

Reduction in the incidence of grey mold in table grapes due to the volatile effect of a garlic extract

Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto de volátiles de un extracto de ajo

Paola Campa-Siqueiros, Socorro Vallejo-Cohen, Consuelo Corrales-Maldonado, Miguel Ángel Martínez-Téllez, Irasema Vargas-Arispuro*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria km 0.6, C.P. 83304 Hermosillo, Sonora; Graciela Ávila-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología, Periférico Francisco R. Almada Km 1, Zootecnia, C.P. 31453, Chihuahua, Chihuahua. *Autor para correspondencia: iris@ciad.mx.

Recibido: 12 de Julio, 2017.

Aceptado: 21 de Agosto, 2017.

Campa-Siqueiros P, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez-Téllez MA, Vargas-Arispuro I, Ávila-Quezada G. 2017. Reduction in the incidence of grey mold in table grapes due to the volatile effect of a garlic extract. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 494-508.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-1

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 31, 2017.

Resumen. La pudrición gris en racimos de uva causada por *Botrytis cinerea*, es la enfermedad que más afectan al mercado de la uva de mesa. Su control es mediante almohadillas liberadoras de dióxido de azufre (SO₂) y fungicidas sistémicos, actualmente en revisión regulatoria. En este trabajo se planteó evaluar en forma volátil un extracto de ajo (EHA), alicina, dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS), sobre la incidencia de pudrición gris en racimos de uva variedad Flame seedless. Los tratamientos fueron impregnados en celulosa, que permitió la liberación de los compuestos sobre

Abstract. Gray mold in grape clusters caused by *Botrytis cinerea*, is one of the diseases that most affect the table grape market. To control this disease sulphur dioxide releasing pads (SO₂) and systemic fungicides are used, currently in regulatory review. In this work, it was proposed to use an extract of garlic (EHA), allicin, dialyldisulfide (DADS) and dialyltrisulfide (DATS) in volatile form to evaluate the incidence of gray mold on clusters of table grapes of the Flame seedless variety. Treatments were impregnated with cellulose, which allowed the release of the volatile compounds on clusters of grape inoculated with 1x10⁶ spores of *B. cinerea*/mL. The results showed that the volatile emitted by allicin and DADS had a lower effect than that of EHA and DATS. Those compounds similarly inhibited (P≤0.05) disease development in clusters of grape for 14 days at 4 and 25 °C, showing increased effectiveness at low temperature (4 °C). This is a result of particular relevance in the problematic of this disease that occurs during grape cold storage. The effectiveness of garlic-derived

los racimos de uva inoculados con 1×10^6 esporas de *B. cinerea*/mL. Los resultados mostraron que los volátiles emitidos por alicina y DADS tienen menor efecto que el EHA y DATS, los cuales inhibieron de manera similar ($P \leq 0.05$) el desarrollo de la enfermedad en los racimos durante 14 días a 4 y 25 °C, presentando mejor efectividad a bajas temperatura (4 °C). Resultado de particular relevancia en la problemática de esta enfermedad, que se presenta durante el almacenamiento en frío de la uva. La efectividad mostrada por los compuestos derivados de ajo, aplicados en su forma volátil, abre la posibilidad de su utilización como una alternativa a los fungicidas tradicionales para el control de enfermedades postcosecha.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, *Allium sativum*, pudrición de racimos, volátiles azufrados.

Entre los hongos patógenos que afectan el cultivo de la uva de mesa, destaca *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.[teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (Bary) Whetz.], ascomiceto causante de la pudrición gris. Este hongo afecta la producción de uva de mesa, tanto en la etapa de pre-cosecha como en post-cosecha, en un amplio rango de condiciones ambientales y de áreas geográficas (Williamson *et al.*, 2007). El desarrollo de la pudrición gris durante la etapa de comercialización de la uva de mesa, afecta el valor de la fruta en el mercado, y es motivo de rechazo en el momento de revisión en las fronteras de los países importadores. Las condiciones de temperatura y humedad durante el transporte y/o almacenamiento en frío, favorecen el desarrollo de *B. cinerea*, ya que durante estas etapas la fruta alcanza su máxima concentración de azúcar, permitiendo que el hongo crezca vigorosamente, propagándose con facilidad entre los racimos de uva (Lichter *et al.*, 2006). En el Noroeste de México el

compuestos aplicados en su forma volátil abre la posibilidad de usarlos como una alternativa a los fungicidas tradicionales para controlar enfermedades post-cosecha.

Key words: *Vitis vinifera*, *Allium sativum*, cluster rot disease, sulphur volatile.

Botrytis cinerea Pers.:Fr.[teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (Bary) Whetz.], the ascomycete that causes gray mold, is one of the most important fungal plant pathogens affecting table grapes. The fungus affects table grapes production both in pre-harvest and post-harvest stages in a wide range of environment conditions and geographic areas (Williamson *et al.*, 2007). Development of gray mold on table grapes affects their market value and also causes them to be rejected upon being inspected at the borders of importing countries. Temperature and moisture conditions during transportation and/or cold storage favor the development of *B. cinerea*, because during these stages berries achieve their maximum sugar concentration allowing the fungus to grow vigorously and spread easily among grape clusters (Lichter *et al.*, 2006). In northwestern Mexico, 90% of table grape production is exported to markets in the United States, Europe and Asia. To reach those markets, they are sent in refrigerated (4 ± 1 °C) containers over land or sea and have to withstand journeys of 14-25 days (Vázquez, 2011; Lichter *et al.*, 2008).

A common method to control gray mold on table grapes during transportation and cold storage is the use of sulphur dioxide (SO₂) releasing pads; SO₂ is a gaseous compound that disperses inside the container and prevents *B. cinerea* spores to germinate (Sanzani *et al.*, 2012). However, SO₂ damages the berries by bleaching (Milkota *et al.*,

90% de la producción de uva de mesa es exportada a mercados de Estados Unidos, Europa y Asia. Para poder alcanzar estos mercados, la fruta es enviada en contenedores refrigerados (4 ± 1 °C), tanto por tierra como por mar, debiendo soportar entre 14-25 días de transporte (Vázquez, 2011; Lichter *et al.*, 2008).

El control de la pudrición gris bajo condiciones de transporte y almacenamiento en frío de uva de mesa, es mediante el uso de almohadillas liberadoras de dióxido de azufre (SO₂), compuesto gaseoso que se difunde en el espacio del contenedor, impidiendo la germinación de las esporas del hongo (Sanzani *et al.*, 2012). El uso de SO₂ ocasiona blanqueamiento de las bayas (Milkota *et al.*, 2010) y puede provocar reacciones de hipersensibilidad en consumidores (Ruiz-Moreno *et al.*, 2015). Por estos motivos y aunado a la importancia comercial de la exportación de uva de mesa, se han hecho esfuerzos por encontrar alternativas al uso de SO₂. De las diversas alternativas que se han presentado, las más aceptadas han sido aquellas, donde el componente activo proviene de origen natural (Tripathi *et al.*, 2008). Entre las alternativas naturales, los compuestos de ajo han demostrado tener efecto fungicida (Perelló *et al.*, 2013; Wallock-Richards *et al.*, 2014). Particularmente, se ha atribuido esta bioactividad al compuesto alicina (Curtis *et al.*, 2004), el cual es uno de los componentes más abundantes que se forma cuando el ajo es dañado mecánicamente. Otros compuestos azufrados derivados de ajo que también han demostrado tener efecto antifúngico son dialildisulfuro (DADS) y dialiltrisulfuro (DATS) (Tsao and Yin, 2001; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015). Una cualidad que hace atractivo el uso de los compuestos azufrados derivados de ajo, es su característica de ser volátiles, permitiéndoles tener bioactividad en la fase de vapor, facilitando la

2010) and may produce hypersensitivity reactions in consumers (Ruiz-Moreno *et al.*, 2015). For this reason, besides the commercial importance of table grape exports, efforts have been made to find alternatives to using SO₂. From the various alternatives considered, the most accepted have been those whose active component comes from natural sources (Tripathi *et al.*, 2008). From natural sources, garlic compounds have shown fungicidal effect (Perelló *et al.*, 2013; Wallock-Richards *et al.*, 2014). Such bioactivity has been especially attributed to the allicin compound (Curtis *et al.*, 2004), one of the most abundant components formed when garlic is mechanically damaged. Other sulphur compounds derived from garlic that have also shown antifungal effects are diallyl disulfide (DADS) and diallyltrisulfide (DATS) (Tsao and Yin, 2001; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015). A particularly attractive feature of sulphur compounds derived from garlic is that they are volatile. This characteristic allows them to have bioactivity at vapor phase and makes it easier to use them in a gaseous form to control diseases. This is a relevant aspect of table grape marketing because, after being harvested, the berries must not be in contact with liquid substances (Codex Stan 255, 2007). In a previous research, it was found that a hydroalcoholic extract of garlic (EHA) inhibited *B. cinerea in vitro* spore germination in a magnitude similar to that of allicin and diallyltrisulfide compounds (Gándara-Ledezma *et al.*, 2015).

Considering all the aspects above mentioned, this research focused on evaluating the effect of the volatile compounds from a hydroalcoholic extract of garlic, allicin, diallyl disulfide and diallyltrisulfide on the incidence of gray mold on table grapes inoculated with *B. cinerea* at transportation (4 °C) and marketing temperature (25 °C).

posibilidad de utilizarlos en forma gaseosa para el control de enfermedades. Este aspecto se hace relevante para la comercialización de la uva de mesa, donde la fruta después de su cosecha no debe entrar en contacto con sustancias líquidas (Codex Stan 255, 2007). En un trabajo previo se encontró que un extracto hidroalcohólico de ajo (EHA) fue capaz de inhibir *in vitro* la germinación de esporas de *B. cinerea*, en una magnitud similar a los compuestos alicina y dialiltrisulfuro (Gándara-Ledezma *et al.*, 2015).

Tomando en consideración todos los aspectos antes mencionados, este trabajo se centró en evaluar el efecto de los compuestos volátiles emitidos por un extracto hidroalcohólico de ajo, alicina, dialildisulfuro y dialiltrisulfuro sobre la incidencia de la pudrición gris en racimos de uva de mesa inoculadas con *B. cinerea*, evaluados a la temperatura de transporte (4 °C) y de comercialización (25 °C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Botrytis cinerea Pears

Botrytis cinerea se aisló de uvas infectadas variedad Flame seedless de un campo ubicado en la zona vitícola de Pesqueira, Sonora. La cepa se identificó por las características morfológicas y moleculares, tales como tamaño de los conidios, apariencia de la colonia y por la secuencia del ITS1-5.8S RNA-ITS2 (acceso AY568636). Para su crecimiento se utilizó como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se mantuvo a 25 °C de 7 a 9 días en oscuridad (Tzortzakis *et al.*, 2007). El hongo se sembró tomando un pequeño pedazo de micelio e inoculándolo sobre PDA a 25 °C de 7 a 9 días o hasta que el hongo alcanzó una esporulación suficiente para preparar una solución de 1×10^6

MATERIALS AND METHODS

Botrytis cinerea Pears

Botrytis cinerea was isolated from infected grapes of the Flame Seedless variety in a vineyard located in the wine region of Pesqueira, Sonora. The strain was identified by its morphological and molecular characteristics such as conidia size, colony appearance and ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequence (access AY568636). For growth, it was sown in agar-potato-dextrose (PDA) medium culture and kept in darkness at 25 °C from 7 to 9 days (Tzortzakis *et al.*, 2007). The fungus was sown again by taking a piece of mycelium and inoculating it into PDA at 25 °C from 7 to 9 days, or until the fungus produced enough spores to prepare a 1×10^6 spore/mL suspension. To prepare the suspension, 5 mL of distilled water with 0.01% of 0.02% Tween 80 were poured on the surface of the plate containing the fungus; then, it was scratched using a glass rod, the liquid containing fungal spores was collected and filtered through muslin cloth to remove the mycelium, and the mixture was centrifuged at 5000 x g. The collected spores were re-suspended in sterile water until a 1×10^6 spores/mL concentration was obtained, and quantified in a Neubauer chamber, according to the methodology of Moo-Koh *et al.* (2014).

Hydroalcoholic extract of garlic (EHA) and its derived sulphur compounds (DADS, DATS and allicin)

The extract was prepared using garlic of the Regional variety purchased at the local market. Ten gram of garlic cloves were blended with 14 mL of distilled water for 1 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 15 000 x g at 4 °C for

esporas/mL. La suspensión de esporas se preparó adicionando 5 mL de agua destilada conteniendo 0.01% de Tween 80 al 0.02% sobre la superficie de la placa con el hongo, se raspó con una varilla de vidrio, el líquido conteniendo las esporas del hongo se colectó y filtró sobre gaza para eliminar micelio y el filtrado fue centrifugado a 5000 x g. Las esporas colectadas fueron resuspendidas en agua estéril hasta lograr una concentración de 1×10^6 esporas/mL cuantificadas con un cámara de Neubauer de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014).

Extracto hidroalcohólico de ajo (EHA) y sus compuestos derivados azufrados (DADS, DATS y alicina)

El extracto se preparó a partir de ajo de la variedad “regional”, adquirido en el mercado local. Diez gramos de dientes de ajo, se licuaron con 14 mL de agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente. El homogenado se centrifugó por 20 minutos a 15 000 x g a 4 °C, se adicionaron 6 mL de etanol al sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 8000 x g por 20 min a 4 °C (Jansen *et al.*, 1987). El sobrenadante representó el extracto hidroalcohólico de ajo. Los estándares con pureza por encima del 98% de alicina, dialil disulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DTS) se adquirieron en Neem Biotech (Cardiff, UK).

Evaluación *in vitro* del efecto de EHA, DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

Los racimos de uvas de la variedad Flame seedless se recolectaron al momento de la cosecha en viñedos de la región de Pesqueira, Sonora. Los

20 min, then 6 mL of ethanol were added to the supernatant and the mixture was centrifuged again at 8000 x g at 4 °C for 20 min (Jansen *et al.*, 1987). The supernatant represented the hydroalcoholic extract of garlic. Standards with purity above 98% alliin, dialyldisulfide (DADS) and dialyltrisulfide (DTS) were purchased from Neem Biotech (Cardiff, UK).

***In vitro* evaluation of the effect of EHA, DADS, DATS and alliin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters**

Grape clusters of the Flame Seedless variety were collected at harvest in vineyards in the wine region of Pesqueira, Sonora. The clusters were reduced to 10 berries per cluster, ensuring that they did not show visible symptoms of gray mold caused by *B. cinerea*. The clusters were disinfected by immersion in a 2% (v/v) sodium hypochlorite solution for 5 min, rinsed with sterile distilled water and dried on paper towels at room temperature. A puncture wound near the peduncle of each berry was made with a sterile scalpel. Each cluster was sprayed with 1 mL of the 1×10^6 spores/mL suspension of *B. cinerea* prepared in dextrose sabouraud agar (CDS). The inoculated clusters were placed in 50 cm³ plastic chambers (one cluster per chamber) and exposed to volatile compounds from EHA, DADS, DATS and alliin at the doses per treatment shown in Table 1. The compounds were impregnated in cellulose pads (6x2 cm) that had been previously stuck on the coverlid of the chambers. The control treatment was impregnated with a water-glycerol solution because glycerol was used as a retention agent to control the release of the emitter's volatiles. This compound was incorporated into the treatments before impregnating the emitter. The disease

racimos se llevaron a 10 bayas por racimo, asegurándose que no presentaran síntomas visibles de pudrición gris causada por *B. cinerea*. Los racimos se desinfectaron sumergiéndolos durante 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v), posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente a temperatura ambiente. A cada una de las bayas, se les hizo una herida por punción cerca del pedúnculo con un bisturí estéril. Después se asperjó sobre cada racimo 1 mL de la suspensión de 1×10^6 esporas/mL de *B. cinerea* preparadas en caldo dextrosa sabouraud (CDS). Los racimos inoculados se colocaron en cámaras de plástico de 50 cm³ (un racimo por cámara). Los racimos de uva se expusieron a los compuestos volátiles emitidos por el EHA, así como a los compuestos puros de DADS, DATS y alicina a las dosis que se muestran en los tratamientos que se presentan en el Cuadro 1. Los compuestos se impregnaron en almohadillas de celulosa (6 x 2 cm) previamente pegadas sobre la tapa de las cámaras. El tratamiento control consistió en la impregnación de una solución de agua-glicerol (1:2 v/v), ya que el glicerol fue utilizado como agente de retención, para controlar la liberación de los volátiles del emisor. Este compuesto fue incorporado a los tratamientos antes de la impregnación al emisor. La incidencia de la enfermedad se cuantificó cada dos días durante un lapso de 14 días, a 4 y 25 °C. Se cuantificaron el número de bayas de cada racimo con presencia de pudrición gris. Los resultados se presentan como incidencia de la enfermedad (porcentaje de bayas infectadas), calculada con la fórmula propuesta por Nally *et al.* (2012). Se prepararon tres repeticiones por tratamiento y la evaluación se realizó tres veces.

$$\text{Incidencia \%} = \frac{\text{nd}}{\text{nT}} \times 100 \quad (1)$$

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la evaluación *in vitro* de la incidencia de pudrición gris en racimos de uva de mesa a 4 y 25 °C.

Table 1. Treatments used to evaluate *in vitro* incidence of gray mold on table grape clusters at 4 and 25 °C.

Tratamiento	Concentración
T1(control)	Agua (1mL) + glicerol (2mL)
T2	EHA (2 mL) + 3 mL de glicerol
T3	DADS (20 µL)+ 30 µL de glicerol
T4	DATS (20 µL)+ 30 µL de glicerol
T5	Alicina (20 µL)+ 30 µL de glicerol

incidence was quantified every other day during 14 days at 4 and 25 °C. Berries of each cluster with gray mold symptoms were counted. The results are presented as the disease incidence (percentage of infected berries) calculated using the formula proposed by Nally *et al.* (2012). Three replications per treatment were prepared and the evaluation was performed three times.

$$\text{Incidence \%} = \frac{\text{nd}}{\text{nT}} \times 100 \quad (1)$$

Where:

nd = number of berries with disease symptoms

nT = Total number of berries in the cluster

Evaluation of the synergistic effect among DADS, DATS and allicin on gray mold caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters

To determine a possible synergistic effect among DADS, DATS and allicin compounds, a mixture containing 20 µL of each compound and 90 µL of glycerol was prepared. The mixture was homogenized with gentle agitation and kept in a cold-water bath until it was applied to the emitter. The treatments used are shown in Table 2. The same procedure described for independent compounds was used to determine the effect of the compound

Donde:

nd = Número de bayas con presencia de enfermedad

nT = Número total de bayas en el racimo

Evaluación de efecto sinérgico entre DADS, DATS y alicina, en desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

Para determinar un posible efecto sinérgico entre los compuestos DADS, DATS y alicina, se preparó una mezcla que contenía 20 µL de cada compuesto y 90 µL de glicerol. La mezcla se homogenizó con agitación suave y se mantuvo sobre baño frío hasta su aplicación sobre el emisor. Los tratamientos aplicados se muestran en el Cuadro 2. Para determinar el efecto de la mezcla de compuestos en la incidencia de la pudrición gris sobre los racimos de uvas, se utilizó el mismo procedimiento descrito para los compuestos independientes.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la evaluación de los compuestos independientes, se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y tres repeticiones y para la evaluación de la mezcla de compuestos, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 3 tratamientos y tres repeticiones. En ambos experimentos, la unidad experimental fue un racimo de 10 bayas, y la variable respuesta fue el número de bayas con presencia de pudrición gris, utilizando

mixture on the incidence of gray mold on grape clusters.

Experiment design and statistical analysis

Independent compounds were arranged in a completely randomized design with 5 treatments and 3 replications; the mixture of compounds was arranged in a completely randomized design with 3 replications and 3 treatments. The experiment unit in both treatments was a 10-berry cluster, and the response variable the number of berries with gray mold symptoms. The percentage of disease incidence was calculated using the equation of Nally *et al.*, 2012. Data of the percentage of gray mold incidence were converted to $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ and then subjected to an analysis of variance with a factor and, in case of significance, a media comparison was made using Tukey-Kramer test ($P \leq 0.05$) and NCSS statistical program (Number Cruncher Statistical System, 2007).

RESULTS

Effect of EHA, DADS, DATS and allicin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on grape clusters

The effect of volatiles emitted by the hydroalcoholic extract of garlic and DADS, DATS

Cuadro 2. Tratamientos utilizados para la evaluación de la sinergia de DADS, DATS y alicina en la incidencia de pudrición gris en racimos de uva de mesa a 4 y 25 °C.

Table 2. Treatments used to evaluate the synergy among DADS, DATS and allicin in the incidence of gray mold on table grape clusters at 4 and 25 °C.

Tratamiento	Concentración
T1(control)	Agua (1mL) + glicerol (2mL)
T2	EHA (2 mL) + 3 mL de glicerol
T3	DADS (20 µL) + DATS (20 µL) + Alicina (20 µL) + 90 µL de glicerol

la ecuación de Nally *et al.*, 2012, para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad. Los datos de porcentajes de incidencia de la pudrición gris se transformaron a $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$. Los datos fueron procesados en un análisis de varianza con un factor y en caso de significancia se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$) con el programa estadístico NCSS (Number Cruncher Statistical System, 2007).

RESULTADOS

Efecto de EHA, DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

El efecto de los volátiles emitidos por el extracto hidroalcohólico de ajo y DADS, DATS y alicina sobre el desarrollo de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluado durante 14 días después de la aplicación de los tratamientos, se muestra en la Figura 1, donde se observa que los volátiles emitidos por el T2 (EHA), mantuvieron un control sobre el desarrollo de la pudrición gris en las uvas, tanto a 4 °C como a 25 °C. Los tratamientos T3, T4 y T5 evaluados a 25 °C (Figura 1B), solamente el T4, presentó efecto similar ($p \leq 0.05$) al EHA sobre el desarrollo de la pudrición gris. Los racimos bajo el tratamiento T3, presentaron un 70% de la incidencia de la pudrición gris y con el T5, la incidencia de la enfermedad se presentó igual ($p \leq 0.05$) que el control, alcanzando el 100% al día 10 de los 14 que se mantuvo la evaluación.

El efecto de los tratamientos evaluados a 4 °C mostró que T2, T3 y T4, presentaron un control sobre el desarrollo de la pudrición gris (Figura 1A), y aunque T5 permitió un 10% de la incidencia de la enfermedad, el análisis estadístico resultó igual

and allicin on gray mold development on table grape clusters evaluated during 14 days after treatment application is shown in Figure 1. The figure shows that volatiles emitted by T2 (EHA) controlled gray mold development on grape table clusters both at 4 °C and 25 °C. From T3, T4 and T5 treatments evaluated at 25 °C (Figure 1B), only T4 showed a similar effect ($p \leq 0.05$) to EHA on gray mold development. Clusters treated with T3 showed 70% of gray mold incidence, and T5 a similar incidence ($p \leq 0.05$) to that of the control, reaching 100% on day 10 of the 14-day evaluation.

The effect of the treatments evaluated at 4 °C showed that T2, T3 and T4 controlled gray mold development (Figure 1A), and although T5 allowed 10% of disease incidence, the statistical analysis ($p \leq 0.05$) was the same as that of T2, T4 and T5. Special importance should be given to the effect of the treatments evaluated at 4 °C, because during the first 8 days under treatment, T5 showed only 5% of gray mold incidence, whereas the control presented 30%.

Effectiveness of the treatments evaluated to inhibit gray mold development on table grape clusters is shown in Table 3. Results show that T2 was more effective in controlling the disease during 14 days at 25 and 4 °C, followed by T4 treatment that controlled the disease 8 and 12 more days than the control at 25 and 4 °C, respectively.

Synergistic effect of a mixture of DADS, DATS and allicin on gray mold development caused by *Botrytis cinerea* on table grape clusters

The mixture of DADS, DATS and allicin had a similar effect ($P \leq 0.05$) that of EHA on gray mold development on grape clusters (Figure 2). When evaluated at 4 °C, both EHA and the mixture of compounds inhibited disease development during 14 days (Figure 2 A), while when evaluated

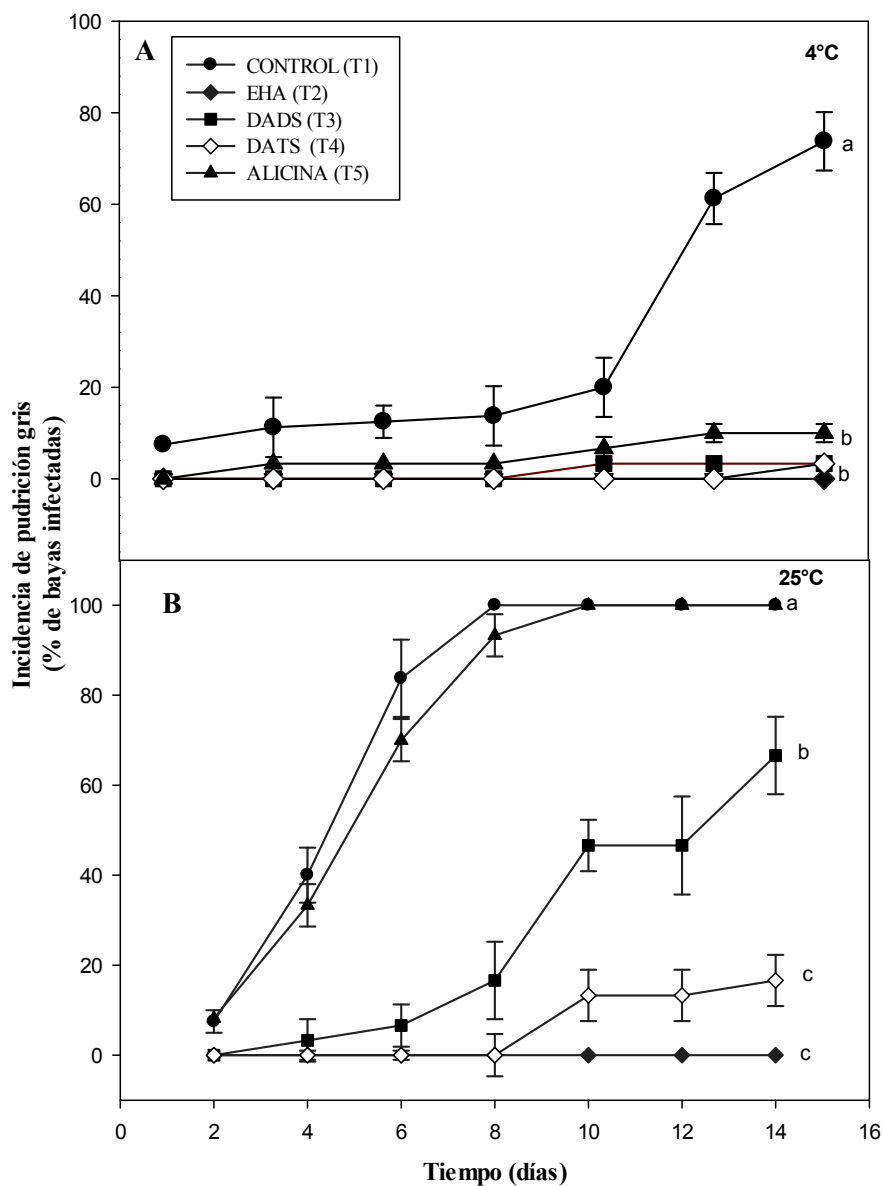


Figura 1. Efecto de los volátiles emitidos por EHA, DADS, DATS y alicina sobre el progreso de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluados a 25 y 4 °C, durante 14 días. Los valores son la media de tres repeticiones de 10 bayas cada una. Barras verticales representan la desviación estandar (n=3). Letras iguales no son estadísticamente diferentes entre si de acuerdo con Tukey-Kramer para $P \leq 0.05$. El experimento se repitió tres veces.

Figure 1. Effect of volatiles emitted by EHA, DADS, DATS and alicin during gray mold development on table grape clusters evaluated at 25 and 4 °C during 14 days. Values represent the media of three replications of 10 berries each. Vertical bars represent the standard deviation (n=3). Values with the same letter are not statistically different from each other for $P \leq 0.05$, according to Tukey-Kramer. The experiment was conducted three times.

($p \leq 0.05$) que T2, T4 y T5. Particularmente es destacado el efecto de los tratamientos evaluados a 4 °C, donde los primeros 8 días solamente en el tratamiento T5 se presentó el 5% de la incidencia de la pudrición gris, cuando el control ya presentaba un 30% de la enfermedad.

La eficacia de los tratamientos evaluados para inhibir el desarrollo de la pudrición gris en los racimos de uva de mesa se muestra en el Cuadro 3. Donde se observa que el T2 mostró el mejor control de la enfermedad durante 14 días en ambas temperaturas evaluadas. Seguido por el tratamiento T4 que mantuvo el control de la enfermedad por 8 y 12 días más que el control a 25 y 4 °C, respectivamente.

Efecto sinérgico de una mezcla de DADS, DATS y Alicina en el desarrollo de pudrición gris causada por *Botrytis cinerea* en racimos de uva

La mezcla de DADS, DATS y alicina presentó un efecto similar ($P \leq 0.05$) al EHA en el desarrollo de la pudrición gris en racimos de uva (Figura 2). La evaluación a 4 °C, mostró que tanto el EHA como la mezcla de compuestos, inhibieron por 14

at 25 °C only EHA controlled the disease during 14 days. The mixture of DADS, DATS and allicin resulted in 9% of gray mold incidence at day 10; this value remained until day 14, when the evaluation ended.

DISCUSSION

Given the growing interest to find natural alternatives to the use of SO₂ to control gray mold on table grape (Parafati *et al.*, 2015), it was proposed to evaluate volatiles emitted by a garlic extract (EHA) and three of its main components (DADS, DATS and allicin) (Iciek *et al.*, 2009) to control the disease. Both EHA and DADS, DATS and allicin have showed to become bioactive at vapor phase (Curtis *et al.*, 2004; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015), a characteristic that makes it easier to use them in a gaseous form to control *B. cinerea*, a pathogen causing gray mold on grape clusters. Due to marketing norms, table grape berries should not come into contact with liquids after being harvested (Codex Stan 255, 2007). Several studies have been published on the

Cuadro 3. Efectividad de los tratamientos sobre la protección de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluado *in vitro*.

Table 3. Evaluation *in vitro* of the effectiveness of treatments to protect clusters of table grape from gray mold.

Tratamiento	Inicio de la enfermedad (días)		Incremento en la protección de la enfermedad (días)	
	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C
T1 (Control)	2	2	-	-
T2 (EHA) ^z	Más de 14	Más de 14	14	14
T3 (DADS)	4	10	2	8
T4 (DATS)	10	14	8	12
T5 (Alicina)	2	4	0	2

^zEl inicio de la enfermedad en el EHA fue posterior a los 14 días /^zDisease development in EHA started 14 days after.

días el desarrollo de la enfermedad (Figura 2 A), mientras que la evaluación a 25 °C, mostró que únicamente el EHA mantuvo control del desarrollo de la enfermedad durante los 14 días. La mezcla de

antibacterial and antifungal effect of garlic extracts evaluated in liquid media (Harris *et al.*, 2001; Durairaj *et al.*, 2010). However, few studies have been published on volatile evaluations of garlic

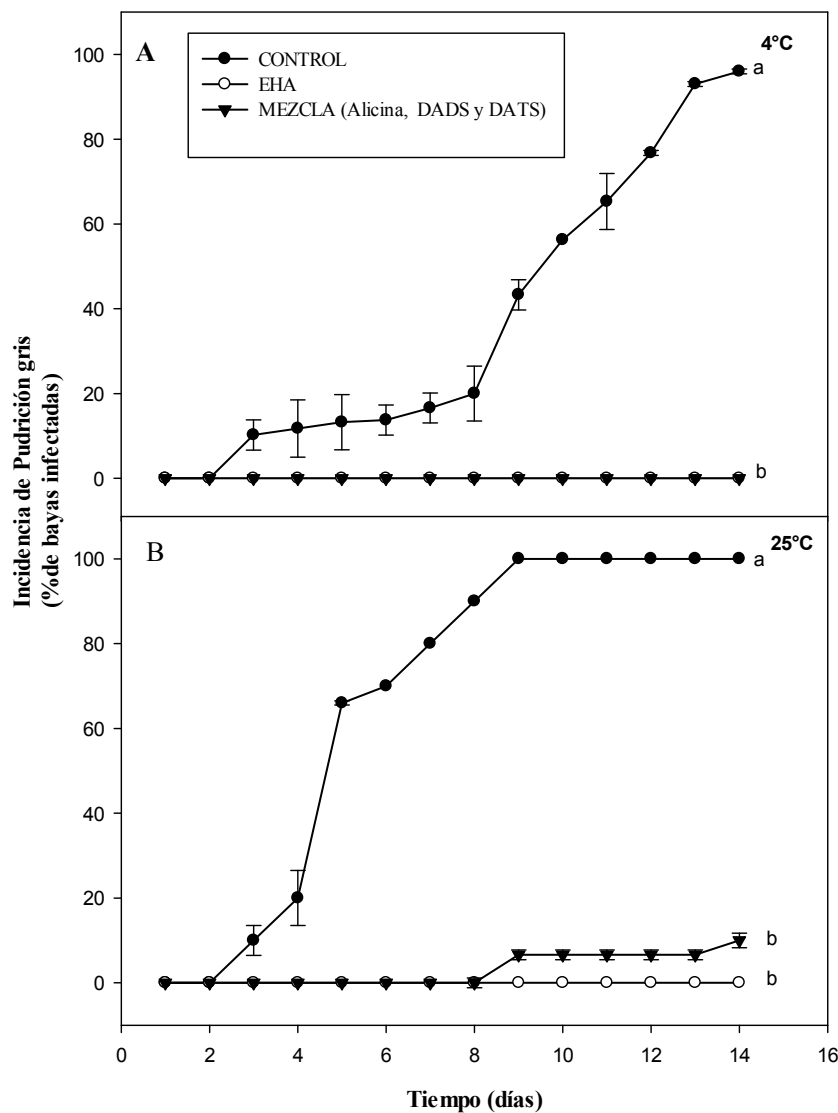


Figura 2. Efecto sinérgico de una mezcla de DADS, DATS y alicina sobre el progreso de la pudrición gris en racimos de uva de mesa, evaluados a 25 y 4 °C, durante 14 días, comparada con el EHA y su control. Barras verticales representan la desviación estandar (n=3). Letras iguales no son estadísticamente diferentes entre si de acuerdo con Tukey-Kramer para $P \leq 0.05$.

Figure 2. Synergistic effect of a mixture of DADS, DATS and alicin on gray mold development evaluated at 25 and 4 °C during 14 days, compared with EHA and its control. Vertical bars represent the standard deviation (n=3). Values with the same letter are not statistically different from each other for $P \leq 0.05$, according to Tukey-Kramer.

DADS, DATS y alicina, presentó 9% de incidencia de pudrición gris al día 10, permaneciendo ese valor hasta el día 14 que se mantuvo la evaluación.

DISCUSIÓN

Debido al creciente interés por encontrar alternativas de ocurrencia natural al uso de SO₂ para el control de la pudrición gris en uva de mesa (Parafati *et al.*, 2015), se planteó la evaluación de los volátiles que emite un extracto de ajo (EHA) y tres de sus principales componentes como DADS, DATS y alicina, (Iciek *et al.*, 2009) en el control de la pudrición gris en uva de mesa. Tanto el EHA como DADS, DATS y alicina, han demostrado ser bioactivos en la fase de vapor (Curtis *et al.*, 2004; Gándara-Ledezma *et al.*, 2015;), facilitando la posibilidad de utilizarlos en forma gaseosa para el control de *B. cinerea*, causante de la pudrición gris en racimos de uva, donde este fruto, por normas regulatorias para su comercialización, no debe entrar en contacto con sustancias líquidas después de haber sido cosechada (Codex Stan 255, 2007). Varios trabajos se han publicado sobre el efecto antibacteriano y antifúngico de extractos de ajo evaluados en medios líquidos (Harris *et al.*, 2001; Durairaj *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos las publicaciones de evaluaciones en forma volátil de los compuestos del ajo. En trabajos publicado por Curtis *et al.* (2004) y Gándara-Ledezma *et al.* (2015), se demostró el potencial antimicrobiano de los derivados de ajo aplicados en forma volátil. En el presente estudio, esos resultados se extienden al control de la pudrición gris, al demostrar que los compuestos volátiles que emite el EHA, DADS y DTS presentaron una marcada reducción de la incidencia de esta enfermedad en racimos de uva de mesa (Cuadro 3, Figura 1). La efectividad del EHA y los compuestos azufrados en reducir la pudrición

compounds. Studies published by Curtis *et al.* (2004) and Gándara-Ledezma *et al.* (2015) showed the antimicrobial potential of garlic derivatives applied in a volatile manner. In this study, those results were extended to the control of gray mold by demonstrating that volatile compounds emitted by EHA, DADS and DTS resulted in a significant reduction in the incidence of gray mold on table grape clusters (Table 3, Figure 1). EHA and sulphur compounds were more effective in reducing gray mold at low temperatures (4 °C) (Figure 1A), a relevant fact for the purpose of this research since *B. cinerea* develops vigorously at low temperatures (-0.5 °C) (Lichter *et al.*, 2006) and spreads easily throughout grape clusters during transportation and cold storage (Crisosto *et al.*, 2012). The effect of allicin on the incidence of gray mold showed a contrasting result at both temperatures, showed a similar effect on the control ($p \leq 0.05$) at 25 °C, as well as a similar effect on the more effective treatment (EHA) ($P \leq 0.05$) at 4 °C. Results from allicin may be associated with thermal instability given that, when it is not in liquid media, at higher temperatures it volatilizes quickly (Chong *et al.*, 2015), which causes a loss of antifungal activity. This was demonstrated by Curtis *et al.* (2004), who evaluated the effect of allicin from a garlic extract applied in a volatile manner on bacteria and fungi; they observed that the antimicrobial activity of allicin decreased as temperature increased, while at 4 °C activity remained constant. Antifungal activity of garlic extracts has been correlated with allicin content (Singh *et al.*, 2001). However, in this research, DATS volatiles were better than allicin in controlling gray mold, since DATS delayed the onset of the disease by 12 days at 4 °C and 8 days at 25 °C (Table 3), and only EHA controlled the disease during 14 days at both temperatures (Table 3). EHA effectiveness is attributed to its content of sulphur compounds (allicin, DADS and DATS)

gris, fue mejor cuando se evaluó a bajas temperatura (4 °C) (Figura 1A), siendo de particular relevancia para el objetivo de este estudio, ya que *B. cinerea*, se desarrolla vigorosamente a bajas temperaturas (- 0.5 °C) (Lichter *et al.*, 2006), dispersándose con facilidad sobre la uva de mesa durante el transporte y almacenamiento en frío (Crisosto *et al.*, 2012). El efecto de la alicina sobre la incidencia de la pudrición gris, mostró un resultado opuesto en las dos temperaturas evaluadas, presentando un efecto similar al control ($p \leq 0.05$) a 25 °C y un efecto similar al tratamiento más efectivo (EHA) ($P \leq 0.05$) a 4 °C. Este comportamiento de la alicina puede estar relacionado a la inestabilidad térmica, donde a mayores temperaturas se volatiliza rápidamente al no estar en un medio líquido (Chong *et al.*, 2015), perdiendo su actividad antifúngica, lo cual fue demostrado por Curtis *et al.* (2004) quienes evaluaron el efecto de la alicina obtenida de un extracto de ajo aplicado de forma volátil sobre bacterias y hongos, observando que la actividad antimicrobiana de la alicina se perdía conforme se incrementaba la temperatura, mientras que a 4 °C la actividad se mantuvo constante. La actividad antifúngica de los extractos de ajo ha estado correlacionada con el contenido de alicina (Singh *et al.*, 2001). Sin embargo, en este trabajo los volátiles de DATS resultaron mejor que alicina en el control de la pudrición gris, donde DATS retrasó el inicio de la enfermedad en 12 días a 4 °C y 8 días a 25 °C (Cuadro 3), y solamente el EHA mantuvo el control de la enfermedad durante 14 días en ambas temperaturas evaluadas (Cuadro 3). La efectividad del EHA se ha atribuido a su contenido de compuestos azufrados (alicina, DADS y DATS) (Fujisawa *et al.*, 2008), los cuales pueden estar actuando de manera sinérgica, como fue posible comprobarlo en este estudio (Figura 2), al evaluar una mezcla de DADS, DATS y alicina, la cual mantuvo control del desarrollo de la pudrición gris en los racimos de

(Fujisawa *et al.*, 2008), which may be acting in a synergistic way, as it was demonstrated in this research (Figure 2) by evaluating a mixture of DADS, DATS and alliin that controlled gray mold development on grape clusters at 4 °C, while at 25 °C the disease decreased by 94% compared with its control. The mixture of DADS, DATS and alliin produced a better effect on disease incidence than the individual components evaluated under the same temperature conditions and concentration (Figures 1 and 2).

Although in the literature there are reports on active agents for controlling gray mold, such as those by Muñoz and Moret (2010) and Tripathi *et al.* (2008), who used chitosan and acibenzolar-S-methyl, essential oils, respectively, those compounds were evaluated in liquid media and in direct contact with the fungus. The strength of this research is based on the effectiveness of garlic derived-compounds to control gray mold when they are applied in a gaseous form. According to Martínez *et al.* (2007), when antifungal agents are applied in a gaseous form they are less effective than when applied in liquid form at the same doses. In spite of the good results to reduce the incidence of gray mold on table grape, sulphur compounds still require further evaluations to be proposed as fungicide agents, especially studies including different dose ranges in large-scale tests. Organoleptic tests should also be conducted to ensure the absence of touches of flavor in fruit conferred by sulphur compounds.

CONCLUSIONS

Diallyltrisulfide and hydroalcoholic extract of garlic emitted volatiles that protected grape clusters against gray mold caused by *B. cinerea* during 14 days at 4 and 25 °C. This potential

uva evaluados a 4 °C, mientras que a 25 °C la reducción de la enfermedad fue del 94% comparada con su control. La mezcla de DADS, DATS y allicina, presentó mejor efecto sobre la incidencia de la enfermedad, que los componentes individuales evaluados a las mismas condiciones de temperatura y concentración (Figuras 1 y 2).

Aunque existen reportes en la literatura de agentes activos para el control de la pudrición gris como el de Muñoz y Moret (2010) y Tripathi *et al.* (2008), quienes utilizaron quitosano y metil acibenzolar, aceites esenciales, respectivamente, estos compuestos fueron evaluados en medios líquidos y en contacto directo con el hongo. La fortaleza de este estudio es la efectividad en el control de la pudrición gris mostrada por los compuestos derivados de ajo al ser aplicados en forma gaseosa, que de acuerdo con Martínez *et al.* (2007), los agentes antifúngico, cuando son aplicados en forma gaseosa, presentan menor efectividad que cuando la misma dosis es aplicada en forma líquida. Aun con los buenos resultados obtenidos en la reducción de la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa, los compuestos azufrados requieren de mayores evaluaciones para ser propuestos como agentes fungicidas, particularmente, estudios que incluyan diferentes rangos de dosis en pruebas de mayor escala. También son necesarias las evaluaciones organolépticas para asegurar la ausencia de notas de sabor conferidos por los compuestos azufrados a los frutos.

CONCLUSIONES

El dialiltrisulfuro y un extracto hidroalcohólico de ajo emiten volátiles que son capaces de conferir protección a los racimos de uvas contra la pudrición gris causada por *B. cinerea* durante 14 días evaluados a 4 y 25 °C. Este potencial, abre la posibilidad de su utilización como una alternativa a los

offers the possibility to use them as an alternative to traditional fungicides to control postharvest diseases.

Acknowledgments

The authors wish to thank to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the support scholarship granted to the first author of this study for her postgraduate studies at Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

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

fungicidas tradicionales para el control de enfermedades poscosecha.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al primer autor para realizar los estudios de posgrado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

## LITERATURA CITADA

- Chong K, Zamora MP, Tilakawardane DA, Buckely NE, Rego JA and Liu Y. 2015. Investigation of allicin stability in aqueous garlic extract by high performance liquid chromatography method. *Journal of Scientific Research and Reports* 4:590-598. <http://doi.org/10.9734/JSRR/2015/14301>
- CODEX STAN 255. Norma para las uvas de mesa. 2007. Disponible en línea: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2B252FSTAN%2B255-2007%252FCXS\\_255s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2B252FSTAN%2B255-2007%252FCXS_255s.pdf)
- Crisosto CH, Mitcham EJ and Kader A. 2012. Recomendaciones para mantener la calidad poscosecha. Davis, CA. Disponible en línea: [http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity\\_Resources/Fact\\_Sheets/Datastores/Fruit\\_Spanish/?uid=56&ds=802](http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Fruit_Spanish/?uid=56&ds=802)

- Curtis H, Noll U, Störmann J and Slusarenko AJ. 2004. Broad-spectrum activity of volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 65:79-89. <http://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.11.006>
- Durairaj S, Srinivasan S and Lakshmanaperumalsamy P. 2010. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology* 6:92-97. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/7042/5fe4ac5bfbf4ac9a51c4869496331ce1dbc9.pdf>
- Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagal H, Seki T and Ariga T. 2008. Biological and Chemical Stability of Garlic-Derived Allicin. *Agricultural and Food Chemistry* 56:4229-4235. <http://doi.org/10.1021/jf8000907>
- Gándara-Ledezma A, Corrales-Maldonado C, Rivera M, Martínez-Téllez MA and Vargas-Arispuro I. 2015. Post-harvest control of gray mold in table grapes using volatile sulfur compounds from *Allium sativum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:487-503. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6757>
- Harris JC, Cottrell SL, Plummer S and Lloyd D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57:282-286. <http://doi.org/10.1007/s002530100722>
- Iciek, M, Kwiecien I and Wlodek L. 2009. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50:247-265. <http://doi.org/10.1002/em.20474>
- Jansen H, Müller B and Knobloch K. 1987. Allicin Characterization and its Determination by HPLC. *Planta medica* 559-562. <http://doi.org/10.1055/s-2006-962811>
- Lichter A, Gabler FM and Smilanick JL. 2006. Control of spoilage in table grapes. *Stewart Postharvest Review*. 2:1-10. <http://doi.org/10.2212/spr.2006.6.1>
- Lichter A, Zutahy Y, Kaplunov T and Lurie S. 2008. Evaluation of table grape storage in boxes with sulfur dioxide-releasing pads with either an internal plastic liner or external wrap. *HortTechnology* 18:206-214. Disponible en línea: <http://horttech.ashspublishings.org/content/18/2/206.full>
- Martínez JA, Navarro A, Fernández JA and Bañón S. 2007. Using proclobutazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. *Australian Plant Pathology* 36:39-45. <http://doi.org/10.1071/AP06078>
- Milkota F, Smilanick JL, Mansour MF and Karaca H. 2010. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 55:85-90. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.004>
- Moo-Koh FA, Alejo CJ, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Sandoval-Luna R y Ramírez-Pool JA. 2014. Actividad in vitro del extracto acuoso de *Bonellia Flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48:833-845. Disponible en línea: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/nov-dic/art-6.pdf>
- Muñoz Z and Moret A. 2010. Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Pest Management Science* 66:974-979. <http://doi.org/10.1002/ps.1969>
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME, Castellanos de Figueroa LI and Vázquez F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* 64:40-48. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.009>
- NCSS Number Cruncher Statistical Systems, "Statistical Program for Windows", Kaysville, Utah, 2007.
- Parafati L, Vitale A, Restuccia C and Cirvilleri G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47:85-92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Perelló A, Ulrike N and Slusarenko A. 2013. In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research* 7:1809-1817. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.511>
- Ruiz-Moreno MJ, Raposo R, Cayuela JM, Zafrilla P, Piñero Z, Moreno-Rojas JM, Molero J, Puertas B, Giron F, Guerrero RF and Cantos-Villar E. 2015. Valorization of Grape Stems. *Industrial and Crops Products* 63:152-157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.016>
- Sanzani MS, Schena L, DeCicco V and Ippolito A. 2012. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grape. *Postharvest Biology and Technology* 68:64-71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.02.003>
- Singh UP, Prithiviraj B, Sarma BK, Singh M and Ray BA. 2001. Role of garlic (*Allium sativum*) in human and Plant diseases. *Indian Journal of Experimental Biology* 39:310-322. Disponible en línea: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/23711/1/IJEB%2039%284%29%20310-322.pdf>
- Tripathi P, Dubey NK and Shukla AK. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Technology* 24:39-46. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9435-2>
- Tsao SM and Yin MC. 2001. In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oil. *Journal of Medical Microbiology* 50:646-649. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-646>
- Tzortzakis N, Singleton I and Barnes J. 2007. Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biology and Technology* 43:261-270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.005>
- Vázquez N, 2011. Asociación agrícola de productores de uva de mesa, modelo de agricultura moderna en México en el siglo XXI. Fundación Produce Sonora, A.C. México. 92p. Disponible en línea: <https://www.redinnovagro.in/casosexito/48sonorauvademesa.pdf>
- Wallock-Richards D, Doherty CJ, Doherty L, Clarke DJ, Place M, Place M, Govan RJ and Campopiano JD. 2014. Garlic Revisited: Antimicrobial Activity of Allicin-Containing Garlic Extracts against *Burkholderia cepacia* Complex. *PLoS ONE* 9:1-13. e112726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112726>
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and Van Kan JA. 2007. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>