

Original Article/Artículo Original

Sodium silicate and chitosan: an alternative for the *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from papaya (*Carica papaya* L.)

Silicato de sodio y quitosano: Una alternativa para el control *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya (*Carica papaya* L.)

Rayón-Díaz, E.¹, Birke-Biewendt, A. B.², Velázquez-Estrada, R. M.¹, González-Estrada, R. R.¹, Ramírez-Vázquez, M.³, Rosas-Saito, G. H.³, Gutiérrez-Martínez, P.^{1*}.

¹Tecnológico Nacional de México/I.T. Tepic. Av. Tecnológico No. 2595, Lagos del Country, 63175 Tepic, Nayarit, México.

²Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, Clúster Científico y Tecnológico BioMimic®, Instituto de Ecología, A.C. Carretera Antigua a Coatepec, No. 351, El Haya, 91073 Xalapa, Veracruz, México. ³Red de Estudios Moleculares Avanzados, Unidad de Microscopía Clúster Científico y Tecnológico BioMimic®, Instituto de Ecología, A.C. Carretera Antigua a Coatepec, No. 351, El Haya, 91073 Xalapa, Veracruz, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Rayón-Díaz, E., Birke-Biewendt, A. B., Velázquez-Estrada, R. M., González-Estrada, R. R., Ramírez-Vázquez, M., Rosas-Saito, G. H., Gutiérrez-Martínez, P. (2021). Sodium silicate and chitosan: an alternative for the *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from papaya (*Carica papaya* L.). *Revista Bio Ciencias* 8, e1059. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e1059>



ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides is one of the main fungi that attacks tropical and subtropical fruits. In this study, sodium silicate and chitosan were applied individually and in conjunction at different concentrations to evaluate their efficacy *in vitro* on mycelial growth and conidia sporulation. Besides, morphological changes on treated fungi were determined through scanning electron microscopy (SEM). Sodium silicate alone did not reduce *C. gloeosporioides* development, only a 9 % inhibition was recorded. In contrast, chitosan treatments ranging from 0.1 to 1.5 % showed the highest effectiveness and decreased fungal development the most (97–99 %). However, the combined treatments showed an additive effect, by inhibiting the mycelial development between 51–99 %. SEM micrographs showed morphological

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 09th 2020.

Accepted/Aceptado: March 22th 2021.

Available on line/Publicado: April 09th 2021.

*Corresponding Author:

Porfirio Gutiérrez-Martínez. Tecnológico Nacional de México/I.T. Tepic. Av. Tecnológico No. 2595, Lagos del Country, 63175 Tepic, Nayarit, México. Phone: (311) 211 9400 ext. 231. E-mail: pgutierrez@itttepic.edu.mx, <https://www.tepic.tecnm.mx/posgrado>

RESUMEN

Colletotrichum gloeosporioides es uno de los principales hongos que ataca a frutos tropicales y subtropicales. En este estudio, se aplicaron tratamientos de silicato de sodio y quitosano individualmente y en conjunto a diferentes concentraciones para evaluar su eficacia *in vitro* sobre el desarrollo micelial y esporulación de conidios. Además, los cambios morfológicos en los hongos tratados se determinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El silicato de sodio solo no redujo el desarrollo de *C. gloeosporioides*, registrando una inhibición del 9 %. Por el contrario, los tratamientos de quitosano que van del 0.1 a 1.5 % mostraron la mayor eficacia y la mayor disminución del desarrollo del hongo (97-99 %). Sin embargo, los tratamientos combinados mostraron un efecto aditivo, al inhibir el desarrollo micelial entre un 51-99 %. Las micrografías SEM mostraron alteraciones morfológicas en el micelio, como cambios de tamaño y presencia de deformaciones. Por tanto, estos tratamientos podrían utilizarse como alternativa ecológica en el control de *C. gloeosporioides* en frutos.

alterations in mycelium development, changes in size, and the presence of deformations. Therefore, these treatments could be used as an eco-friendly alternative in the control of *C. gloeosporioides* in fruits.

KEY WORDS

Alternative System, Biopolymer, GRAS compounds, Pathogen.

Introduction

Colletotrichum gloeosporioides (Penz & Sacc.) is considered an important pathogen that affects various tropical and subtropical fruits (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), some of the most affected fruits are: soursop (*Annona muricata* L.) (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018), mango (*Mangifera indica* L.) (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), papaya (*Carica papaya* L.) (Molina-Chaves *et al.*, 2017) and avocado (*Persea americana* Mill.) (Rodríguez-López *et al.*, 2009). The lack of protocols at post-harvest handling can favor infections by this fungus, leading to post-harvest fruit losses ranging from 10 to 50 % of total production (Torres-Calzada *et al.*, 2013). Conventionally, the use of fungicides that Benomyl, is the main strategy to reduce fungal infections by *C. gloeosporioides*, however resistance to the effect of these compounds has been reported (Ali & Mahmud, 2008). On the other hand, consumers are aware of the residuality of these chemical compounds in the environment and their negative impact on human health (Abd-Elsalam *et al.*, 2019). Due to the above-mentioned reasons, it is necessary to search for eco-friendly, safe, and effective alternative treatments. Thus, chitosan is a non-toxic, harmless, polycationic biopolymer with edible coating functionality, has been tested for the control of various fungi such as *C. gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* (soursop) (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018), *Colletotrichum sp.* (mango) (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), *Botryosphaeria sp.* (pear) (Wang *et al.*, 2017) and *Penicillium digitatum* Pers. y *Penicillium italicum* Pers. (citrus) (Al-Sheikh & Yehia, 2016) isolated from various tropical and subtropical fruits. The nanocomposite silica-chitosan has been also evaluated against gray mold (*Botrytis cinerea*) in table grapes (Youssef *et al.*, 2019). Sodium silicate is considered a GRAS compound (Palou, 2018), the efficacy of this salt

PALABRAS CLAVE

Sistemas alternativos, Biopolímero, Compuestos GRAS, Patógeno.

Introducción

Colletotrichum gloeosporioides (Penz & Sacc.), es considerado un patógeno importante que afecta diversos frutos tropicales y subtropicales (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), algunos de los más afectados son: la guanábana (*Annona muricata* L.) (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018), el mango (*Mangifera indica* L.) (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), la papaya (*Carica papaya* Penz. & Sacc.) (Molina-Chaves *et al.*, 2017) y el aguacate (*Persea americana* Mill.) (Rodríguez-López *et al.*, 2009). La falta de protocolos en el manejo postcosecha puede favorecer infecciones por este hongo, provocando pérdidas de frutos que oscilan entre el 10 y el 50 % de la producción total (Torres-Calzada *et al.*, 2013). Convencionalmente, el uso de fungicidas como el Benomilo, es una de las principales estrategias para reducir las infecciones fúngicas por *C. gloeosporioides*, sin embargo, se ha reportado resistencia al efecto de estos compuestos (Ali & Mahmud, 2008). Por otro lado, los consumidores son conscientes de la residualidad de estos compuestos químicos en el medio ambiente y su impacto negativo en la salud humana (Abd-Elsalam *et al.*, 2019). Por las razones antes mencionadas, es necesario buscar tratamientos alternativos que sean amigables con el ambiente, seguros y efectivos. En este sentido, el quitosano, es un biopolímero policatiónico, no tóxico, con la capacidad de formar un recubrimiento comestible, evaluado en el control de diversos hongos aislados de diversos frutos tropicales y subtropicales como: *C. gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer* (guanábana) (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018), *Colletotrichum sp.* (mango) (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017), *Botryosphaeria sp.* (pera) (Wang *et al.*, 2017) y *Penicillium digitatum* Pers. y *Penicillium italicum* Pers. (cítricos) (Al-Sheikh & Yehia, 2016). A su vez se evaluaron nanocompuestos de silicato-quitosano frente a moho gris (*Botrytis cinerea*) en uvas de mesa (Youssef *et al.*, 2019). El silicato de sodio es considerado un compuesto GRAS (Palou, 2018), la eficacia de este compuesto se ha reportado contra *Alternaria alternata* (melón) (Bi *et al.*, 2006), *Monilinia fructicola* (melocotón) (Pavanello *et al.*, 2016) (cítricos)

has been reported against *Alternaria alternata* (melon) (Bi et al., 2006), *Monilinia fructicola* (peach) (Pavanello et al., 2016), *G. citri-aurantii* (citrus) (Li et al., 2019), *Muscatillium theobromae* (banana) (Youssef et al., 2020) with good results. This research aimed to evaluate the effectiveness of chitosan and sodium silicate alone and in conjunction at different concentrations on *C. gloeosporioides* mycelial growth and sporulation. We also determined through scanning electron microscopy (SEM) the effect on the fungus hypha.

Material and Methods

Raw materials

Chitosan was purchased from America Natural Ingredients® (Food grade, DAC 90 %, Viscosity 50–200 mpa s⁻¹) and sodium silicate was purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Potato dextrose agar (Sigma-Aldrich®, USA) was used for the incorporation of the chitosan and sodium silicate in the *in vitro* assay.

Isolation of *C. gloeosporioides*

The fungus used in this work was obtained from a strain identified in previous works, it was reactivated by inoculating fruits and later its macro and microscopic identification was carried out with the help of dichotomous keys.

Preparation of sodium silicate and chitosan solutions

Chitosan solutions were prepared by adding 0.1 %, 0.5 %, 1 %, and 1.5 % (w / v) of chitosan in 100 mL of 2 % (v / v) glacial acetic acid. The solution was in constant agitation for 3 to 5 hours at room temperature and pH was adjusted to 5.6 by adding NaOH solution (1N) (González-Estrada et al., 2020). Sodium silicate solutions were prepared using the protocol proposed by Ge et al. (2017) with some modifications, the solutions were prepared by adding 0.5 %, 1 %, 1.5 %, and 2 % of sodium silicate in 100 mL of distilled water (v / v). The technique proposed by Guo et al. (2019) was used for the preparation of the combined treatments with some modifications, in previously prepared chitosan solutions (100 mL) at concentrations of 0.1 %, 0.5 %, 1 %, and 1.5 %, sodium silicate was added at different concentrations (0.5 %, 1 %, 1.5 %, and 2 %), the combined treatments were stabilized (pH of 5.6) with a NaOH solution (1N).

(Li et al., 2019), *Muscatillium theobromae* (plátano) (Youssef et al., 2020) con buenos resultados. El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad del quitosano y el silicato de sodio aplicados de manera individual y combinados a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *C. gloeosporioides*. Además, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó el efecto de los tratamientos sobre las hifas del hongo.

Material y Métodos

Materias primas

El quitosano se adquirió en America Natural Ingredients® (grado alimenticio, DAC 90 %, viscosidad 50–200 mpa s⁻¹) y el silicato de sodio se compró en Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Se utilizó agar papa dextrosa (Sigma-Aldrich®, EE. UU.) para la incorporación del quitosano y silicato de sodio en el ensayo *in vitro*.

Aislamiento de *C. gloeosporioides*

El hongo utilizado en este trabajo se obtuvo de una cepa identificada en trabajos anteriores, se reactivó inoculando frutos y posteriormente se realizó su identificación macro y microscópica con ayuda de claves dicotómicas.

Preparación de soluciones de silicato de sodio y quitosano

Se prepararon soluciones de quitosano a concentraciones de 0.1 %, 0.5 %, 1 % y 1.5 % (p/v) de quitosano en 100 mL de ácido acético glacial al 2 % (v/v). La solución se mantuvo en agitación constante de 3 a 5 horas a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 5.6 mediante la adición de NaOH (1N) (González-Estrada et al., 2020). Las soluciones de silicato de sodio se prepararon utilizando el protocolo propuesto por Ge et al. (2017) con algunas modificaciones, las soluciones se prepararon agregando 0.5 %, 1 %, 1.5 % y 2 % de silicato de sodio en 100 mL de agua destilada (v/v). La técnica propuesta por Guo et al. (2019) se utilizó para la preparación de los tratamientos combinados con algunas modificaciones, en soluciones de quitosano previamente preparadas (100 mL) a concentraciones de 0.1 %, 0.5 %, 1 % y 1.5 %, se agregó silicato de sodio a diferentes concentraciones (0.5 %, 1 %, 1.5 % y 2 %), los tratamientos combinados se estabilizaron (pH de 5.6) con una solución de NaOH (1N). El control positivo consistió en una solución de ácido acético al 2 % (pH 5.6) y un control negativo consistió en medio de cultivo PDA sin tratamiento.

The positive control consisted of a solution of 2 % acetic acid (pH 5.6) and a negative control consisted in PDA culture medium without treatments.

In vitro assays

Inhibition of mycelial growth

The radial measurement of the mycelial growth of the fungus was carried out following the protocol proposed by Gutiérrez-Martínez *et al.* (2017) with some modifications. Petri dishes that contained the treated chitosan (CHI), sodium silicate (Na_2SiO_3), and the combined CHI- Na_2SiO_3 PDA treatments were inoculated by placing PDA disks (3 mm of diameter) with the mycelium of the fungus ($n=3$, in duplicate). The mycelial growth development was recorded using a digital Vernier (Truper®). The results were expressed in percentage of inhibition.

Effects on sporulation

For sporulation, it was followed the protocol proposed by Cortés-Rivera *et al.* (2019), was added sterile distilled water (10 ml) in the Petri dishes of the mycelial growth test containing the fungus, then the fungal colony was rubbed using a sterile glass bar, the obtained solution was filtered with sterile gauze and transferred into tubes of 10 mL. Finally, a Neubauer chamber (Hausser Scientific®) was used to determine the number of spores/mL.

Evaluation of the interaction of Chitosan and Sodium silicate mixtures

The interaction of the combination of treatments was carried out according to the Abbott method, with the protocol proposed De Oliveira *et al.* (2017), considering factors such as concentration, the effect individual application of treatments and their combination, and the type of interaction. The following formula was used:

$$MGI\%_{exp} = (Treatment\ 1\%_{obs} + Treatment\ 2\%_{obs}) - (Treatment\ 1\%_{obs} * Treatment\ 2\%_{obs}/100)$$

Scanning electron microscopy (SEM)

The most effective treatments were selected to visualize their effect on the development of *C. gloeosporioides* by using scanning electron microscopy (SEM). We followed the method outlined in Ramos-

Ensayos in vitro

Inhibición del crecimiento micelial

La medición radial del crecimiento micelial del hongo se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Gutiérrez-Martínez *et al.* (2017) con algunas modificaciones, se inocularon con el hongo placas Petri que contenían el quitosano (CHI), silicato de sodio (Na_2SiO_3) y los tratamientos combinados de PDA CHI- Na_2SiO_3 colocando discos de PDA (3 mm de diámetro) con el micelio del hongo ($n= 3$, por duplicado). El desarrollo del crecimiento micelial se registró utilizando un vernier digital (Truper®). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición.

Efectos en la esporulación

Para la esporulación se siguió el protocolo propuesto por Cortés-Rivera *et al.* (2019), se añadió agua destilada estéril (10 mL) en las placas de Petri empleadas en la prueba de crecimiento micelial que contenía el hongo, luego se frotó la colonia del hongo utilizando una barra de vidrio estéril, la solución obtenida se filtró con una gasa estéril y se transfirió tubos de 10 mL. Finalmente, se utilizó una cámara de Neubauer (Hausser Scientific®) para determinar el número de esporas/mL.

Evaluación de la interacción de mezclas de quitosano y silicato de sodio

La interacción de la combinación de tratamientos se realizó empleando el método de Abbott, con el protocolo propuesto por De Oliveira *et al.* (2017), considerando factores como la concentración, el efecto de la aplicación individual de los tratamientos y su combinación así como el tipo de interacción. Se utilizó la siguiente fórmula:

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se seleccionaron los tratamientos más efectivos para observar su efecto sobre el desarrollo de *C. gloeosporioides* mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Seguimos el método descrito por Ramos-

Guerrero *et al.* (2018) with some modifications, samples of mycelial disks (3 mm) were cut from each treatment and placed in glass vials containing 3 mL of Karnovsky solution (pH 7.4) for 24 h at 4 °C, samples were agitated seven times manually during the first 7 hours and finally the samples left under refrigeration until complete the 24 h.

Statistical analysis

For the individual application of treatments, a completely randomized block design was applied. The generalized linear model was applied to know the growth kinetics of the pathogen during the incubation days of the combined treatments. Each experiment was repeated twice. The data obtained were analyzed by the ANOVA (Analysis of variance) and a Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied for the comparison of means using the software Statistica 10®.

Results y Discussion

Mycelial inhibition assay

The application of chitosan treatments showed a percentage of inhibition ranging from 97 to 99 % of *C. gloeosporioides* mycelial growth (Figure 1). According to the statistical analysis, significant differences ($p \leq 0.05$) were obtained compared to the sodium silicate, control, and negative control treatments (Table 1). The efficacy of chitosan is due to the interaction of free amino groups with structures of the pathogen and not by the presence of acetic acid, the stabilization of chitosan at pH (5.6) avoids the antifungal activity of acetic acid present in the chitosan solution, as previously reported (Hassan *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2003; Narendranath *et al.*, 2001). In this sense, with the application of acetic acid, only 11 % of mycelial growth inhibition was obtained. One of the main physicochemical properties of chitosan is its cationic property by generating electrostatic attractions, inducing changes in the permeability of the plasma membrane with the subsequent destabilization in vital functions of the pathogen, as previously reported (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2014; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Sodium silicate treatments showed unfavorable effects in controlling the development of the fungus (Figure 1). We only achieved

Guerrero *et al.* (2018) (*Annona muricata* con algunas modificaciones, de cada tratamiento se cortaron muestras de discos miceliales (3 mm) y se colocaron en viales de vidrio que contenían 3 mL de solución de Karnovsky (pH 7.4) durante 24 h a 4 °C, las muestras se agitaron siete veces manualmente durante las primeras 7 horas y finalmente las muestras se dejaron en refrigeración hasta completar las 24 h.

Análisis estadístico

Para la aplicación individual de los tratamientos se aplicó un diseño de bloques completamente al azar. Se aplicó el modelo lineal generalizado para conocer la cinética de crecimiento del patógeno durante los días de incubación de los tratamientos combinados. Cada experimento se repitió dos veces. Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA (análisis de varianza) y se aplicó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias utilizando el software Statistica 10®.

Resultados y Discusión

Ensayo de inhibición micelial

La aplicación de los tratamientos con quitosano mostró un porcentaje de inhibición que osciló entre el 97-99 % del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (Figura 1). De acuerdo al análisis estadístico, se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los tratamientos de silicato de sodio, el control positivo y el control negativo (Tabla 1). La eficacia del quitosano se debe a la interacción de los grupos amino libres con las estructuras del patógeno y no por la presencia de ácido acético, la estabilización del quitosano a pH (5.6) evita la actividad antifúngica del ácido acético presente en la solución de quitosano, previamente reportado (Hassan *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2003; Narendranath *et al.*, 2001). En este sentido, con la aplicación de ácido acético solo se obtuvo un 11 % de inhibición del crecimiento micelial. Una de las principales características fisicoquímicas del quitosano es su propiedad catiónica al generar atracciones electrostáticas, induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática desestabilización de las funciones vitales del patógeno, previamente reportado (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2014; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Los tratamientos de silicato de sodio mostraron resultados desfavorables en el control del desarrollo del hongo (Figura 1). Solo se

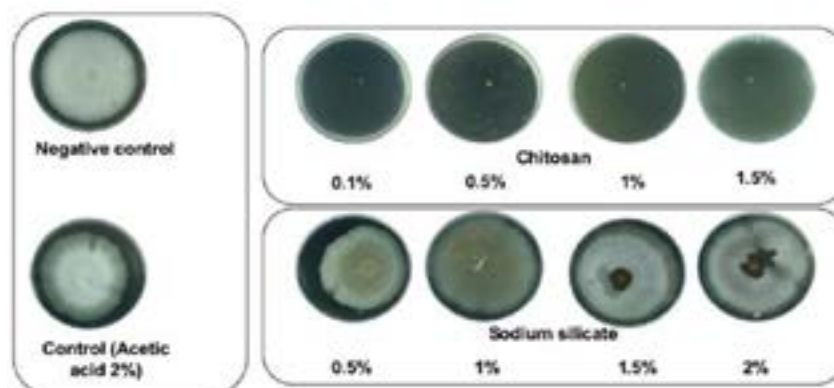


Figure 1. Effect of sodium silicate and chitosan at different concentrations on the mycelial growth of *C. gloeosporioides* at 10 days of incubation (27 ± 2 °C).

Figura 1. Efecto silicato de sodio y quitosano a diferentes concentraciones en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a los 10 días de incubación (27 ± 2 °C).

Table 1.

Effect of the application of sodium silicate and chitosan on the mycelial growth inhibition and sporulation of *C. gloeosporioides* incubated during 10 days at 27 ± 2 °C.

Tabla 1.

Efecto de la aplicación de silicato de sodio y quitosano en el porcentaje de inhibición y esporulación de *C. gloeosporioides* incubado durante 10 días a 27 ± 2 °C.

Treatments	Mycelial growth (% of inhibition)	Sporulation (spores*10 ⁶ /mL)
Negative control	0 ± 0 ^a	3.5 ± 2.86 ^e
Control	11.39 ± 10.67 ^a	0.4 ± 0.83 ^{abc}
Chitosan 0.1 %	99.3 ± 0.06 ^b	0 ^a
Chitosan 0.5 %	99.3 ± 0.15 ^b	0 ^a
Chitosan 1 %	99.3 ± 0.17 ^b	0 ^a
Chitosan 1.5 %	99.3 ± 2.02 ^b	0 ^a
Sodium silicate 0.5 %	9.87 ± 7.83 ^a	2.6 ± 0.44 ^{abc}
Sodium silicate 1 %	9.42 ± 4.36 ^a	0.6 ± 2.00 ^c
Sodium silicate 1.5 %	7.65 ± 0.55 ^a	0.9 ± 2.30 ^d
Sodium silicate 2 %	4.07 ± 0.66 ^a	2.7 ± 2.86 ^{de}

Data in the same column followed by different lower-case letters are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey test. Values are expressed as means ± standard deviation (n=3).

Los datos en la misma columna seguidos de diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

a 9 % mycelial inhibition (Table 1). These results are not following those reported by Ge *et al.* (2017) and Bi *et al.* (2006). Both authors reported fungicidal effectiveness by the sodium silicate application (100 mM) treatments against fungi *T. roseum* and *A. alternata*, respectively.

obtuvo inhibición del crecimiento micelial del 9 % (Tabla 1). Estos resultados no concuerdan con los reportados por Ge *et al.* (2017) y Bi *et al.* (2006). Ambos autores reportaron efectividad fungicida mediante la aplicación de silicato de sodio (100 mM) contra los hongos *T. roseum*

However, morphological changes in hypha development were noticed by SEM micrography (Figure 3D), Sodium silicate seems to cause hypha dehydration as part of its fungistatic mechanism, which is based on the pH modification in the medium (making it more alkaline) causing alterations in the plasma membrane and disorganized organelles, as previously reported (Niu *et al.*, 2016).

The combination of both treatments and concentration showed a significant effect ($p \leq 0.05$) on the mycelial development of the fungus compared with control and the negative control (Table 2). According to the Abott index (Table 3), the combinations of these treatments show an additive effect at all concentrations tested, these results are in agreement with the investigation of Guo *et al.* (2019), in their study an additive effect was obtained by the combination of chitosan and sodium silicate improving the effectiveness of both treatments by reducing the incidence of *A. alternata* up 50 % compared to control treatment.

y *A. alternata*, respectivamente. Sin embargo, los cambios morfológicos en el desarrollo de las hifas fueron evidenciados por SEM (Figura 3D), el silicato de sodio parece causar deshidratación de las hifas como parte de su mecanismo fungistático, que se basa en la modificación del pH en el medio (haciéndolo más alcalino) provocando alteraciones en la membrana plasmática y orgánulos desorganizados, previamente reportado (Niu *et al.*, 2016).

La combinación de tratamientos así como la concentración evaluada mostraron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el desarrollo micelial del hongo en comparación con el control y el control negativo (Tabla 2). Según el índice de Abbott (Tabla 3), las combinaciones de estos tratamientos muestran un efecto aditivo en todas las concentraciones evaluadas, estos resultados concuerdan con la investigación de Guo *et al.* (2019), en su estudio el efecto aditivo se obtuvo mediante la combinación de quitosano y silicato de sodio mejorando la efectividad de tratamientos aplicados de manera individual al reducir la incidencia de *A. alternata* hasta en un 50 % en comparación con el tratamiento control.

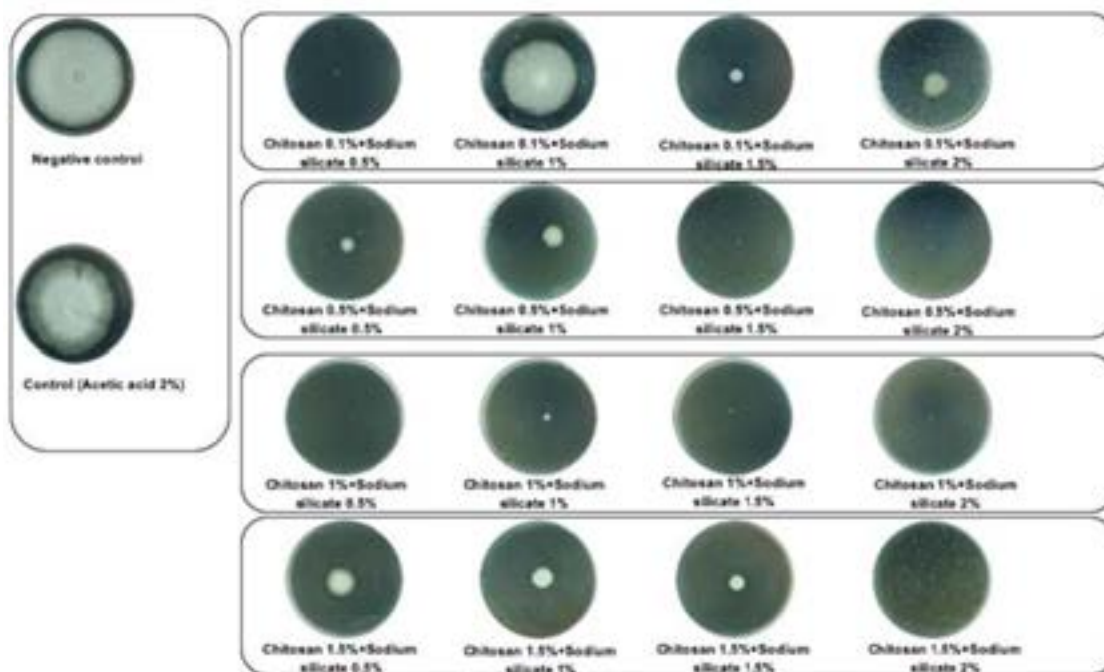


Figure 2. Effect of the combination of sodium silicate and chitosan on the mycelial development of *C. gloeosporioides* during 10 days of incubation (27 ± 2 °C).

Figura 2. Efecto de la combinación de silicato de sodio y quitosano en el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides* durante 10 días de incubación (27 ± 2 °C).

Table 2.
Effect of the combination treatments of sodium silicate and chitosan on the mycelial growth inhibition and sporulation of *C. gloeosporioides* incubated during 10 days at 27 ± 2 °C.

Tabla 2.
Efecto de la combinación de tratamientos de silicato de sodio y quitosano en el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial y esporulación de *C. gloeosporioides* durante 10 días de incubación a 27 ± 2 °C.

Treatments	Mycelial growth (% of inhibition)	Sporulation (spores*10 ⁶ /mL)
Negative control	0 ± 0 ^a	3.5 ± 2.86 ^e
Control (acetic acid 2 %)	11.39 ± 10.67 ^{ab}	0.4 ± 0.83 ^{abc}
Chitosan 0.1 %+ Sodium silicate 0.5 %	75.35 ± 33.28 ^{bc}	2.6 ± 1.67 ^d
Chitosan 0.1 % + Sodium silicate 1 %	75.65 ± 32.53 ^{bc}	0.6 ± 1.94 ^{abc}
Chitosan 0.1 % + Sodium silicate 1.5 %	64.46 ± 43.41 ^{abc}	0.9 ± 2.30 ^{bc}
Chitosan 0.1 %+Sodium silicate 2 %	70.51 ± 27.26 ^{bc}	2.7 ± 1.87 ^d
Chitosan 0.5 %+Sodium silicate 0.5 %	96.26 ± 4.56 ^c	0.8 ± 1.51 ^{bc}
Chitosan 0.5 %+Sodium silicate 1 %	95.93 ± 5.28 ^c	0 ^a
Chitosan 0.5 % + Sodium silicate 1.5 %	99.51 ± 0.34 ^c	0.1 ± 0.89 ^{ab}
Chitosan 0.5 % + Sodium silicate 2 %	99.55 ± 0.11 ^c	0 ^a
Chitosan 1 % + Sodium silicate 0.5 %	99.47 ± 0.20 ^c	0 ^a
Chitosan 1 % + Sodium silicate 1 %	95.31 ± 4.13 ^c	0 ^a
Chitosan 1 % + Sodium silicate 1.5 %	99.63 ± 0.36 ^c	0 ^a
Chitosan 1 % + Sodium silicate 2 %	96.38 ± 4.47 ^{ab}	0 ^a
Chitosan 1.5 % + Sodium silicate 0.5 %	50.97 ± 17.32 ^{abc}	0 ^a
Chitosan 1.5 % + Sodium silicate 1 %	60.07 ± 8.70 ^{bc}	0 ^a
Chitosan 1.5 % + Sodium silicate 1.5 %	74.55 ± 6.05 ^c	0 ^a
Chitosan 1.5 % + Sodium silicate 2 %	99.59 ± 0.23 ^c	0 ^a

Data in the same column followed by different lower-case letters are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey test. Values are expressed as means ± standard deviation (n=3).

Los datos en la misma columna seguidos de diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) según la prueba Tukey. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

Sporulation inhibition assay

In the sporulation test, in the individual application of treatments chitosan showed the best performance with a total inhibition on the spore formation (Table 1). Conversely, sodium silicate treatments reduced the number of spores from 9 to 80 % depending on the concentration tested. For combined treatments, even when the Abbott test showed an additive effect, the concentration of chitosan seems to play a key role in the efficacy of treatments (Table 2). The combination of chitosan at 0.1 % and sodium silicate reduced the sporulation from 22 to 81 %. Better results were obtained with the concentrations of

Ensayo de inhibición de la esporulación

En la prueba de esporulación, la aplicación individual de los tratamientos de quitosano, mostró el mejor desempeño con una inhibición total sobre la formación de esporas (Tabla 1). Por el contrario, los tratamientos de silicato de sodio redujeron el número de esporas del 4 al 9 % dependiendo de la concentración evaluada. Para los tratamientos combinados, incluso cuando la prueba de Abbott mostró un efecto aditivo, la concentración de quitosano parece jugar un papel clave en la eficacia de los tratamientos (Tabla 2). La combinación de quitosano al 0.1 % y silicato de sodio redujo la esporulación en un rango del 22 al 81 %. Se obtuvieron mejores resultados con las concentraciones

Table 3.
Determination of the effectiveness of combination treatments of sodium silicate and chitosan on the mycelial growth inhibition of *C. gloeosporioides* incubated during 10 days at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ using Abbott's method.

Tabla 3.
Determinación de la efectividad de la combinación de tratamientos.

Mixtures	Individual application of treatments		Combination of treatments		Abbott method	
	MGI % Chitosan	MGI % Sodium silicate	MGI % observed	MGI % expected	AI	Effect
Chitosan 0.1 % + Sodium Silicate 0.5 %	99.3	9.87	75.35	99.37	0.76	Additive
Chitosan 0.1 % + Sodium Silicate 1%	99.3	9.42	75.65	99.37	0.76	Additive
Chitosan 0.1 % + Sodium Silicate 1.5 %	99.3	7.65	64.46	99.35	0.65	Additive
Chitosan 0.1 % + Sodium Silicate 2 %	99.3	4.07	70.51	99.33	0.71	Additive
Chitosan 0.5 % + Sodium Silicate 0.5 %	99.18	9.87	96.26	99.26	0.97	Additive
Chitosan 0.5 % + Sodium Silicate 1 %	99.18	9.42	95.93	99.25	0.97	Additive
Chitosan 0.5 % + Sodium Silicate 1.5 %	99.18	7.65	99.51	99.24	1.00	Additive
Chitosan 0.5 % + Sodium Silicate 2 %	99.18	4.07	99.55	99.21	1.00	Additive
Chitosan 1 % + Sodium Silicate 0.5 %	99.26	9.87	99.47	99.33	1.00	Additive
Chitosan 1% + Sodium Silicate 1 %	99.26	9.42	95.31	99.33	0.96	Additive
Chitosan 1 % + Sodium Silicate 1.5 %	99.26	7.65	99.63	99.32	1.00	Additive
Chitosan 1 % + Sodium Silicate 2 %	99.26	4.07	96.38	99.29	0.97	Additive
Chitosan 1.5 % + Sodium Silicate 0.5 %	97.82	9.87	50.97	98.04	0.52	Additive
Chitosan 1.5 % + Sodium Silicate 1 %	97.82	9.42	60.07	98.03	0.61	Additive
Chitosan 1.5 + Sodium Silicate 1.5 %	97.82	7.65	74.55	97.99	0.76	Additive
Chitosan 1.5 % + Sodium Silicate 2 %	97.82	4.07	99.59	97.91	1.02	Additive

MGI % = Mycelial growth inhibition (%), Abbott Index (AI) ≥ 1.5 (synergistic), (AI) in range ≥ 0.5 to 1.5 (Additive) and (AI) ≤ 0.5 (antagonist).

MGI % = inhibición del crecimiento micelial (%), índice de Abbott (AI) ≥ 1.5 (sinérgico), (AI) en el rango ≥ 0.5 a 1.5 (Aditivo) y (AI) ≤ 0.5 (antagonista).

chitosan at 0.5 % by reducing the sporulation from 76 to 100 %. Total inhibition of the sporulation process was obtained using chitosan at 1 and 1.5 %. These results indicate that the fungicidal effect of chitosan not only affects mycelial development but is also capable of inducing changes at the molecular level, causing mainly structural and morphological affectations in the fungal cell as evidenced by SEM (Figure 3F) and previously reported (Sun *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2016). These results are important due to a positive inhibition in this process can reduce the dispersion of the fungus and avoid infections on susceptible hosts to this fungus.

de quitosano al 0.5 % al reducir la esporulación del 76 al 100 %. Al igual que las concentraciones de quitosano al 1 y 1.5 %, inhibiendo completamente el proceso de esporulación. Estos resultados indican que el efecto fungicida del quitosano no solo afecta el desarrollo micelial, sino que, también es capaz de inducir cambios a nivel molecular, provocando afectaciones, principalmente estructurales y morfológicas en la célula fúngica como se evidencia por SEM (Figura 3F) y previamente reportado (Sun *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2016). Estos resultados son importantes debido a que una inhibición positiva en este proceso puede reducir la dispersión del hongo y evitar infecciones en hospedadores susceptibles a este patógeno.

Scanning electron microscopy

The micrographs of the pathogen are shown in Figure 3. In the negative control (Figure 3A) mycelium with healthy aspect and without affectations was observed. In control treatment (2 % acetic acid), swelling and deformation of the hyphae are observed (Figure 3B), which implies affectations at the structural level and also in a reduction in the respiration process of the fungus, as reported (Kang *et al.*, 2003). Chitosan treatments (Figure 3C) showed compacted and reduced (size) mycelium, this effect can be due to the interaction of the biopolymer with the cell wall as well the membrane causing hyphae contraction, as previously reported (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018; Berumen-Varela *et al.*, 2015). In sodium silicate micrographs (Figure 3D), compared to negative control a dehydration effect can be observed on hyphae, these alterations could be caused due by damage of cell membrane affecting its permeability, as previously reported (Wang *et al.*, 2010). Combined treatments (Figure 3F) showed unhealthy and contracted mycelium, multiple deformations, and the dehydration effect also can be observed, as a result of the additive effect of treatments.

Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías del patógeno se muestran en la Figura 3. En el control negativo (Figura 3A) se observó micelio con aspecto sano y sin afectaciones. En el tratamiento de control (ácido acético al 2 %), se observa hinchazón y deformación de las hifas (Figura 3B), lo que implica afectaciones a nivel estructural y también una reducción en el proceso respiratorio del hongo, previamente reportado (Kang *et al.*, 2003). Los tratamientos de quitosano (Figura 3C) mostraron un micelio compactado con reducción de tamaño, este efecto puede deberse a la interacción que causa la contracción de hifas, previamente reportado (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018; Berumen-Varela *et al.*, 2015). En las micrografías del hongo expuesto al silicato de sodio (Figura 3D), en comparación con el control negativo se puede observar un efecto de deshidratación en las hifas, estas alteraciones podrían ser causadas por un daño de la membrana celular afectando su permeabilidad, previamente reportado por Wang *et al.* (2010). Los tratamientos combinados (Figura 3F), mostraron micelio contraído, se pueden observar múltiples deformaciones y el efecto de deshidratación, como resultado del efecto de los tratamientos.

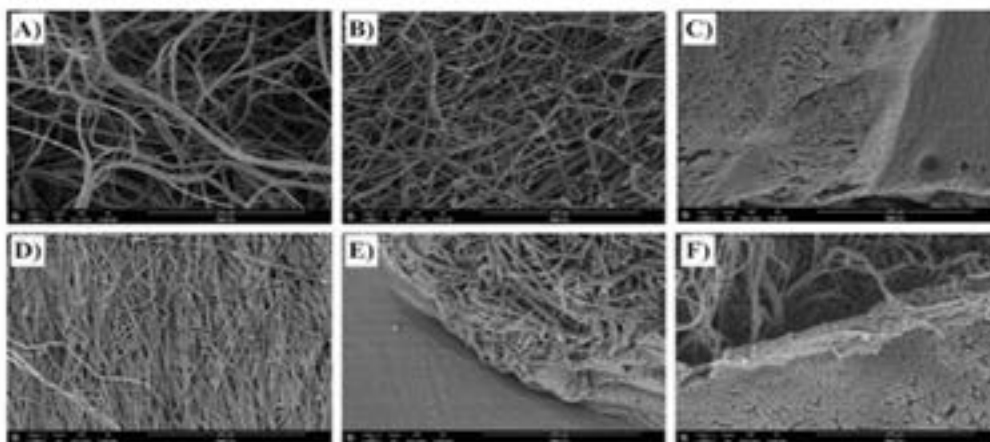


Figure 3. Micrographs of *C. gloeosporioides* in contact with different treatments at x1000 magnifications, bar = 200 μ m. A) Negative control, B) Control (Acetic acid 2 %), C) Chitosan 1 %, D) Sodium silicate 0.5 %, E) Chitosan 0.5 % + Sodium silicate 1.5 %, F) Chitosan 1 % + Sodium silicate 0.5 %.

Figura 3. Micrografías de *C. gloeosporioides* en contacto con los diferentes tratamientos magnificado a 1000x, bar= 200 μ m. A) Control negativo, B) Control (ácido acético 2 %), C) Quitosano 1 %, D) Silicato de sodio 0.5 %, E) Quitosano 0.5 % + Silicato de sodio 1.5 % y F) Quitosano 1 % + Silicato de sodio 0.5 %.

Conclusions

The application of sodium silicate with chitosan can be used as an eco-friendly alternative in the control of *C. gloeosporioides* in papaya fruits.

Acknowledgement

The authors are grateful to Institute of Ecology (INECOL) and CONACYT for the fellowship granted to Edson Rayón-Díaz, this study is the product of ERD's master's thesis.

Authors' contributions

ERD: Run the experiments and collected the experimental data, wrote de manuscript, ABBB: determining the effectiveness of treatments using the Abbott method, reviewed the manuscript, RMVE: performed the statistical analysis, RRGE: reviewed the manuscript, MRV, and GHRS: prepared the SEM samples, and analyzed the images, PGM: designed the experiment, supervised the experimental research, wrote the de manuscript.

References

- Abd-Elsalam, K. A., Al-Dhabaan, F. A., Alghuthaymi, M., Njobeh, P. B. and Almoammar, H. (2019). Chapter 14: Nanobiofungicides: Present concept and future perspectives in fungal control. In O. Koul (ed.). *Nano-Biopesticides today an future perpectives*, Academic Press. Jalandhar, India. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00014-0>
- Al-Sheikh, H. & Yehia, R. S. (2016). In vitro antifungal efficacy of *Aspergillus niger* ATCC 9642 chitosan-AgNPs composite against post-harvest disease of citrus fruits. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52: 413–420. <http://doi.org/10.1134/S0003683816040177>
- Ali, A. & Mahmud, T. M. M. (2008). The potential use of locally prepared chitosan to control *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from papaya fruits. *Acta Horticulture*, 804: 177–182. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.804.22>
- Berumen-Varela, G., Coronado-Partida, L. D., Ochoa-Jiménez, V. A., Chacón-López, M. A. and Gutiérrez-Martínez, P. (2015). Effect of chitosan on the induction of disease resistance against *Colletotrichum sp.* in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Investigación y Ciencia*, 23(66): 16-21. <https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista66/Articulo%203.pdf>
- Bi, Y., Tian, S. P., Guo, Y. R., Ge, Y. H. and Qin, G. Z. (2006). Sodium silicates reduces postharvest decay on Hami melons: Induced resistance and fungistatic effects. *Plant Disease*, 90(3): 279–283. <http://doi.org/10.1094/PD-90-0279>
- Cortés-Rivera, H. J., Blancas-Benítez, F. J., Romero-Islas, L. del C., Gutiérrez-Martínez, P. and González-Estrada, R. R. (2019). *In vitro* evaluation of residues of coconut (*Cocos nucifera* L.) aqueous extracts, against the fungus *Penicillium italicum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(8): 613–617. <http://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i8.1993>

Conclusiones

La aplicación de silicato de sodio con quitosano en concentración adecuada puede ser una alternativa segura y efectiva para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en etapa postcosecha.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Ecología (INECOL) y CONACYT por la beca otorgada a Edson Rayón-Díaz, este estudio es producto de la tesis de maestría de ERD.

Contribuciones de los autores

ERD: Ejecutar los experimentos y recopilar los datos experimentales, redactar el manuscrito, ABBB: determinó la efectividad de los tratamientos mediante el método de Abbott, revisión del manuscrito, RMVE: realizó el análisis estadístico, RRGE: revisión del manuscrito, MRV y GHRS: preparó las muestras de SEM y analizó las imágenes, PGM: diseñó el experimento, supervisó la investigación experimental, redacción del manuscrito.

- De Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., de Araújo, S. A., Câmara, M. P. S. and de Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66: 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>
- Ge, Y., Chen, Y., Li, C., Wei, M., Lv, J. and Meng, K. (2017). Inhibitory effects of sodium silicate on the fungal growth and secretion of cell wall- degrading enzymes by *Trichothecium roseum*. *Journal of Phytopathology*, 165 (9): 620–625 <http://doi.org/10.1111/jph.12600>
- González-Estrada, R. R., Vega-Arreguín, J., Robles-Villanueva, B. A., Velázquez-Estrada, R. M., Ramos-Guerrero, A. and Gutiérrez-Martínez, P. (2020). In vitro evaluation of non-conventional chemicals for *Penicillium citrinum* control. *Polibotánica*, 49: 161–172. <http://doi.org/10.18387/polibotanica.49.11>
- Guo, Y., Zhou, J., Zhang, J. and Zhang, S. (2019). Chitosan combined with sodium silicate treatment induces resistance against rot caused by *Alternaria alternata* in postharvest jujube fruit. *Journal of Phytopathology*, 167: 451–460. <https://doi.org/10.1111/jph.12817>
- Gutiérrez-Martínez, P., Ramos-Guerrero, A., Rodríguez-Pereida, C., Coronado-Partida, L., Angulo-Parra, J. and González-Estrada, R. (2018). Chapter 12: Chitosan for Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. In M. Siddiqui (ed.). *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. India. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03664-1>
- Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Berúmen-Varela, G., Ramos-Guerrero, A. and Hernández-Ibañez, A. M. (2017). In vitro response of *Colletotrichum* to chitosan. Effect on incidence and quality on tropical fruit. Enzymatic expression in mango. *Acta Agronómica*, 66(2): 282–289. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.53770>
- Hassan, R., Sand, M. and El-Kadi, S. (2012). Effect of some organic acids on fungal growth and their toxins production. *Journal of Agriculture Chemistry and Biotechnology*, 3(9): 391–397. <https://doi.org/10.21608/JACB.2012.55011>
- Kang, H. C., Park, Y. H. and Go, S. J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiological Research*, 158(4): 321–326. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00211>
- Li, L., Tang, X., Ouyang, Q. and Tao, N. (2019). Combination of sodium dehydroacetate and sodium silicate reduces sour rot of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 151: 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.006>
- Molina-Chaves, A., Gómez-Alpizar, L. and Umaña-Rojas, G. (2017). Identificación de especies del género *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1): 69–80. <http://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29752>
- Narendranath, N. V., Thomas, K. C. and Ingledew, W. M. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3): 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- Niu, L., Bi, Y., Bai, X., Zhang, S., Xue, H., Li, Y. and Calderón-Urrea, A. (2016). Damage to *Trichothecium roseum* caused by sodium silicate is independent from pH. *Canadian Journal of Microbiology*, 62 (2): 1–12. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0657>
- Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae*, 4(4): 46. <http://doi.org/10.3390/horticulturae4040046>
- Pavanello, E. P., Brackmann, A., Da Costa, I. F. D., Both, V. and Ludwig, V. (2016). Use of sodium metasilicate for management of peach brown rot. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 46(3): 245–253. <http://doi.org/10.1590/1983-40632016v46a41221>
- Rahman, H., Shovan, L. R., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Eijsink, V. G. H., Sørli, M. and Tronsmo, A. (2014). Inhibition of fungal plant pathogens by synergistic action of chito-oligosaccharides and commercially available fungicides. *Plos ONE*, 9(4): e93192. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0093192>
- Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R. R., Hanako-Rosas, G., Bautista-Baños, S., Acevedo-Hernández, G., Tiznado-Hernández, M. E. and Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro tests. *Food Science and Biotechnology*, 27(3): 755–763. <http://doi.org/10.1007/s10068-018-0305-5>
- Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M. and Mayek-Pérez, N. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1): 53–63. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100007#f1

- Song, H., Yuan, W., Jin, P., Wang, W., Wang, X., Yang, L. and Zhang, Y. (2016). Effects of chitosan/nano-silica on postharvest quality and antioxidant capacity of loquat fruit during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 119: 41–48. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.015>
- Sun, X., Bi, Y., Li, Y., Han, R. and Ge, Y. (2008). Postharvest chitosan treatment induces resistance in potato against *Fusarium sulphureum*. *Agricultural Sciences in China*, 7(5): 615–621. [http://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60060-7](http://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60060-7)
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I. and Pérez-Brito, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*, 135(1): 67–79. <http://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>
- Wang, Y., Bi, Y., Li, Y. C., Yin, Y. and Ge, Y. H. (2010). Antifungal activity of sodium silicate on *Trichothecium roseum* in vitro. *Acta Horticulture*, 877: 1683–1690. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.231>
- Wang, Yunguang, Li, B., Zhang, X., Peng, N., Mei, Y. and Liang, Y. (2017). Low molecular weight chitosan is an effective antifungal agent against *Botryosphaeria* sp. and preservative agent for pear (*Pyrus*) fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 1135–1143. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.105>
- Youssef, K., De Oliveira, A. G., Tischer, C. A., Hussain, I. and Roberto, S. R. (2019). Synergistic effect of a novel chitosan/silica nanocomposites-based formulation against gray mold of table grapes and its possible mode of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141: 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.249>
- Youssef, K., Mustafa, Z. M. M., Kamel, M. A. M. and Mounir, G. A. (2020). Cigar end rot of banana caused by *Musicillium theobromae* and its control in Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(3–4): 162–177. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1735139>