

# Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions

## Evaluación de antagonistas microbianos y aceites esenciales en el control de *Sclerotium cepivorum* en ajo en condiciones controladas

Yimmy Alexander Zapata-Narváez\*, Magda Rocío Gómez-Marroquín, Blanca Lucia Botina-Azain. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia. \*Autor para correspondencia: jzapatan@agrosavia.co

Recibido: 04 de Febrero, 2020.

Aceptado: 31 de Marzo, 2020.

Zapata-Narváez YA, Gómez-Marroquín MR and Botina-Azain BL. 2020. Evaluation of microbial antagonists and essential oils to control *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 182-197.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-2

Primera publicación DOI: 08 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 08, 2020.

**Resumen.** La pudrición blanca producida por *Sclerotium cepivorum* es la principal limitante del cultivo de ajo en Colombia, causando pérdidas superiores al 50%. La ausencia de semilla de calidad contribuye a su diseminación e infestación en áreas de siembra, siendo la principal estrategia de control la aplicación de fungicidas, por ende, es necesario integrar alternativas de manejo orientadas a su sostenibilidad. Así, el objetivo de este estudio fue determinar bajo condiciones controladas el potencial de control de *S. cepivorum* con antagonistas

**Abstract.** White rot produced by *Sclerotium cepivorum* is the main limitation to garlic production in Colombia causing losses that exceed 50%. The absence of quality seed contributes to its dissemination and infestation in sowing areas, the main control strategy is the application of fungicides; therefore, it is necessary to integrate management alternatives that promote its sustainability. Thus, the objective of this study was to determine under controlled conditions the potential of control for *S. cepivorum* with microbial antagonists and essential oils. The effect on the pathogen's growth was determined in PDA supplemented with each oil and for the antagonists its ability to degrade sclerotia. In soil infested with sclerotia was determined the effect on incidence and mortality reduction with the applications of the antagonists and selected oils. The results showed that exposure to eucalyptus (10,000 ppm) and oregano (200; 250 ppm) oils inhibited by 92% growth of the pathogen, while antagonists colonized more than 95% of sclerotia, causing their degradation. While in infested soil

microbianos y aceites esenciales. Se determinó en PDA suplementado con cada aceite el efecto sobre el crecimiento del patógeno y para los antagonistas su capacidad para degradar esclerocios. Igualmente, en suelo infestado con esclerocios se determinó el efecto de las aplicaciones de los antagonistas y aceites seleccionados sobre la reducción de incidencia y mortalidad. Los resultados mostraron que la exposición al aceite de eucalipto (10000 ppm) y orégano (200; 250 ppm) inhibió en un 92% el crecimiento del patógeno; en tanto, que los antagonistas colonizaron más del 95% de los esclerocios, provocando su degradación. Mientras que en suelo infestado presentaron un control entre 30 al 70%, siendo *Trichoderma asperellum* Th034 el que presentó la menor incidencia y mortalidad (21%).

**Palabras clave:** Esclerocio, parasitismo, crecimiento, incidencia, mortalidad.

El ajo (*Allium sativum*) es una hortaliza de gran importancia en el mundo, utilizada principalmente como condimento, pero en medicina por su contenido de adenosina y ajoeno se usa como antioxidante, así como para reducir el bloqueo de las arterias, la presión arterial y el colesterol (Ramírez *et al.*, 2016), y en el control de plagas se usa como insecticida por su acción repelente (Plata *et al.*, 2017). A pesar de esto, en Colombia en la última década su cultivo ha disminuido pasando en 2013 de 527 ha a 231 ha en 2018 con una reducción en la producción de 9.309 t a 2.991 t (AGRONET, 2019), comportamiento que se asocia a la diseminación e incremento de problemas fitosanitarios, siendo la mayor limitante la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* (Prato, 2016).

Este patógeno exclusivamente afecta a las especies del género *Allium*, distribuyéndose en todas las regiones donde éstas se cultivan, disminuyendo

they showed a control between 30 and 70%, being *Trichoderma asperellum* Th034 which presented the lowest incidence and mortality (21%).

**Key words:** Sclerotia, parasitism, growth, incidence, mortality.

Garlic (*Allium sativum*) is a greatly important vegetable around the world that is most commonly used as a condiment or seasoning. However, because of its adenosine and ajoene content, garlic is used in medical treatments as an antioxidant and to reduce arterial blockages, blood pressure and cholesterol (Ramírez *et al.*, 2016); it is also used for controlling plant pests because of its repellent action (Plata *et al.*, 2017). However, in Colombia garlic production has decreased in the last decade from 527 ha in 2013 to 231 ha in 2018, and production decreased from 9,309 tons to 2,991 tons (AGRONET, 2019). This result is associated with disease and phytosanitary issues, with white rot caused by the *Sclerotium cepivorum* fungus (Prato, 2016) being the greatest constraint.

This pathogen affects only species of the *Allium* genus in all the regions where they are cultivated and reduces production and causes losses of more than 50%, thus being the greatest limitation of this genus (Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). *Sclerotium cepivorum* produces sclerotia, which are resistance structures that can remain viable for more than 20 years in the soil, as well as its primary inoculum; as a result, infested fields are not suitable for cultivating garlic or any other susceptible alliaceous species (Velásquez *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). White rot is mainly controlled using chemical synthesis fungicides such as Benomyl and Tebuconazole, whose continuous use can cause resistance problems, reduce soil microbiota, and

su producción, ya que puede causar pérdidas superiores al 50%, siendo así la mayor limitante de este género (Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). *Sclerotium cepivorum* produce esclerocios, estructuras de resistencia que pueden permanecer viables en el suelo por más de 20 años, así como su inóculo primario, de esta manera los campos infestados quedan arruinados para el cultivo de ajo o cualquier otra aliacea susceptible (Velásquez *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). El manejo de la pudrición blanca se realiza principalmente con fungicidas de síntesis química como Benomil y Tebuconazol, cuyo uso continuo puede generar problemas de resistencia, reducción de la microbiota del suelo, además de ser un riesgo para la salud humana (Pérez *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2017). De acuerdo con esto y con una visión sostenible del cultivo, es prioritario evaluar e integrar al manejo de la enfermedad, alternativas eficientes que tengan un bajo impacto ambiental, en este sentido, el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas o aceites esenciales pueden constituirse como herramientas en estrategias de manejo integrado de la pudrición blanca (Lourenço *et al.*, 2018).

Especies de los géneros *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. o *Pseudomonas* sp., se destacan en el control biológico de fitopatógenos por su amplia distribución y sus diferentes mecanismos de acción. En el mercado se encuentran diferentes bioplaguicidas con registro de uso, los cuales, son utilizados para el control de patógenos del suelo o foliares, adicionalmente, algunas cepas tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, influyendo en el desarrollo y producción de las plantas (Schuster y Schmoll, 2010; Santoyo *et al.*, 2012), por lo cual pueden ser considerados en el desarrollo de estrategias de manejo integrado previa evaluación y selección.

put human health at risk (Pérez *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2017). Based on the above and with a view to achieving sustainable garlic production, evaluating and integrating effective and low-environmental impact alternatives for disease management is a priority. In this regard, biological control using antagonistic microorganisms or essential oils can be included as a tool in integrated management strategies for controlling white rot (Lourenço *et al.*, 2018).

Species of the *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. or *Pseudomonas* sp., genera are considered to be effective for biological control of phytopathogens because of their wide distribution and different control mechanisms. Soil or foliar pathogens are controlled using commercial biopesticides registered for use; some of these strains are also able to promote plant growth by influencing plant development and production (Schuster and Schmoll, 2010; Santoyo *et al.*, 2012). For this reason, after being evaluated and selected, they can be used in the development of integrated management strategies.

Essential oils can also be obtained from cinnamon, eucalyptus and oregano plants that are known to have antimicrobial properties against pathogens, including *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, particularly because they produce compounds based on phenols, tannins or terpenes that act upon the pathogens' growth or metabolism (Gurjar *et al.*, 2012; Kottarachchia *et al.*, 2012). In view of this, the objective of this study was to determine, under controlled conditions, the potential use of *Trichoderma koningiopsis* (Th003) and *T. asperellum* (Th034) fungi; *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) and *Pseudomonas fluorescens* (Pf014) bacteria; and essential cinnamon, clove, eucalyptus, lemon, oregano and thyme oils to control *S. cepivorum*.

En el mismo sentido se encuentran aceites esenciales obtenidos de plantas como canela, eucalipto y orégano, los cuales presentan propiedades antimicrobianas contra patógenos como *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum*, particularmente por presentar compuestos a base de fenoles, taninos o terpenos los cuales presentan acción sobre el crecimiento o el metabolismo de los patógenos (Gurjar *et al.*, 2012; Kottarachchia *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, el objetivo de este estudio fue determinar bajo condiciones controladas el potencial de uso en el control de *S. cepivorum* para el cultivo de ajo de los hongos *Trichoderma koningiopsis* (Th003), *T. asperellum* (Th034), las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) y *Pseudomonas fluorescens* (Pf014) y de los aceites esenciales de canela, clavo, eucalipto, limón, orégano y tomillo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.

**Material vegetal.** Se usaron bulbillos sanos de ajo morado obtenida de un cultivo comercial, previó a su uso, la semilla se desinfectó mediante lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 2% (NaCl) por tres min y tres lavados con agua estéril.

**Microorganismos.** El patógeno utilizado correspondió al aislamiento S10 de *S. cepivorum*, aislado de una planta de ajo con signos de la enfermedad colectada de un foco de plantas enfermas en un cultivo del municipio de Sopo (departamento de Cundinamarca), obteniendo su inóculo a partir de la producción y cosecha de esclerocios en cultivos del hongo en Agar Papa Dextrosa (PDA Oxoid®), incubados a 18 °C durante 24 días. Los esclerocios

## MATERIALS AND METHODS

This research was conducted in the Agricultural Microbiology Laboratory of Tibaitatá Research Center of the Colombian Corporation for Agricultural Research (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA).

**Plant material.** Healthy purple garlic bulbils obtained from a commercial crop were used. Before using the seed, it was washed with a 2% sodium hypochlorite (NaCl) solution for three min and then washed three times with sterile water.

**Microorganisms.** The pathogen used in the experiment was an *S. cepivorum* S10 isolate obtained from a garlic plant with disease signs collected from a plot of infected plants in a garlic field in Sopo municipality (Department of Cundinamarca). The pathogen's inoculum was obtained from sclerotia produced in and harvested from a potato-dextrose-agar (PDA Oxoid®) culture medium incubated at 18 °C for 24 days. Sclerotia were harvested by scraping the culture medium and stored in Falcon tubes; when used, they were washed with 2% NaCl and dried at 30 °C for 24 h. Regarding the antagonistic microorganisms, AGROSAVIA's Microorganism Germplasm Bank provided *T. asperellum* Th034 and *P. fluorescens* Pf014 strains, which were then sown in a PDA culture medium and Luria Bertani (LB) broth, respectively. Tricotec® biofungicide based on *T. koningiopsis* Th003 strain and one formulation prototype based on the *B. amyloliquefaciens* Bs006 strain (developed by Agrosavia) were also used. The inoculum consisted of suspensions in water at concentrations of  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> for fungi, and  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup> for bacteria.

**Essential oils.** Based on a literature review, essential cinnamon, clove, eucalyptus, lemon,

se cosecharon mediante el raspado del medio, se almacenaron en tubos Falcon y cuando se utilizaron fueron desinfectados mediante lavado con NaCl al 2%, secándolos a 30 °C por 24 horas. En cuanto a los microorganismos antagonistas, el Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA proporcionó la cepa Th034 de *T. asperellum* y la cepa Pf014 de *P. fluorescens*, cuya producción se realizó en PDA y caldo Luria Bertani (LB), respectivamente. Igualmente se utilizó el biofungicida Tricotec® a base de *T. koningiopsis* cepa Th003 y un prototipo de formulación a base de *B. amyloliquifaciens* cepa Bs006 (desarrollados por Agrosavia). El inóculo consistió en suspensiones en agua a concentraciones de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  para hongos y  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para bacterias.

**Aceites esenciales.** De acuerdo con una revisión de literatura se seleccionaron por su potencial de control sobre *S. cepivorum* los aceites esenciales de canela, clavo, eucalipto, limón, orégano y tomillo. El aceite de orégano fue producido en Agrosavia (anteriormente Corpoica) por Betancourt *et al.* (2012), mientras que el resto de los aceites se obtuvo de concentrados comerciales.

**Actividad sobre la degradación de esclerocios.** Para determinar la capacidad de los antagonistas para degradar los esclerocios de *S. cepivorum*, se modificó la metodología descrita por Clarkson *et al.* (2002), para lo cual se dispusieron 100 esclerocios en bolsas de muselina de 1  $\text{cm}^2$ , ubicándolos posteriormente a una profundidad de 2 cm en recipientes plásticos de 6 onzas que contenían una mezcla estéril de suelo y arena (3:1), inmediatamente se realizó la inoculación del sustrato mediante la aplicación de 10 mL de las suspensiones de cada microorganismo en las concentraciones ya descritas. Durante el período de evaluación se realizó el riego de los recipientes cada tres días para conservar su humedad.

oregano and thyme oils were selected because of their potential to control *S. cepivorum*. Essential oregano oil was produced in Agrosavia (previously known as Corpoica) by Betancourt *et al.* (2012), and the other oils were obtained from commercial concentrates.

**Activity on sclerotia degradation.** To determine the ability of antagonistic microorganisms to degrade *S. cepivorum* sclerotia, a modified version of the methodology described by Clarkson *et al.* (2002), was used, by placing 100 sclerotia in 1  $\text{cm}^2$  muslin bags, which were later placed at a depth of 2 cm in 6-ounce plastic containers filled with a sterile mixture of soil and sand (3:1). This substrate was immediately inoculated with 10 mL of the suspension of each microorganism at the previously described concentrations. During the evaluation period, the containers were irrigated every other day to keep the soil moist.

After 30 days, the muslin bags were collected; 30 sclerotia were taken from each and sown in petri dishes containing PDA medium culture or Luria Bertani (LB) agar, according to the treatment that was used. Then, the petri dishes were incubated at 18 °C for six days in order to determine their viability or parasitism. The remaining sclerotia were observed under a stereoscope to identify any damage in their structure. The trial was conducted in a greenhouse at 23 °C using a completely randomized design where the experiment unit consisted of one container with one bag with three replications; sclerotia with no treatment were used as a control.

**Effect of essential oils on *S. cepivorum* in vitro growth.** Essential oils were evaluated at three concentrations (Table 1) with Tebuconazole (1 L /200 L) as a chemical control and one absolute control. For this, the PDA was supplemented with each oil at the specified concentration, placed in

Después de 30 días se colectaron las bolsas de muselina, tomando de cada una, 30 esclerocios, los cuales se sembraron en cajas Petri con PDA o agar Luria Bertani (LB) de acuerdo con el tratamiento aplicado. Posteriormente, las cajas Petri fueron incubadas a 18 °C durante seis días para determinar su viabilidad o parasitismo; los esclerocios restantes se observaron al estereoscopio para identificar daños en su estructura. El ensayo se realizó en un invernadero a 23 °C bajo un diseño completamente al azar donde la unidad experimental consistió en un recipiente con una bolsa teniendo tres repeticiones, como control se utilizaron esclerocios sin tratamiento.

**Efecto de aceites esenciales sobre el crecimiento de *S. cepivorum* in vitro.** Se evaluaron los aceites esenciales en tres concentraciones (Cuadro 1) con el fungicida Tebuconazol (1 L / 200 L) como control químico y un testigo absoluto. Para esto, se suplementó el PDA con cada aceite en la concentración determinada sirviéndolos en cajas Petri, posteriormente se realizó la siembra de un disco de agar de 5 mm con micelio de *S. cepivorum* (obtenido de un cultivo en PDA de 12 días) en el centro de la caja, se incubó a 18 °C durante 12 días, período en el que se registró el crecimiento y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de colonias en presencia de los aceites, calculado en relación al control, una vez el hongo cubrió la totalidad de la caja Petri, aplicando la fórmula de Philippe *et al.* (2012) citado por Gakuubi *et al.* (2017),  $ICM(\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$ ; donde: *dc*= Diámetro de la colonia del patógeno en el control, y *dt*= Diámetro de la colonia del patógeno en el tratamiento.

**Control de *S. cepivorum* en condiciones controladas.** La evaluación se desarrolló en macetas plásticas de 0.5 L de capacidad en la que se sembró un

petri dishes, and then sown in a 5-mm agar disk with *S. cepivorum* mycelium (obtained from a 12-day PDA culture medium) in the middle of the dish, incubated at 18 °C for 12 days, a period during which the percent inhibition of the mycelial growth (ICM) of the colonies in the presence of oils was recorded. The percentage was calculated in relation to the control once the fungus completely covered the petri dish. The calculation was made using the formula of Philippe *et al.* (2012) cited by Gakuubi *et al.* (2017),  $ICM(\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$ ; where: *dc*= diameter of the pathogen's colony in the control, and *dt*= diameter of the pathogen's colony in the treatment.

**Control of *S. cepivorum* under controlled conditions.** The evaluation was performed in 0.5-L plastic pots in which one garlic bulbil was sown. The concentration of *S. cepivorum* used was 200 sclerotia per gram of soil (selected from previous unpublished studies because the level of mortality obtained was 83%). The bulbils were immersed in the suspensions of microorganisms, essential oils and Tebuconazole for 10 min, and then sown in pots to which 20 mL of each suspension were added in drench, according to the treatment. Two

**Cuadro 1. Aceites esenciales y concentraciones evaluadas en la inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum* in vitro.**

**Table 1. Essential oils and concentrations evaluated to inhibit *Sclerotium cepivorum* in vitro growth.**

| Aceites esenciales                   | Concentración (ppm) |       |       |
|--------------------------------------|---------------------|-------|-------|
|                                      | 1                   | 2     | 3     |
| Canela ( <i>Cinnamomum verum</i> )   | 150                 | 200   | 250   |
| Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) | 250                 | 500   | 750   |
| Eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> sp.)   | 7000                | 10000 | 15000 |
| Limón ( <i>Citrus limon</i> )        | 200                 | 400   | 600   |
| Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )  | 150                 | 200   | 250   |
| Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )   | 200                 | 400   | 800   |

bulbillo de ajo, la concentración de *S. cepivorum* utilizada correspondió a 200 esclerocios por gramo de suelo (seleccionada en estudios previos no publicados por obtener una mortalidad del 83%). Se realizó la inmersión de los bulbillos durante 10 min en las suspensiones de microorganismos, aceites esenciales y Tebuconazol, posteriormente se sembraron en las macetas y en cada una se aplicó en drench 20 mL de las suspensiones según el tratamiento. Se efectuaron dos aplicaciones más en drench con una frecuencia de 15 días, manteniendo el ensayo por 90 días (aunque el ciclo del cultivo esta entre los cinco y seis meses, la enfermedad puede presentarse en cualquier momento). El ensayo se estableció mediante un diseño completo al azar, la unidad experimental constó de ocho macetas con tres repeticiones; se contó con un testigo inoculado con el patógeno y un control sin inocular, las cuales se mantuvieron en una casa de malla con riego diario a una temperatura promedio en el día de 20 °C, las variables evaluadas fueron la incidencia de la enfermedad (número de plantas con síntomas sobre el número total de plantas multiplicado por 100) y la mortalidad de la enfermedad (número de plantas muertas sobre el número total de plantas multiplicado por 100).

**Análisis estadístico.** Para cada bioensayo los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ), empleando el software estadístico Statistix 10.0.

## RESULTADOS

**Actividad sobre la degradación de esclerocios.** A partir de los esclerocios recuperados y sembrados en los medios de cultivo se obtuvieron colonias de los antagonistas, para las cepas de *Trichoderma* se

more applications in drench were applied every 15 days and the experiment was continued for 90 days (although the crop cycle lasts between five and six months, the disease may occur at any time). The experiment was established using a completely randomized design and the experiment unit consisted of eight pots with three replications. A control inoculated with the pathogen and one non-inoculated control were kept in a mesh house and irrigated daily at an average temperature of 20 °C. The evaluated variables were disease incidence (number of plants with symptoms over the total number of plants multiplied x 100) and the disease mortality (number of dead plants over the total number of plants multiplied x 100).

**Statistical analysis.** The data of each bioassay were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) and the Statistix 10.0 statistical software.

## RESULTS

**Activity on sclerotia degradation.** Using the sclerotia that were recovered and sown in culture medium, colonies of the antagonists were obtained. In the *Trichoderma* strains, growth was observed from 100% of the sclerotia, while in the bacteria, growth was observed from 95% of the sclerotia. No *S. cepivorum* growth was observed in any of them (Figure 1A). Regarding the sclerotia of the control, they did not show infection when germinated in PDA, and *S. cepivorum* colonies were obtained. On the other hand, observation of the sclerotia of each treatment under a stereoscope showed that all the antagonists caused partial degradation of sclerotia, because of the loss of their structural stability (Figure 1B) which prevented the pathogen from growing from those structures.

observó crecimiento a partir del 100% de los esclerocios, en tanto que para las bacterias el crecimiento se observó a partir del 95% de los esclerocios, en todos los casos no se evidenció crecimiento de *S. cepivorum* (Figura 1A). En cuanto a los esclerocios del control, no presentaron infección germinando en el PDA, obteniendo colonias de *S. cepivorum* a partir de ellos. Por otra parte, la observación de los esclerocios de cada tratamiento al estereoscopio mostró que todos los antagonistas causaron la degradación parcial de los esclerocios, de acuerdo con la pérdida de su estabilidad estructural (Figura 1B) impidiendo el crecimiento del patógeno a partir de dichas estructuras.

**Efecto de aceites esenciales sobre el crecimiento de *S. cepivorum* in vitro.** En el agar PDA suplementado con los aceites de clavo, limón en las tres concentraciones y tomillo (200 y 400 ppm) se obtuvo una inhibición del crecimiento entre el 2

**Effect of essential oils on *S. cepivorum* in vitro growth.** In PDA agar supplemented with essential clove and lemon at the three concentrations, and thyme oils (200 and 400 ppm), growth inhibition was 2-12%, with no significant differences compared to the control. Conversely, in PDA agar supplemented with essential eucalyptus and oregano oils (200 and 250 ppm) and Tebuconazole, growth inhibition was higher than 92%; with essential cinnamon, oregano (150 ppm) and thyme oils (800 ppm), growth inhibition was 50-86% (Figure 2).

**Control of *S. cepivorum* under controlled conditions.** The evaluated treatments showed they could control the pathogen, except for essential oils, particularly eucalyptus oil, which had a negative effect on bulbils (data not shown), apparently due to a phytotoxic effect that caused necrosis on the tissue and affected germination. When oregano oil

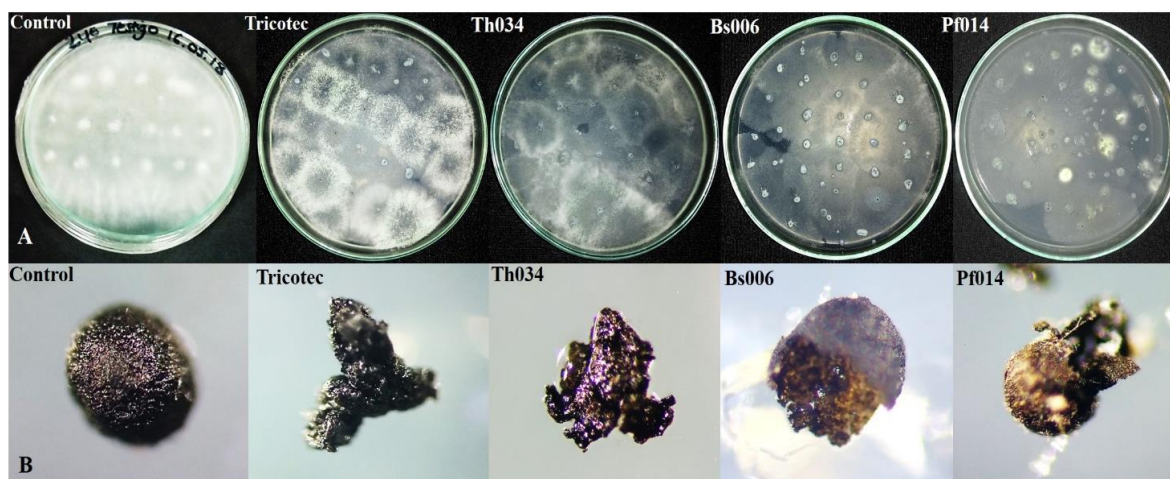


Figura 1. A. Crecimiento de los antagonistas a partir de los esclerocios inoculados. B. Degradación de los esclerocios por los antagonistas. Control (tratamiento sin aplicación de antagonistas), Tricotec (biofungicida a base de *T. koningiopsis* cepa Th003), Th034 (*T. asperellum* cepa Th034), Bs006 (*B. amyloliquefaciens* cepa Bs006), Pf014 (*P. fluorescens* cepa Pf014).

Figure 1. A. Antagonist growth from inoculated sclerotia. B. Sclerotia degradation caused by the antagonists. Control (treatment with no application of antagonists), Tricotec (biofungicide based on *T. koningiopsis* Th003 strain), Th034 (*T. asperellum* Th034 strain), Bs006 (*B. amyloliquefaciens* Bs006 strain), Pf014 (*P. fluorescens* Pf014 strain).



y 12%, sin presentar diferencias significativas con respecto al control; en contraste, con eucalipto, orégano (200 y 250 ppm) y Tebuconazol, la inhibición superó el 92%, con los aceites de canela, orégano (150 ppm) y tomillo (800 ppm) se inhibió el crecimiento entre un 50 y 86% (Figura 2).

was applied, the performance was similar to the pathogen's treatment, and even caused significant statistical differences (Figure 3).

The lowest level of disease incidence (21%) was obtained with *T. asperellum* Th034, as well as the greatest amount of healthy or asymptomatic

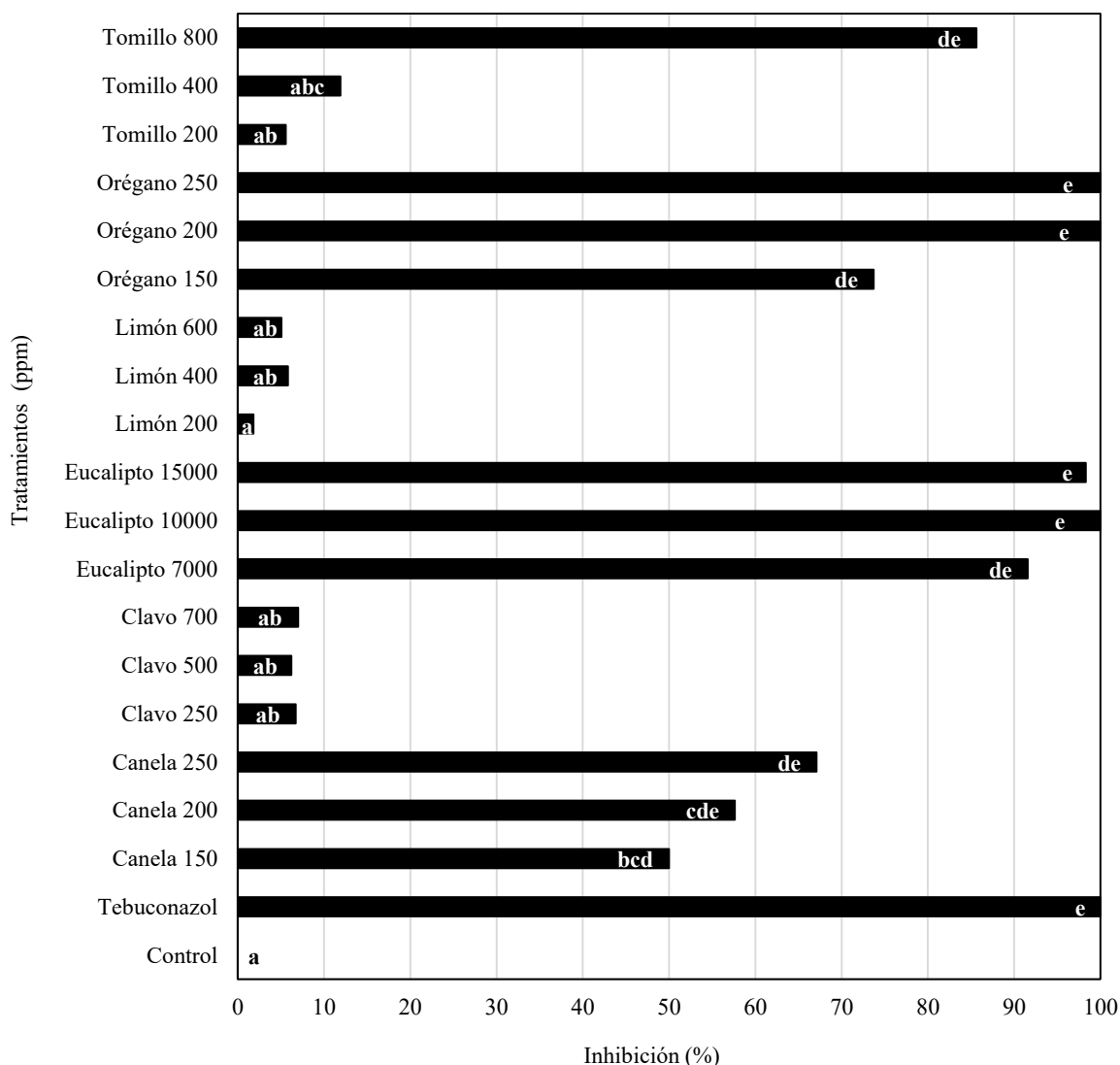
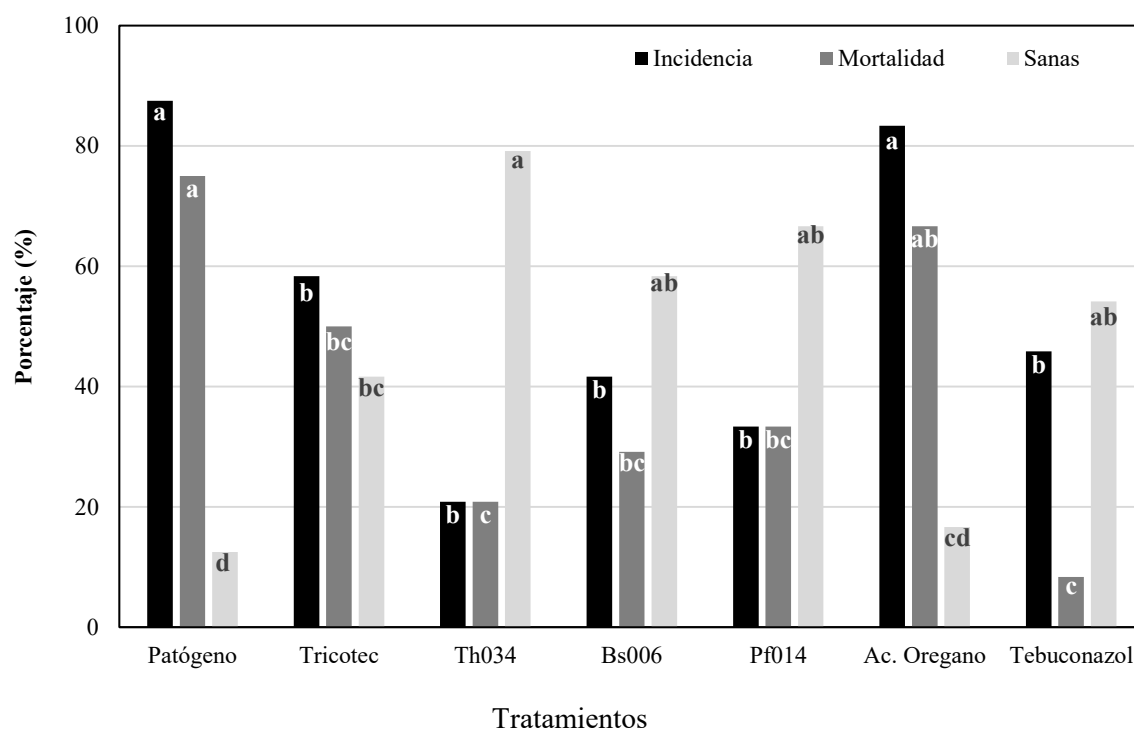


Figura 2. Inhibición del crecimiento de *S. cepivorum* en medio suplementado con aceites esenciales después de 12 días de incubación a 18 °C. Valores con las mismas letras no presentan diferencias significativas para la prueba de Tukey (\*= $P>0.05$ ).

Figure 2. Inhibition of *S. cepivorum* growth in a culture medium supplemented with essential oils after 12 days of incubation at 18 °C. Values with the same letters do not have significant differences according to Tukey's test (\*= $P>0.05$ ).

**Control de *S. cepivorum* en condiciones controladas.** Los tratamientos evaluados, mostraron actividad de control del patógeno a excepción de los aceites esenciales, particularmente el aceite de eucalipto, en el cual se mostró un efecto negativo sobre los bulbillos (Datos no mostrados), al parecer por un efecto fitotóxico que provocó necrosis del tejido afectando su germinación. Con las aplicaciones del aceite de orégano se obtuvo un comportamiento similar al observado en el tratamiento patógeno, incluso presentando diferencias estadísticas significativas (Figura 3).

plants (79%) (Figure 3), while when bacteria were applied, the performance was similar to that of the tebuconazole application, with no significant differences between them, though in numerical terms the disease incidence was lower and the percentage of healthy plants increased with the bacteria (Figure 3). On the other hand, the treatment with *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec®) was the least effective for reducing the disease incidence and mortality (Figure 3). The plants of the control that were not inoculated did not show signs or symptoms of white rot.



**Figura 3. Incidencia, mortalidad y de plantas sanas de ajo por tratamiento después de 90 días de evaluación. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*= P>0.05).**

**Figure 3. Incidence, mortality and healthy garlic plants per treatment after being evaluated for 90 days. Columns with the same letter are not significantly different according to Tukey's test (\*= P>0.05).**

La menor incidencia de la enfermedad con un 21% se obtuvo con las aplicaciones de *T. asperellum* Th034, así como la mayor cantidad de plantas sanas o asintomáticas con un 79%, (Figura 3); mientras que, con las aplicaciones de las bacterias se obtuvo un comportamiento similar a las aplicaciones de Tebuconazol, sin presentar diferencias significativas entre sí, aunque numéricamente la incidencia de la enfermedad fue menor y el porcentaje de plantas sanas mayor en las bacterias (Figura 3). Por otra parte, el tratamiento con *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec®) fue el menos eficiente en la reducción de la incidencia y mortalidad de la enfermedad (Figura 3). Las plantas del control sin inocular no presentaron signos o síntomas de la pudrición blanca.

## DISCUSIÓN

La degradación de los esclerocios es una característica por considerar al momento de seleccionar un microorganismo antagonista ya que dichas estructuras pueden persistir durante décadas en los suelos limitando la producción y rendimiento de los cultivos de aliáceas (Metcalf *et al.*, 2004; Velásquez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015). Esta acción está relacionada principalmente con la capacidad del antagonista para producir metabolitos secundarios tóxicos y enzimas extracelulares, las cuales le posibilitarán acceder a los esclerocios como una fuente de nutrientes; en especies del género *Trichoderma* esta acción se relaciona con el micoparasitismo, involucrando la producción y secreción de enzimas como la  $\beta$  1-3 glucanasa,  $\beta$  1-6 glucanasa, N-acetylhexosaminidasa, polisacaridasas, proteasas y lipasas, las cuales intervienen en la degradación de la pared celular y su producción se ha reportado en cepas de *T. asperellum* y *T. koningiopsis* (Vinale *et al.*, 2008; Schuster y Schmoll, 2010;

## DISCUSSION

Sclerotia degradation is a characteristic considered when selecting an antagonistic microorganism, since sclerotia can survive in the soil for decades, thereby limiting Alliaceae production and crop yields (Metcalf *et al.*, 2004; Velásquez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015). This action is related mainly to the antagonist's ability to produce toxic secondary metabolites and extracellular enzymes, which will make it possible for it to access to sclerotia as a source of nutrients. In species of *Trichoderma* genus, this action is related to micoparasitism, involving production and secretion of enzymes, including  $\beta$  1-3 glucanase,  $\beta$  1-6 glucanase, N-acetylhexosaminidase, polysaccharides, proteases and lipases, which are involved in cell wall degradation and their production has been reported in *T. asperellum* and *T. koningiopsis* strains (Vinale *et al.*, 2008; Schuster and Schmoll, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015; Fuga *et al.*, 2016).

Similarly, *B. amyloliquifaciens* and *P. fluorescens* are known to produce  $\beta$  glucanases and chitinases, and *B. amyloliquifaciens* produces lipopeptides, including iturines, fengicines or fatty acids and phenols, for example, chloroxylenol, pentadecanoic acid, hexadecanoic acid, heptadecanoic acid, octadecanoic acid and pyrrole, with antifungal action against pathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* or *F. oxysporum*. The species *P. fluorescens* is known to produce hydrocyanic acid, pyrrolnitrin and siderophores responsible for antifungal activity on *Sclerotium rolfsii*, among others (Ganeshan and Arthikala, 2005; Shafi *et al.*, 2017; Vinodkumar *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2018).

In this regard, white rot control in this study could be related to the parasitism of sclerotia in the soil eventually mediated by the production of

Mukherjee *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015; Fuga *et al.*, 2016).

Igualmente, para *B. amyloliquefaciens* y *P. fluorescens* se conoce que producen  $\beta$  glucanasas y quitinasas; adicionalmente se sabe que *B. amyloliquefaciens* produce lipopéptidos como iturrinas y fengicinas o ácidos grasos y fenoles como cloroxilenol, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico y pirrol, con acción antifúngica contra patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* o *F. oxysporum*. En *P. fluorescens* se conoce que esta especie produce ácido cianhídrico, pyrrolnitrin y sideróforos responsables de la actividad antifúngica entre otros sobre *Sclerotium rolfsii* (Ganeshan y Arthikala, 2005; Shafi *et al.*, 2017; Vinodkumar *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2018).

En este sentido, es posible que el control de la pudrición blanca en este trabajo esté relacionada con el parasitismo de los esclerocios en el suelo mediada eventualmente por la producción de metabolitos secundarios, particularmente para *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034 se ha demostrado su actividad de control sobre patógenos que producen esclerocios; por ejemplo, se observó que el tratamiento previo a la siembra de tubérculos de papa con presencia de esclerocios de *Rhizoctonia solani* con dos formulaciones a base de estos hongos redujo la incidencia del patógeno en un 80%, en comparación con los tubérculos no tratados, cuya incidencia fue del 100% (Beltrán *et al.*, 2010).

De mismo modo, en el control de *S. sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* mediante el uso de Tricotec® se redujo en un 34% la incidencia del moho blanco en cultivos de lechuga en condiciones comerciales (Moreno *et al.*, 2010); para *T. asperellum* Th034 Smith *et al.* (2013) determinaron su capacidad para degradar esclerocios de *S. sclerotiorum*. Por otra parte, se ha demostrado que *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *P. fluorescens* Pf014 presentan actividad de control sobre *F. oxysporum* en plantas

secundary metabolites. Particularly, it has been demonstrated that *T. koningiopsis* Th003 and *T. asperellum* Th034 have control activity on pathogens that produce sclerotia. For example, it was observed that a pre-planting treatment of potato tubers infected with *Rhizoctonia solani* sclerotia with two formulations based on these fungi reduced the incidence of the pathogen by 80 % compared to non-treated tubers, whose incidence was 100 % (Beltrán *et al.*, 2010).

Similarly, in the control of *S. sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* using Tricotec® the incidence of white mold was reduced by 34% in commercial lettuce crops (Moreno *et al.*, 2010). For *T. asperellum* Th034, Smith *et al.* (2013) determined its ability to degrade *S. sclerotiorum* sclerotia. On the other hand, it has been demonstrated that *B. amyloliquefaciens* Bs006 and *P. fluorescens* Pf014 have control activity on *F. oxysporum* in cape gooseberry plants and increase their survival in the field, making it possible to harvest their fruits (Díaz *et al.*, 2012).

Regarding essential oils, it is necessary to bear in mind that their effect can be different on mycelium and sclerotia due to the resistance of these structures. Different studies have demonstrated the inhibitory effect that the essential oils have on phytopathogens. For example, Ranasinghe *et al.* (2002) described *Colletotrichum musae*, *Lasioidiplodia theobromae* and *Fusarium proliferatum* inhibition using clove oil at concentrations of 300-1100 ppm. Likewise, Barrera *et al.* (2009) reported 100 % inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* using clove, thyme and cinnamon oils at concentrations of 100, 150, 200, 250 and 300 ppm.

Although *S. cepivorum* growth was inhibited under *in vitro* conditions, no control of the disease was observed in the bioassay conducted in soil, particularly when oregano oil was used. This may be due to the fact that the oil did not have an effect on the sclerotia and that, when germination

de uchuva, aumentando en condiciones de campo la supervivencia de las plantas, permitiendo obtener cosecha a partir de estas (Díaz *et al.*, 2012).

Respecto a los aceites esenciales es necesario tener en cuenta que el efecto puede ser diferente sobre el micelio y en los esclerocios dada la resistencia de estas estructuras. Diferentes estudios han demostrado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de fitopatógenos de los aceites esenciales utilizados en la presente investigación, por ejemplo, Ranasinghe *et al.* (2002) describieron la inhibición de *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium proliferatum* mediante el uso del aceite de clavo en concentraciones de entre 300 - 1100 ppm; del mismo modo, Barrera *et al.* (2009) reportaron la inhibición del 100% sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* con los aceites de clavo, tomillo y canela en concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm.

A pesar de que en condiciones *in vitro* se observó la inhibición del crecimiento de *S. cepivorum*, en el bioensayo en el suelo no se evidenció el control de la enfermedad particularmente con las aplicaciones del aceite de orégano; es posible que esto se deba a que el aceite no tuvo un efecto sobre los esclerocios y que, al germinar, posiblemente el aceite ya se había degradado en el suelo. En contraste, el efecto fitotóxico observado con el aceite esencial de eucalipto en la concentración aplicada lo hace inviable para su uso en el cultivo de ajo, si bien se conoce que este aceite presenta propiedades pesticidas de amplio espectro ya que diferentes trabajos han demostrado su actividad como compuestos antimicrobianos afectando tanto bacterias como hongos, así como plaguicida, acaricida o herbicida (Batish *et al.*, 2008; Haouel *et al.*, 2015; Tomazoni *et al.*, 2017); en este sentido, es necesario evaluar

occurrido, el aceite ya había posiblemente degradado en el suelo. En contraste, el fitotóxico observado con el aceite esencial de eucalipto, a la concentración aplicada, hace que no sea viable para cultivos de ajo, aunque es bien conocido que este aceite tiene propiedades pesticidas de amplio espectro, ya que diferentes estudios han demostrado su actividad como compuesto antimicrobiano que afecta tanto a bacterias como a hongos, y como pesticida, acaricida y herbicida (Batish *et al.*, 2008; Haouel *et al.*, 2015; Tomazoni *et al.*, 2017). En este respecto, es necesario evaluar otras concentraciones o métodos de aplicación antes de usarlo como alternativa para controlar la pudrición blanca.

Aunque los resultados de este estudio muestran que los antagonistas reducen el impacto negativo de la enfermedad, antes de usarlos en el campo, se deben realizar más estudios para determinar los métodos y la frecuencia de aplicación, particularmente durante la preparación del suelo, con el fin de reducir el patógeno en el inóculo, de acuerdo con los resultados obtenidos por Velásquez *et al.* (2012), quien demostró que los esclerocios pueden moverse desde áreas profundas (20 a 40 cm) hacia la capa superior, y viceversa, durante la preparación del suelo.

## CONCLUSIONS

Aunque los aceites esenciales de orégano (200 y 250 ppm) y eucalipto inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum* en experimentos *in vitro*, cuando se aplicaron a bulbos y al suelo, el aceite de orégano tuvo un desempeño similar al del control, mientras que el aceite de eucalipto tuvo un efecto tóxico que afectó la germinación de los bulbos. Por el contrario, los microorganismos antagonistas redujeron la incidencia y la mortalidad de la enfermedad, y *T. asperellum* Th034 resultó ser el más efectivo.

otras concentraciones o formas de aplicación para considerar su uso como alternativa de control de la pudrición blanca.

Si bien los resultados muestran que los antagonistas reducen el impacto negativo de la enfermedad, para su uso en campo, es necesario realizar estudios que permitan determinar las formas y frecuencias de aplicación, particularmente su incorporación durante la etapa de preparación del terreno, con el objetivo de reducir el inóculo de patógeno, esto de acuerdo con los resultados obtenidos por Velásquez *et al.* (2012), quienes demostraron el potencial de movimiento de los esclerocios de zonas profundas (20 a 40 cm) a la capa superior y viceversa, durante la preparación del suelo.

## CONCLUSIONES

A pesar de que los aceites esenciales de orégano (200 y 250 ppm) y eucalipto inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum* en ensayos *in vitro*, al ser aplicados en los bulbillos y al suelo, el primero presentó un comportamiento similar al testigo patógeno mientras que el segundo presentó un efecto tóxico que afectó la germinación del bulbillito. En contraste con el uso de los microorganismos antagonistas se redujo la incidencia y mortalidad de la enfermedad destacando sobre todos a *T. asperellum* Th034 como el más eficiente.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA por la financiación del proyecto “Generación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de la pudrición blanca en aliáceas” que permitió el desarrollo del presente trabajo.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA for funding the project “Generación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de la pudrición blanca en aliáceas” that made it possible to conduct this study.

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

## LITERATURA CITADA

- AGRONET, 2019. Red de información y comunicación del sector Agropecuario Colombiano. Recurso en línea. Área, producción y rendimiento nacional por cultivo. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>. (Consulta octubre, 2019).
- Amin M, Tadele S and Thangavel S. 2014. White rot (*Sclerotium cepivorum*-Berk) an aggressive pest of onion and garlic in Ethiopia: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 6(1): 6-15. <https://doi.org/10.5897/JABSD2013.0210>
- Barrera L, Garduno C and García L. 2009. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal* 8(1): 17-21. <https://doi.org/10.3923/ppj.2009.17.21>
- Batish D, Singh H, Kohli R and Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256(12): 2166-2174. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Beltrán CR, Moreno CA, Blanco P, Villamizar L and Cotes AM. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP). *Bulletin*, 78, 223-227. [https://www.iobc-wprs.org/members/shop\\_en.cfm?mod\\_Shop\\_detail\\_producto=33](https://www.iobc-wprs.org/members/shop_en.cfm?mod_Shop_detail_producto=33)
- Betancourt LL, Ariza CJ and Afanador G. 2012. Efectos de la suplementación con aceites esenciales de Orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde. *Rev Colomb Cienc Pecu* 25 (2): 240-251. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324751>

- Clarkson JP, Payne T, Mead A and Whipps J.M. 2002. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology* 51(6): 735-745. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00787.x>
- Díaz A, Smith A, Mesa P and Zapata J. 2012. Avances en el control biológico de *Fusarium oxysporum*. Pp. 71-81. En: Díaz A. (Ed.), Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Bogotá, Colombia. 82 p. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12610/64218\\_64911.pdf?sequence=1#page=71](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12610/64218_64911.pdf?sequence=1#page=71)
- Fuga CAG, Lopes EA, Vieira BS y da Cunha WV. 2016. Efficiency and compatibility of *Trichoderma* spp., and *Bacillus* spp., isolates on the inhibition of *Sclerotium cepivorum* Científica 44(4):526-531. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n4p526-531>
- Gakuubi MM, Maina AW and Wagacha JM. 2017. Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* dehn., against selected *Fusarium* spp. *International journal of microbiology* 2017:1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/8761610>
- Ganeshan, G and Arthikala M. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*. 1(3):123-134. <https://doi.org/10.1080/17429140600907043>
- Gurjar MS, Ali S, Akhtar M and Singh KS. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* 3(3): 425-433. <https://doi.org/10.4236/as.2012.33050>
- Haouel S, Hedjal-Chebheb M, Kellouche A, Khoudja M.L, Boudabous A and Ben Jemâa M. 2015. Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using Eucalyptus essential oils. *Industrial Crops and Products*. 74. 551-556. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.072>
- Hussain W, Elzaawely AA, El Sheery NI, Ismail AA and El-Zahaby HM. 2017. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. *Environment, Biodiversity and Soil Security* 1(2017)101-107. <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2017.1547.1008>
- Kottarachchia NS, Sammania A, Kelaniyangoda DB and Samarasekara R. 2012. Anti-fungal activity of essential oils of Ceylon Eucalyptus species for the control of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(17): 2026-2035. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.720469>
- Ley N, Márquez I, Carrillo JA, León J, Cruz I, García RS and Allende R. 2018. Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Lourenço V Jr, Vieira BS, Lopes EA and Villalta ON. 2018. Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: Current knowledge and future directions for Brazil. *Científica* 46(3), 241-256. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2018v46n3p241-256>
- Metcalf DA, Dennis JC and Wilson CR. 2004. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Disease* 88(3): 287-291. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.3.287>
- Moreno CA, Cotes AM, Smith A, Beltrán C, Villamizar L, Gómez M and Santos A. 2010. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12768>
- Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg, G and Zeilinger S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian journal of microbiology*. 52(4): 522-529. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0308-5>
- Pérez ML, Villalpando MJJ, Castañeda CC and Ramírez MR. 2009. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(1):11-17. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a2.pdf>
- Pérez L, Belmonte JR, Núñez HG, Guzmán R. and Mendoza B. 2015. Sensibilidad *in vitro* de dos especies de *Sclerotinia* spp., y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 256-267. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00256-en.pdf>
- Plata A, Martínez L, Dos Santos M, Fernandes F, Wilcken C, Soares M, Serrão J and Zenuncio J. 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific reports*. 7: 46406 <https://doi.org/10.1038/srep46406>
- Prato AI. 2016. Evaluación financiera de ajo (*Allium sativum* L.) morado nacional y peruano en el altiplano Cundiboyacense, Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17(1):43-53. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:460](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:460)
- Ramírez H, Castro LN and Martínez E. 2016. Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). *Revista Salud y Administración*. 3(8): 39-47. [http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4\\_Efectos\\_Terapeuticos\\_Ajo.pdf](http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf)
- Ranasinghe L, Jayawardena B and Abeywickrama K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*. 35(3):208-211. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01165.x>
- Santoyo G, Orozco M and Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* 22(8): 855-872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Schuster A and Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology* 87(3): 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

- Shafi J, Tian H and Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31(3): 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shalaby M.E, Ghoniem K.E and El-Diehi M.A. 2013. Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of Microbiology* 63(4):1579-1589. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0621-1>
- Smith A, Beltrán C, Kusunoki M, Cotes A, Motohashi K, Kondo T and Deguchi M. 2013. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of general plant pathology*, 79(1): 74-85. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1>
- Tomazoni E, Pauletti G, Rute R, Sidnei M and Schwambach J. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*. 223: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>
- Velásquez R, Reveles M, Medina MM and Amador MD. 2012. Efecto de la Preparación del Suelo en la Dispersión de Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(2): 150-154. [http://rmf.smf.org.mx/Contenido\\_Vol\\_30\\_2\\_2012.html](http://rmf.smf.org.mx/Contenido_Vol_30_2_2012.html)
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E, Marra R, Woo S and Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vinodkumar S, Nakkeeran S, Renukadevi P and Malathi VG. 2017. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in microbiology* 8:446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00446>