10% procurando que no toque el portaobjetos. Posteriormente se colocó el disco de PDA al centro del portaobjetos. En un extremo de este disco se colocó el disco de papel filtro, mientras que en el extremo opuesto se colocaron hifas de Fol 3. Sobre el disco de papel se aplicaron 10 µL del tratamiento.

Se observó el crecimiento del hongo cada 12 h. A las 36 h se observó al microscopio para determinar si había inhibición del crecimiento o algún daño o modificación en las estructuras del hongo ocasionado por los tratamientos.

Para la evaluación, los efectos se agruparon en cuatro categorías: Sin inhibición (hifas sin modificaciones), inhibición no evidente (modificaciones sólo perceptibles con microscopio), inhibición evidente (macroscópicamente) e inhibición total (las hifas no crecerían o casi no crecerían desde su punto de colocación).

Prueba de toxicidad del solvente. Para determinar el efecto tóxico del solvente se preparó agar de papa y dextrosa (PDA) conforme a las instrucciones del fabricante. Antes de solidificarse, el medio fue mezclado con el solvente a probar, para obtener concentraciones finales de propanona 25%, 15% y 5%; y dimetilsulfóxido 25%, 15% y 5%. El medio de cultivo se utilizó como testigo. Al centro de cajas Petri con medio solidificado se adicionaron discos de medio de cultivo de 0.2 cm de diámetro con micelio de Fol 3, con 3 repeticiones por tratamiento. Se incubaron a 27 °C durante 4 días con evaluaciones cada 24 h.

A los datos obtenidos se les aplicaron las pruebas de homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y de normalidad de Shaphiro-Wilks, para posteriormente ejecutar el análisis de varianza de una vía y finalmente la comparación de medias de Tukey (P≤0.05) mediante el programa informático InfoStat y corroborando mediante las herramientas de Microsoft Office Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 254.3 g de materia seca del total de 80 plantas cultivadas de la hierba de tomento. Los rendimientos de los extractos con los distintos solventes empleados fueron: 1.6 con hexano, 7.6 con cloruro de metileno, 9.6 con propanona y 30.1 mg/g de materia seca con metanol.

Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar. Ningún extracto utilizado en esta prueba mostró actividad sobre Fol 3, como muestra el Cuadro 1.

Es posible que, a diferencia de lo reportado por Aderogba *et al.* (2014), ninguno de los extractos presentara

Cuadro 1. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de la hierba de tomento con metanol, cloruro de metileno, hexano, propanona y la mezcla de todos ellos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

Extracto	Inhibición en la prueba de difusión en agar (mm)	Germinación de microconidios (%)	Categoría en la prueba de Riddell
Metanol	0.00	99.25 a*	Sin inhibición
Cloruro de metileno	0.00	94.75 a	Sin inhibición
Hexano	0.00	96.50 a	-
Propanona	0.00	96.50 a	-
Mezcla de extractos	0.00	99.00 a	-
Testigo negativo (agua o propanona)	0.00	99.75 a	Sin inhibición
Testigo positivo (Captán)	1.67	3.25 b	Inhibición total

*Los valores medios con la misma letra son estadísticamente iguales para la prueba de Tukey (α=0.05). Los resultados de la prueba de Riddell fueron iguales por tratamiento para las tres repeticiones empleadas.

actividad contra Fol 3 debido a diferentes condiciones ambientales de crecimiento de las plantas, a la variación genética de las mismas, de la cepa de hongo utilizada o a algún fallo en la metodología de origen.

En cuanto a los cambios en las propiedades de las plantas de acuerdo a diferencias geográficas de crecimiento, son diversos los reportes, como lo muestran los estudios de Nguyen et al. (2019) en *Nigella sativa*; Mostafavi, Asadi-Gharneh, y Miransari (2019) en albahaca (*Ocimum basilicum*); y Pham et al. (2018) en *Gymnema sylvestre*.

Otro posible factor explicativo es el mencionado por Harborne (1984) que al evaporarse un extracto obtenido con etanol, los lípidos y la clorofila permanecen a un lado del matraz, pudiéndose recuperar el concentrado acuoso separado. En el presente estudio se redisolieron y mezclaron los concentrados, mientras que en el de Aderogba et al. (2014) no se menciona si estas fracciones fueron separadas.

Prueba de germinación de microconidios. El Cuadro 1 presenta los resultados de la prueba de germinación. En la prueba para determinar el efecto sobre la germinación de microconidios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos, a excepción del fungicida Captán, el cual inhibió casi por completo la germinación de los microconidios. Los resultados mostraron nula actividad de los extractos sobre la germinación de microconidios de Fol 3. La germinación de Fol 3 obtenida en el presente estudio para los extractos y el testigo negativo es muy similar a la reportada por Steinkellner et al. (2008) quienes encontraron valores cercanos al 90% para una cepa Fol en caldo Czapek-Dox.

Los resultados indican que el tipo de inóculo no es la causa de la discrepancia observada en pruebas anteriores del presente estudio respecto a lo reportado por Aderogba et al. (2014). Es posible que esta discrepancia sea debida a diferentes condiciones ambientales, a la variación genética de las especies empleadas, o a algún fallo en la metodología de origen, como se comentó en el apartado anterior.

Respecto al uso de cepas diferentes del hongo, Steinkellner et al. (2008) encontraron diferencias en los porcentajes de germinación ante la presencia de exudados de la raíz de jitomate

(*Solanum lycopersicum*) entre las formas especiales *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, Fol y *F. oxysporum*. Sin embargo, los resultados para dos cepas de *F. oxysporum* fueron similares.

En relación a los factores ambientales, también existe evidencia de que estas diferencias de cultivo pueden modificar los porcentajes de germinación. Singh et al. (2010), reportaron diferencias en la actividad de los exudados de la raíz de jitomate ante la micorrización de la planta con *Rhizophagus fasciculatus*.

Prueba de Riddell. Los resultados se resumen en el Cuadro 1. Como se puede observar, la técnica de Riddell muestra que ninguno de los extractos tiene actividad antifúngica contra Fol 3. Las diferencias genéticas del hongo o la planta (en el estudio de referencia no se especifica cepa, forma especial o raza de *F. oxysporum*) pudieran ayudar a explicar la discrepancia entre estos resultados y los obtenidos por Aderogba et al. (2014). De acuerdo con Aderogba et al. (2014), la concentración de propanona al 25% no es tóxica para *F. oxysporum*; sin embargo, en esta investigación se reporta la toxicidad del compuesto incluso a menor concentración. Es posible que en ese estudio la actividad antifúngica observada haya sido debida a la toxicidad de la propanona.

Prueba de toxicidad del solvente. Los resultados de esta prueba (Figura 1) mostraron que la propanona presenta fungistasis contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza

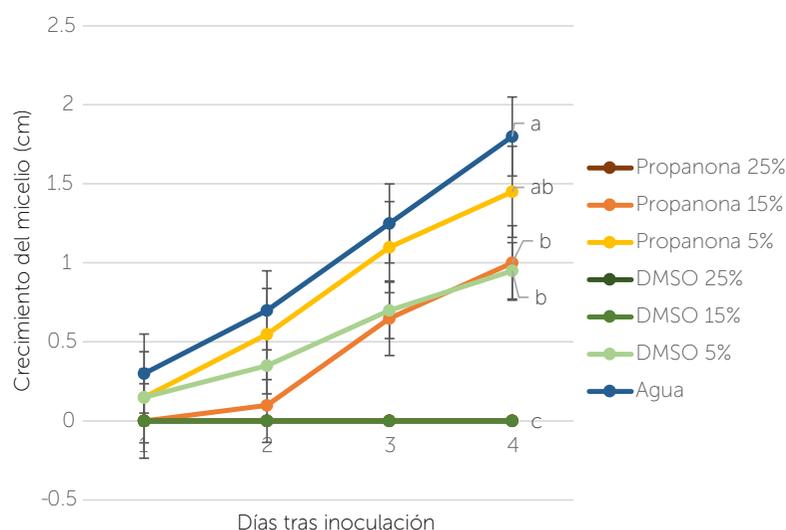


Figura 1. Crecimiento del micelio de Fol 3 en agar de papa y dextrosa con diferentes concentraciones de propanona y dimetilsulfóxido (DMSO). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey. Las líneas de DMSO a 25% y 15%, y propanona a 25% se encuentran superpuestas en los 0 cm.



3 a partir de una concentración de 15 % si se disuelve en el medio de cultivo. Esto contrasta con lo reportado por Aderogba *et al.* (2014), quienes mencionan que una concentración de 25 % no es tóxica para el hongo. Dicha afirmación es una generalización apresurada de un estudio realizado con sólo cinco especies de hongos patógenos de animales (Eloff *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Ningún extracto obtenido de la hierba de tomento presentó actividad antifúngica en contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3. Se recomienda obtener plantas crecidas bajo condiciones silvestres, así como probar dichos extractos en cepas de distintas razas de *F. oxysporum*.

La propanona mostró toxicidad a concentraciones de 15% y 25% contra Fol 3.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que no es recomendable utilizar extractos de *P. luteoalbum* del Valle de México para controlar a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Aderogba, M. A., McGaw, L. J., Bagla, V. P., Eloff, J. N., & Abegaz, B. M. (2014). *In vitro* antifungal activity of the acetone extract and two isolated compounds from the weed, *Pseudognaphalium luteoalbum*. *South African Journal of Botany*, 94, 74-78. doi: 10.1016/j.sajb.2014.06.003
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Calderón, G., & Rzedowski, J. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México* (2a ed.). Michoacán, México: Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología.
- Cuadra, P., Harborne, J. B., & Waterman, P. G. (1997). Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 45(7), 1377-1383. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00183-0
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Ellis, J. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Eloff, J. N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 1-8. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00123-2
- Eloff, J. N., Masoko, P., & Picard, J. (2007). Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays. *South African Journal of Botany*, 73(4), 667-669. doi: 10.1016/j.sajb.2007.06.002
- Fernández-Torres, B., Inza, I., & Guarro, J. (2003). Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia | *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3371-3372. doi: 10.1128/AAC.47.10.3371-3372.2003
- Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521-525. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.020
- Harborne, J. B. (1984). Phenolic Compounds. En J. B. Harborne (Ed.), *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (pp. 37-99). London, UK: Springer. doi: 10.1007/978-94-009-5570-7_2
- Mostafavi, S., Asadi-Gharneh, H. A., & Miransari, M. (2019). The phytochemical variability of fatty acids in basil seeds (*Ocimum basilicum* L.) affected by genotype and geographical differences. *Food Chemistry*, 276, 700-706. doi.org: 10.1016/j.foodchem.2018.10.027
- Nguyen, T., Talbi, H., Hilali, A., Anthonissen, R., Maes, A., & Verschaeve, L. (2019). *In vitro* toxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of *Nigella sativa* extracts from different geographic locations. *South African Journal of Botany*. doi: 10.1016/j.sajb.2019.02.015
- Pham, H. T. T., Hoang, M. C., Ha, T. K. Q., Dang, L. H., Tran, V. O., Nguyen, T. B. T., Oh, W. K. (2018). Discrimination of different geographic varieties of *Gymnema sylvestre*, an anti-sweet plant used for the treatment of type 2 diabetes. *Phytochemistry*, 150, 12-22. doi.org: 10.1016/j.phytochem.2018.02.013
- Riddell, R. W. (1950). Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, 42(2), 265-270. doi: 10.2307/3755439
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.029
- Saleh, N. A. M., Mansour, R. M. A., El-Kareemy, Z. A. R., & Fayed, A. A. (1988). The chemosystematics of local members of the subtribe gnaphaliinae (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(7), 615-617. doi: 10.1016/0305-1978(88)90072-5
- Singh, P. K., Mishra, M., & Vyas, D. (2010). Effect of root exudates of mycorrhizal tomato plants on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(15), 1495-1503. doi: 10.1080/03235400802583511
- Snyder, L. R. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, 92(2), 223-230. doi: 10.1016/S0021-9673(00)85732-5
- Steinkellner, S., Mhammerler, R., & Vierheilig, H. (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *Journal of Plant Interactions*, 1(1), 23-30. doi: 10.1080/17429140500134334
- Steinkellner, S., & Mhammerler, R. (2007). Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Interactions*, 2(1), 17-23. doi: 10.1080/17429140701409352
- Steinkellner, S., Mhammerler, R., & Vierheilig, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 122(3), 395-401. doi: 10.1007/s10658-008-9306-1