




Effect of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. on the physiology of Pea (*Pisum sativum* L.)

Efecto de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. sobre la fisiología de guisantes (*Pisum sativum* L.)

Efeito da *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. na fisiologia das ervilhas (*Pisum sativum* L.)

Kashifa Noureen¹, Khajista Jabeen^{1*}, Sumera Iqbal¹,
Summera Jahan^{1,2} and Sumera Javad¹

¹Department of Botany, Lahore College for Women University, Jail Road, Lahore, Pakistan. Email: (KN) wasif_naseer@yahoo.com; (KJ) khajista_1@hotmail.com,  (SI) sumeraiqbal2@yahoo.com,  (SJ) aremmus_jahan@yahoo.com, (SJ) zif_4@yahoo.com, .

²Department of Botany, University of Gujrat, Gujrat, Pakistan.

Abstract

Alternaria alternata (Fr.) Keissl. is responsible for causing leaf spots and blight diseases on a large number of horticultural and agricultural crops including pea. The response and resistance of different pea varieties to this fungus might vary. Therefore, this study was aimed to investigate the varietal differences in the physiological response of *Pisum sativum* L. to *A. alternata*. Various physiological and biochemical parameters of two commercial pea varieties (Leina and Meature) were assessed at vegetative stage in pot experiment. Sterilized seeds were soaked in 1×10^5 mL conidial suspension of *A. alternata* for 15 min and control seeds were soaked in sterilized water. These sterilized seeds were sown in pots containing sterilized soil. In both varieties, germination percentage, germination rate, seedling vigor index, root and shoot length, dry and fresh biomass, leaf sugar, chlorophyll *a*, *b*, total chlorophyll and carotenoid contents, leaf osmotic potential, leaf relative water content, significantly decreased under *A. alternata* stress as compared to control. But proline and protein content significantly increased. It is concluded from the results that *A. alternata* caused adverse effects on the physiology of pea plant. The tested pea variety Leina was found to be more sensitive under fungal stress of *A. alternata* as compared to Meature and the extent of stress caused by both test varieties can be exploited in future studies.

Keywords: biotic stress, biochemical, blight, germination, pot experiment.

Received el 15-01-2018 • Accepted el 17-12-20.

*Corresponding author. E-mail: khajista_1@hotmail.com

Resumen

Alternaria alternata (Fr.) Keissl. es responsable de causar manchas foliares y enfermedades de tizón en una gran cantidad de cultivos hortícolas y agrícolas, incluido el guisante. La respuesta y resistencia de diferentes variedades de guisantes a este hongo puede variar. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar las diferencias varietales en la respuesta fisiológica de *Pisum sativum* L. a *A. alternata*. Varios parámetros fisiológicos y bioquímicos de dos variedades comerciales de guisantes (Leina y Meature) fueron evaluadas en etapa vegetativa en macetas experimentales. Semillas estériles se humedecieron durante 15 min con una suspensión de 1×10^5 mL de conidios de *A. alternata* y las semillas de control se humedecieron con agua estéril. Estas semillas se sembraron en macetas que contenían tierra estéril. En ambas variedades el porcentaje de germinación, tasa de germinación, índice de vigor de plántulas, longitud de raíz y brote, biomasa seca y fresca, azúcar de hoja, contenido de clorofila *a* y *b*, contenido de clorofila total y de carotenoides, potencial osmótico foliar, contenido relativo de agua foliar, disminuyeron significativamente en *A. alternata* estresada en comparación con el control. Pero el contenido de prolina y proteínas aumentó significativamente. Se concluye de estos resultados que *A. alternata* causó efectos adversos en la fisiología de la planta de guisantes. Se encontró que la variedad de guisantes Leina es más sensible bajo el estrés fúngico de *A. alternata* en comparación con Meature y el grado de estrés causado por ambas variedades de prueba puede ser aprovechadas en estudios futuros.

Palabras clave: estrés biótico, bioquímica, tizón, germinación, experimento en maceta.

Resumo

Alternaria alternata (Fr.) Keissl. é responsável por causar manchas de folhas e doenças de pragas em um grande número de culturas hortícolas e agrícolas, incluindo ervilha. A resposta e resistência de diferentes variedades de ervilhas a este fungo pode variar. Por isso, este estudo teve como objetivo investigar as diferenças varieta na resposta fisiológica de *Pisum sativum* L. a *A. alternata*. Vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos de duas variedades comerciais de ervilha (Leina e Meature) foram avaliados em estágio vegetativo no experimento de maconha. Asementes terilizadas foram embebidas em 1×10^5 mL de suspensão concisal de *A. alternata* por 15 min e as sementes de controle foram encharcadas em água esterilizada. Estas sementes esterilizadas foram semeadas em vasos contendo solo esterilizado. Em ambas as variedades, percentual de germinação, taxa de germinação, índice de vigor de mudas, comprimento de raiz e tiro, biomassa seca e fresca, açúcar de folha, clorofila *a*, *b*, teor total de clorofila e carotenoide, potencial osmótico de folhas, teor de água relativa da folha, diminuiu significativamente sob estresse *alternata* em comparação com o controle. Mas o teor de prolina e proteína

umentou significativamente. Conclui-se a partir dos resultados que *A. alternata* causou efeitos adversos na fisiologia da planta de ervilha. A variedade de ervilha testada Leina foi encontrada mais sensível sob o estresse fúngico de *A. alternata* em comparação com Meature e a extensão do estresse causado por ambas as variedades de teste pode ser explorada em estudos futuros.

Palavras-chave: estresse biótico, bioquímico, praga, germinação, experimento de maconha

Introduction

Pea (*Pisum sativum* L.) belongs to the Fabaceae family. It is an important vegetable crop which grows worldwide in the tropical areas. Pea contributes about one-third of humankind's direct protein intake, while also serving as an important source of fodder and forage for animals and of edible and industrial oils. Economically, legumes represent the second most important family of crop plants after Poaceae. Pea seeds are rich in protein, starch, sugars, fibers, minerals, and vitamins. Due to its nutritional and economic importance it is cultivated worldwide. One the most important attributes of legumes is their capacity for symbiotic nitrogen fixation, underscoring their importance as a source of nitrogen in both natural and agricultural ecosystems. In Pakistan pea average yield is about 178231 t.ha⁻¹ and it is the lowest among other pea cultivating countries and cannot fulfill the demand of the country (FAO, 2018).

Various pests, bacteria, fungi, viruses, and other insects damage crop plants during different stages of their development and growth (Tapwal *et al.*, 2011). Fungal plant pathogens are responsible for drastic annual losses in crop production and yield. It has

Introducción

El guisante (*Pisum sativum* L.) pertenece a la familia Fabaceae. Es un cultivo vegetal importante que crece en las áreas tropicales de todo el mundo. El guisante aporta aproximadamente un tercio de la ingesta proteica directa de la humanidad, al mismo tiempo que sirve como una fuente importante de forraje para animales y de aceites comestibles e industriales. Económicamente, las legumbres representan la segunda familia más importante del cultivo de plantas después de las Poaceae. Las semillas de guisantes son ricas en proteínas, almidón, azúcares, fibras, minerales, y vitaminas. Debido a su importancia nutricional y económica es cultivado en todo el mundo. Uno de los atributos más importantes de las legumbres es su capacidad para la fijación simbiótica de nitrógeno, resaltando su importancia como fuente de nitrógeno tanto en ecosistemas naturales como agrícolas. En Pakistán, el rendimiento promedio del guisante es de aproximadamente 178231 t.ha⁻¹ y es el más bajo entre otros países productores de guisantes y no puede satisfacer la demanda del país (FAO, 2018).

been estimated that the major crops suffer from more than 70% of diseases caused by fungi (Agrios, 2005). Many plant pathogens like *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* and *A. alternata* are the major cause of scrupulous damage to agriculture crops at pre and post-harvest stages (Hadizadeh *et al.*, 2009).

Members of genus *Alternaria* are drastic fungal plant pathogens that cause diseases on aerial parts of plants and affect the process of photosynthesis which in turn affects yield and production (Meena *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). *Alternaria* is widely distributed in many food and feed crops as well as in soil, household dust and decaying organic material (Aneja and Agnihotri, 2013). *Alternaria alternata* is responsible for causing leaf spots and blight diseases on a large number of horticultural and agricultural crops including pea, potato and tomato (Yang *et al.*, 2013; Rodino *et al.*, 2014). Regarding the changes in the physiology of pea plant by *Alternaria* blight, the lesions appears after infection on the leaves and other aerial parts severely damage by reduction in photosynthesis rate. The reduction in photosynthesis was led to low respiration rate and ultimately the plant growth retarded (Fondevilla *et al.*, 2005). *Alternaria* spp. produces variety of secondary metabolites which induce cytotoxic and phytotoxic effects in pea plant (Hadi, 2019).

Therefore the present study was aimed to evaluate the impact of *A. alternata* on the physiology and biochemistry of two local pea varieties of Pakistan.

Varias plagas, bacterias, hongos, virus, y otros insectos, dañan los cultivos de las plantas durante las diferentes etapas de su desarrollo y crecimiento (Tapwal *et al.*, 2011). Los patógenos fúngicos de las plantas son responsables por las pérdidas drásticas anuales en la producción de cultivo y su rendimiento. Se ha estimado que más del 70% de las enfermedades que afectan los principales cultivos son causadas por hongos (Agrios, 2005). Muchos patógenos de plantas como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* y *A. alternata* son la principal causa del daño severo a cultivos agrícolas en las etapas de pre y post cosecha (Hadizadeh *et al.*, 2009).

Los miembros del género *Alternaria* son patógenos fúngicos drásticos de plantas que causan enfermedades en las partes aéreas de las plantas y que afectan el proceso de fotosíntesis, lo que a su vez perjudica el rendimiento y la producción (Meena *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). *Alternaria* está ampliamente distribuida en muchos cultivos, así como en el suelo, el polvo doméstico y el material orgánico en descomposición. (Aneja y Agnihotri, 2013). *Alternaria alternata* es responsable de causar manchas en las hojas y enfermedades de tizón en un gran número de cultivos hortícolas y agrícolas, incluyendo guisantes, patatas y tomates (Yang *et al.*, 2013; Rodino *et al.*, 2014). Con respecto a los cambios en la fisiología de la planta de guisante por el tizón de *Alternaria*, las lesiones aparecen después de la infección en las hojas, y en las otras partes áreas se daña severamente

Materials and methods

The experiment was conducted in Lahore College for Women University Lahore, Pakistan, during the pea crop growing season. Seeds of two varieties of Pea plant Leina and Meature were collected from National Vegetable Seed Development Program, NARC Islamabad, Pakistan. The test fungus *Alternaria alternata* (accession # FCBP-1071) was procured from Fungal Culture Bank University of the Punjab, Lahore, Pakistan. The experiment was laid down as randomized complete block design and in each block control and experimental pots were placed in completely randomized way in 6 blocks and each 4 pots, two control and two experimental. The seeds were surface sterilized with 0.2% mercuric chloride solution for five minutes to stop any microbial infection and then thoroughly rinsed with distilled water for three times. For conducting pot experiment, sterilized seeds of both test varieties of pea were soaked into 1×10^5 mL conidial suspension of *A. alternata* for 15 min and control seeds were only in sterilized water. Plastic pots of 30 cm diameter were filled with 10 kg of sterilized soil in each pot and ten seeds per pot were initially sown. Two sets of pots were maintained one contains fungus inoculated seeds and the second set was with only surface sterilized seeds (Younas *et al.*, 2016).

la planta por reducción en la tasa de fotosíntesis. La reducción en la fotosíntesis condujo a una tasa de respiración baja y, en última instancia, se retrasó el crecimiento de la planta (Fondevilla *et al.*, 2005). *Alternaria* spp. produce una variedad de metabolitos secundarios que inducen efectos citotóxicos y fitotóxicos en la planta de guisantes (Hadi, 2019).

Por lo tanto la presente investigación estuvo dirigida a evaluar el impacto de *A. alternata* en la fisiología y bioquímica de dos variedades locales de guisantes de Pakistán.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en Lahore College for Women University Lahore, Pakistán, durante la temporada de siembra de cultivo de guisantes. Semillas de dos variedades de guisante Leina y Meature fueron recolectadas de Leina y Meature Islamabad, Pakistán. El test del hongo *Alternaria alternata* (accesión # FCBP-1071) fue adquirido por Fungal Culture Bank University of The Punjab, Lahore, Pakistán.

El experimento se planteó como un diseño de bloques completamente al azar, siendo 6 bloques cada uno conteniendo 4 macetas, dos de control y dos experimentales. Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de cloruro de mercurio al 0,2% durante cinco minutos para detener cualquier infección microbiana y luego se enjuagaron minuciosamente con agua destilada tres veces. Para realizar el experimento en macetas, las semillas esterilizadas de ambas variedades de

Germination was recorded at daily basis by counting the number of seed germinated in every Pot. After fifteen days of germination the plants were thinned to five plants per pot. The germination rate was determined by the formula (Mostafavi, 2011).

$$GR = \frac{\Sigma N}{\Sigma(n \times g)}$$

The germination percentage was determined by the formula,

$$GP = (SNP/SNO) 100\%$$

Twelve days after seed sowing three seedlings from each of the Pot were randomly selected for fresh, dry weight and seed vigor index determination. Rootlet and shootlet lengths were measured with ruler in cm. The seed vigor index was determined by using the formula given by Abdul-Baki and Anderson (1973).

Seed Vigor Index= Germination percentage Seedling length

Plants of both sets were observed daily, up to 40 days, to record the development of *A. alternata* blight disease by visualizing and counting the total diseased plants in each pot. Sampling was done at vegetative stage after 40 days of sowing and the surviving plants were uprooted, washed in tap water to remove soil particle and kept immersed in tap water till observation. After weighing five plants samples were stored at -20°C in refrigerator till further analysis proceeded. Later these samples were used to estimate the osmotic potential of the leaves cell sap with a vapor pressure Osmometer following the method of Capell and Dörffling (1993) by using the following formula:

guisantes de prueba se empaparon en 1 x 10⁵ mL de suspensión de conidios de *A. alternata* durante 15 min y las semillas de control solo estaban en agua esterilizada.

Las macetas plásticas de 30 cm de diámetro fueron llenadas con 10 kg de suelo esterilizado en cada maceta y 10 semillas por maceta fueron sembradas inicialmente. Se mantuvieron dos juegos de macetas, uno contenía semillas inoculadas con hongos y el otro contenía semillas esterilizadas (Younas *et al.*, 2016).

La germinación se registró diariamente por el conteo del número de semillas germinadas en cada maceta. Después de quince días de germinación, las plantas se redujeron a cinco plantas por maceta. La tasa de germinación se determinó mediante la fórmula (Mostafavi, 2011).

$$GR = \frac{\Sigma N}{\Sigma(n \times g)}$$

El porcentaje de germinación fue determinado por la fórmula:

$$GP = (SNP/SNO) 100\%$$

Veinte días después de la siembra de las semillas, tres plántulas de cada maceta fueron seleccionadas aleatoriamente para la determinación de peso fresco, seco e índice de vigor de la semilla. Se midieron las longitudes de las raíces y de los brotes con una regla milimetrada. El índice de vigor de la semilla se determinó mediante la fórmula proporcionada por Abdul-Baki y Anderson (1973).

Índice de vigor de la semilla= Porcentaje de germinación x Longitud de las plántulas.

Osmotic potential = -osmolality (mosmol) $\times 0,831 \times 10^{-5} \times T$ (K).

Relative water content (RWC) of both control and infected pea leaves (leaves of five plants for each treatment) were calculated according to the method of Weatherley (1950).

$RWC = [(fresh\ mass - dry\ mass) / (saturated\ mass - dry\ mass)] \times 100$

Sugar content of leaves of five plants of both control and experimental was determined following the method of Dubois *et al.* (1956). Proline content of leaves samples was estimated following the method of Bates *et al.* (1973). Protein content of leaves was estimated following the method of Lowry *et al.* (1951).

To estimate chlorophyll and carotenoid contents Hiscox and Israelstam (1979) method was used. Chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll were calculated by Arnon's formula (1949). Carotenoid content was estimated according to the method of Lichtenthaler and Wellburn (1983).

The data of the research study was evaluated by using ANOVA and Duncan's Multiple Range Test (DMRT) was used to compare the mean values.

Results and discussion

Effects of *A. alternata* on the germination parameters and physiology of pea are revealed as follows, significant lower germination percentage and germination rate in *A. alternata* treated seeds was observed in both varieties Leina and Meature as compared to control (figure 1A and B). Infected leaves of 'Leina' and 'Meature' varieties of pea plant

Plantas de ambos juegos fueron observadas diariamente hasta 40 días, para registrar el desarrollo de la enfermedad del tizón de *A. alternata* por visualización y conteo del total de plantas enfermas en cada maceta. El muestreo fue realizado en etapa vegetativa después de 40 días de siembra y las plantas supervivientes se arrancaron de raíz, se lavaron con agua del grifo para eliminar las partículas de suelo y se mantuvieron sumergidas en agua hasta la observación. Después de pesar cinco muestras de plantas, estas fueron almacenadas a -20°C en el refrigerador hasta que se prosiguió el análisis. Posteriormente estas muestras se utilizaron para estimar el potencial osmótico de la savia celular de las hojas con un Osmómetro de presión de vapor siguiendo el método de Capell y Dörffling (1993) usando la siguiente formula:

Potencial osmótico= Osmolalidad (mosmol) $\times 0,831 \times 10^{-5} \times T$ (K).

El contenido de hídrico relativo (RWC) de ambas hojas de guisantes, las de control e infectadas (Hojas de cinco plantas por cada tratamiento) fueron calculadas de acuerdo al método de Weatherley (1950).

$RWC = [(masa\ fresca - masa\ seca) / (masa\ saturada - masa\ seca)] \times 100$

El contenido de azúcares de las hojas de cinco plantas tanto de control como experimentales se determinó siguiendo el método de Dubois *et al.* (1956). El contenido de prolina de las muestras de hojas se determinó siguiendo el método de Bates *et al.* (1973). El contenido de proteínas de las hojas se determinó siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951).

also showed significant reduction in seedling vigor index (figure 2). Because fungus produces fungal metabolites which ultimately degrade the quality of the seeds and decrease their viability either by damaging cell membrane, by synthesizing cell wall degrading enzymes or by diminishing seedling amylase function (Shirurkar and Wahegaonkar, 2012; Khan *et al.*, 2017). *A. alternata* produces AAL-toxin which is a low molecular weight toxin and thought to be involved in the pathogenicity of *Alternaria* species in their selective host (Tsuge *et al.*, 2013; Taj *et al.*, 2015). Furthermore, biotic stresses significantly inhibit the growth of seeds and decreased germination rate, germination percentage and seedling vigour index (Perelló *et al.*, 2013). *Alternaria* blight also affects the other members of Fabaceae family as Sharma *et al.* (2013) reported that pigeon pea plants were severely damage by infection caused by *Alternaria alternata*.

Root and shoot lengths in fungus inoculated seeds of Leina and Meature was significantly reduced as compared to control (figure 3). Similar results were reported by Pangrikar *et al.* (2009) that the culture filtrates of three species of *Aspergillus* caused reduction in root and shoot length of cereals and pulses seed samples. Gachande and Jadhav (2011) also stated that root-shoot length of seedlings of pigeon pea varieties significantly suppressed by the metabolites of rhizospheric fungi of pigeon pea.

Biotic stress of *A. alternata* significantly reduced the fresh

Para estimar el contenido de clorofila y de carotenoides fue utilizado el método de Hiscox y Israelstam (1979). La clorofila a, b y el total de clorofila se calculó utilizando la fórmula de Arnon's (1949). El contenido de carotenoides se determinó de acuerdo al método de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los datos del estudio se procesaron mediante ANOVA y la Prueba de rango múltiple de Duncan (DMRT) se utilizó para comparar los valores medios.

Resultados y discusión

Los efectos de *A. alternata* sobre los parámetros de germinación y la fisiología del guisante son presentados a continuación.

Un porcentaje de germinación y una tasa de germinación significativamente más bajos en las semillas tratadas con *A. alternata* fue observado en ambas variedades Leina y Meature en comparación al control (figura 1A y B). Las hojas infectadas de las variedades de guisantes 'Leina' y 'Meature' mostraron una significativa reducción en el índice de vigor de la plántula (figura 2). Se ha determinado que el hongo produce metabolitos, los cuales finalmente degradan la calidad de las semillas y disminuyen su viabilidad ya sea dañando la membrana celular, sintetizando enzimas que degradan la pared celular o disminuyendo la función amilasa de las plántulas (Shirurkar y Wahegaonkar, 2012; Khan *et al.*, 2017). *A. alternata* produce oxitocina AAL, la cual es una toxina de bajo peso molecular y se cree que está

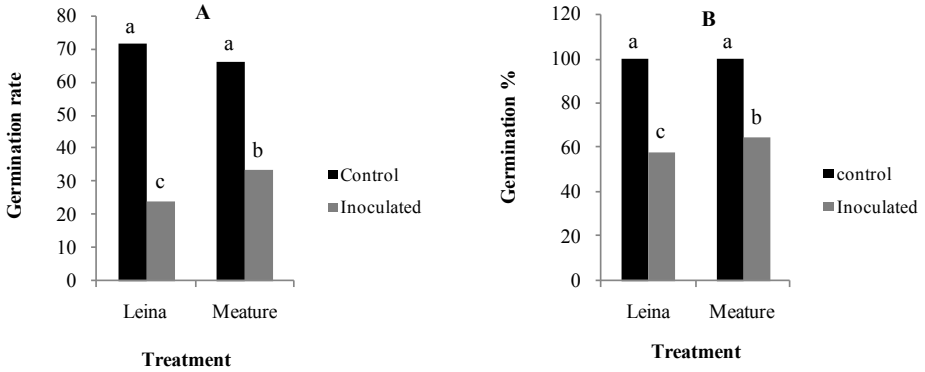


Figure 1A & B. Effect of *Alternaria alternata* on germination percentage and rate of germination of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 1A y B. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el porcentaje de germinación y tasa de germinación de las variedades de guisantes Leina y Meature. Los valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

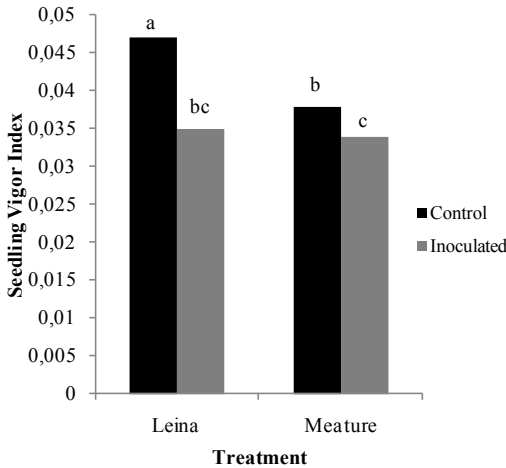


Figure 2. Effect of *Alternaria alternata* on seedling vigor index of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 2. Efecto de *Alternaria alternata* en el índice de vigor de plántulas de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT

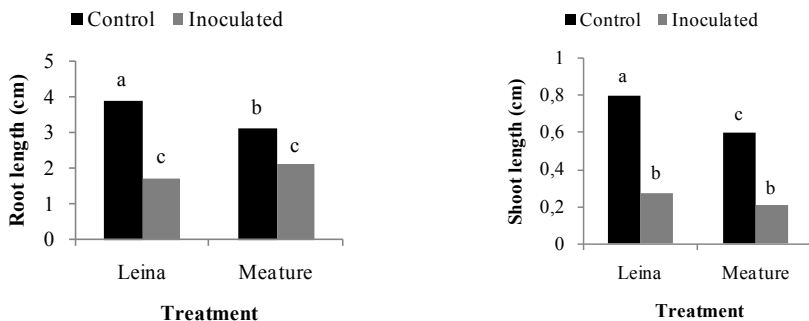


Figure 3. Effect of *Alternaria alternata* on root length and shoot length (cm) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 3. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la longitud (cm) de la raíz y de los brotes de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

and dry weight of seedling of both varieties 'Leina' and 'Meature' in comparison to control (figure 4). So, it could be considered that pathogenic fungi produce various toxin which disturb the plant normal physiology by enhancing nutrients leakage from the damaged tissues (Noelting *et al.*, 2016) which finally result in poor growth and overall reduction in plant biomass (Houssien *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012).

Significantly lower relative water content of leaves in both fungal treated plant varieties was observed compared to control (figure 5). Biotic stresses affect the water content of leaves, because it works during photosynthesis and help in transport of assimilates to other parts of plant body. The decline in leaf relative water content could be due to either

involucrada en la patogenicidad de las especies de *Alternaria* en su huésped selectivo (Tsuge *et al.*, 2013; Taj *et al.*, 2015). Además, el estrés biótico inhibe significativamente el crecimiento de las semillas y disminuye la tasa de germinación, el porcentaje de germinación y el índice de vigor de plántulas (Perelló *et al.*, 2013). El tizón de *Alternaria* también afecta a los otros miembros de la familia Fabaceae como Sharma *et al.* (2013) informó que las plantas de *Cajanus cajan* fueron severamente dañadas por la infección causada por *Alternaria alternata*.

La longitud de raíz y brote en semillas de Leina y Meature inoculadas con hongos se redujeron significativamente en comparación al control (figura 3). Resultados similares se reportaron por Pangrikar *et al.* (2009) donde los filtrados de cultivo de tres especies de *Aspergillus*

raised respiration rates or due to membrane injury and development of necrotic areas by the pathogenic fungi (Orcutt and Nilsen, 2000).

Osmotic potential in both tested varieties inoculated with fungus

causaron una reducción en la longitud de las raíces y brotes de muestras de semillas de cereales y legumbres. Gachande y Jadhav (2011) también afirmaron que la longitud de los brotes y de la raíz de las plántulas de

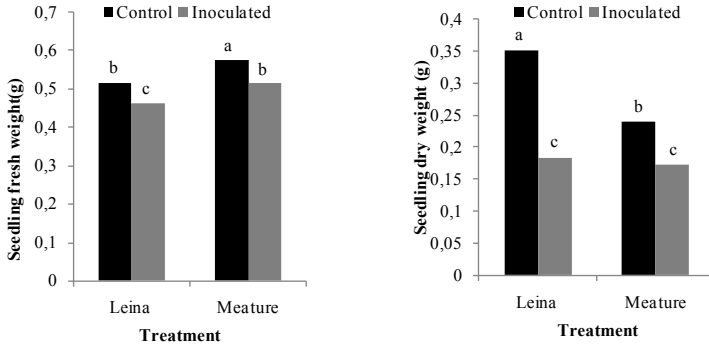


Figure 4. Effect of *Alternaria alternata* on seedling fresh and dry weight of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 4. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el peso fresco y seco de las plántulas de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

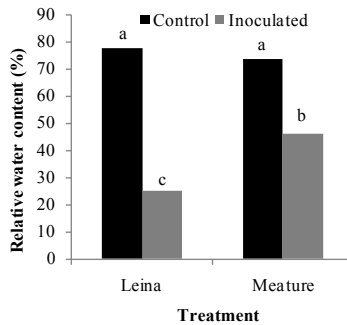


Figure 5. Effect of *Alternaria alternata* on leaf relative water content (%) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 5. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el contenido relativo de agua de la hoja (%) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

were significantly low as compared to control plants (figure 6). The lower osmotic potential in infected leaves might be due to proline and other osmolytes accumulation in the leaves under stress which ultimately decreased osmotic potential.

Minimum chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid content

las variedades de *Cajanus cajan* se suprimió significativamente por los metabolitos de los hongos rizosféricos del guandú.

El estrés biótico de *A. alternata* redujo significativamente el peso fresco y seco de las plántulas de ambas variedades “Leina” y “Meature” en comparación con el control (figura 4). Por lo tanto, se

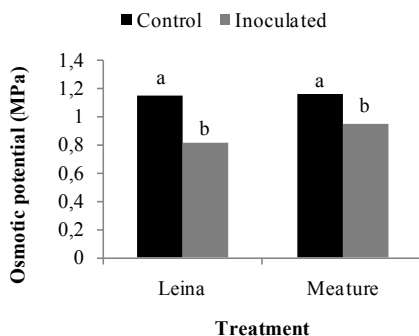


Figure 6. Effect of *Alternaria alternata* on leaf osmotic potential (-MPa) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figure 6. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el potencial osmótico de la hoja (-MPa) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT

were observed in both the tested pea varieties ‘Meature’ and ‘Leina’ over control (figure 7). Shirurkar and Wahegaonkar (2012) suggested that different toxin produced by fungi in plants disrupts synthesis of chlorophyll by inhibiting grana formation which leads to discoloration in the diseased plants. Biotic stress also caused destruction of carotenoids and chlorophyll contents (Scharte *et al.*, 2005).

podría considerar que los hongos patógenos producen varias toxinas que alteran la fisiología normal de la planta al propiciar la fuga de nutrientes de los tejidos dañados (Noelting *et al.*, 2016) que finalmente resultan en un crecimiento deficiente y una reducción general de la biomasa vegetal (Houssien *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012).

Se observó un contenido relativo de agua significativamente menor

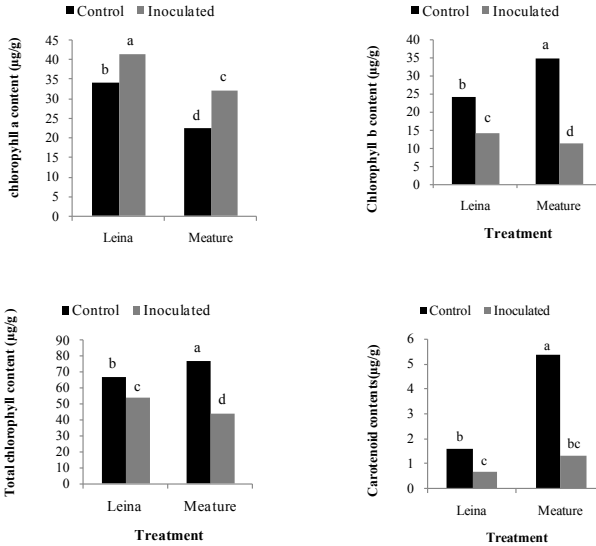


Figure 7. Effect of *Alternaria alternata* on leaf chlorophyll a,b, total chlorophyll and carotenoid content (µg.g⁻¹) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference (p<0.05) as determined by DMRT test.

Figura 7. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la clorofila a y b, contenido total clorofila y contenido de carotenoides en las hojas (µg.g⁻¹) de las variedades de guisante Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa (p<0,05) según lo determinado por el test DMRT.

Significantly high proline content was observed in fungus treated plant varieties Leina and Meature in comparison to control treatment (figure 8). In the leaves of fungus inoculated variety ‘Leina’ maximum proline content (mg.g⁻¹) was found as compare to variety ‘Meature’. Proline is stress signaling compound and free proline contents increased in stressed plants in comparison with the healthy plants because proline involves in reactive oxygen species scavenging, in cytosolic acidity regulation and in osmotic adjustment (Arie *et al.*, 2007). Proline accumulation in higher

en las hojas de ambas variedades de plantas tratadas con hongos en comparación con el control (figura 5). El estrés biótico afecta el contenido de agua de las hojas, porque actúa durante la fotosíntesis y ayuda al transporte de asimilados a otras partes de la planta. La disminución en el contenido relativo de agua de las hojas podría deberse al aumento de las tasas de respiración o al daño de la membrana y al desarrollo de áreas necróticas por los hongos patógenos (Orcutt y Nilsen, 2000).

El potencial osmótico en ambas variedades probadas inoculadas con

vascular plants is a significant stress response against biotic stress agents such as pathogens (Claussen, 2005).

hongos fue significativamente bajo en comparación a las plantas control (figura 6). El potencial osmótico

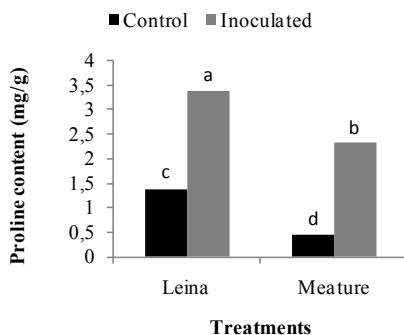


Figure 8. Effect of *Alternaria alternata* on leaf proline content (mg.g^{-1}) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p \leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 8. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el contenido de prolina en las hojas (mg.g^{-1}) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT-

Significant increase in protein content was observed in variety Leina fungus treated plants over control plants (figure 9). In variety 'Meature' protein content also enhanced in fungus treated plants as compare to control. Several studies reported that plants produced a class of proteins, known as pathogenesis-related (PR) proteins against microbial invaders (Wang *et al.*, 2010). PR proteins are known to be expressed in response to various external stimuli, including a variety of abiotic and biotic stress factors (El-Khallal, 2007).

The infected plants of both varieties 'Leina' and 'Meature' showed significantly lower leaf sugar content in comparison to control (figure 10). In varietal comparison

más bajo en hojas infectadas podría deberse a la acumulación de prolina y otros osmolitos en las hojas bajo estrés, que finalmente ocasionaron su disminución.

El contenido mínimo de clorofila a y b, total de clorofila y carotenoides fue observado en ambas variedades evaluadas de guisantes 'Meature' y 'Leina' en comparación con el control (figura 7). Shirurkar y Wahegaonkar (2012) sugirieron que toxinas diferentes producidas por hongos en las plantas interrumpen la síntesis de clorofila inhibiendo la formación de grana dentro de los cloroplastos, ocasionando la descoloración en plantas enfermas. El estrés biótico también causa la destrucción de los contenidos de carotenoides y de

significantly lowest sugar content was found in leaves of fungus treated plant in variety 'Leina'. This decrease in sugar content under *A. alternata* might be due to the destructive effect of the causal organism and its mycotoxins on the sugar content (Alqarawi *et al.*, 2013).

clorofila (Scharte *et al.*, 2005).

Un alto contenido significativo de prolina fue observado en las variedades Leina y Meature tratadas con hongos, en comparación al tratamiento de control (figura 8). En las hojas de la variedad 'Leina' inoculadas con el hongo se encontró el máximo contenido

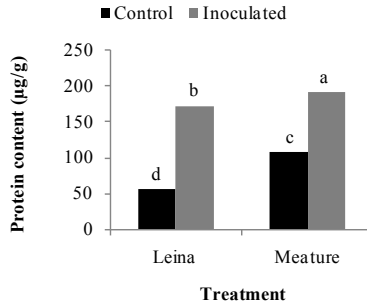


Figure 9. Effect of *Alternaria alternata* on leaf protein ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($p\leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 9. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la proteína de las hojas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p\leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

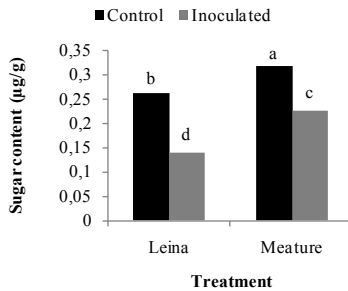


Figure 10. Effect of *Alternaria alternata* on leaf sugar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ($P\leq 0.05$) as determined by DMRT test.

Figura 10. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el azúcar de la hoja ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de las variedades de guisantes Liena y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ($p\leq 0,05$) según lo determinado por el test DMRT.

Conclusion

The current study can be concluded that *Alternaria alternata* is responsible for decline in germination, physiological and biochemical parameters in both Leina and Meature varieties.

End of English version

de prolina (mg g^{-1}) en comparación con la variedad "Meature". La prolina es un compuesto indicativo de estrés y el contenido de prolina libre aumentó en plantas estresadas, en comparación con las plantas sanas ya que la prolina participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, en la regulación de la acidez citosólica y en el ajuste osmótico (Arie *et al.*, 2007). La acumulación de prolina en plantas vasculares superiores es una respuesta significativa de estrés contra agentes de estrés biótico como los patógenos (Claussen, 2005).

Un aumento significativo en el contenido de proteína fue observado en la variedad de guisante Leina tratada con el hongo, en comparación a las plantas de control (figura 9). En la variedad 'Meature' el contenido de proteína también aumentó en plantas tratadas con el hongo en comparación a las de control. Varios estudios reportaron que las plantas producen una clase de proteínas, conocidas como proteínas relacionadas con la patogenia (PR) contra invasores microbianos (Wang *et al.*, 2010). Las proteínas PR son conocidas por estar expresadas en la respuesta a varios

estímulos externos, que incluyen una variedad de factores de estrés abiótico y biótico (El-Khallal, 2007).

Las variedades de 'Leina' y 'Meature' infectadas mostraron contenido de azúcar de la hoja significativamente menor en comparación con el control (figura 10). En la comparación varietal, se encontró un contenido de azúcar significativamente más bajo en las hojas de la variedad Leina tratada con hongos. Esta disminución en el contenido de azúcar bajo *A. alternata* podría deberse al efecto destructivo del organismo causal y sus micotoxinas sobre el contenido de azúcar (Alqarawi *et al.*, 2013).

Conclusión

Se puede concluir en el presente estudio que *Alternaria alternata* es responsable de disminuir la germinación, y los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ambas variedades de guisantes Leina y Meature.

Literature cited

- Abdul-Baki, A.A. and J.D. Anderson. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop. Sci.* 13(6):630-633.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition, Academic Press. New York. 978 0120445646N. 633 p.
- Alqarawi, A.A., A. Hashem and E.F. Abd-Allah. 2013. Physiological alterations in *Avicennia marina* (Forski) Vierh. associated with leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Pak. J. Bot.* 45(5):1767-1771.
- Aneja, J.K. and A. Agnihotri. 2013. *Alternaria* blight of oilseed brassicas:

- epidemiology and disease control strategies with special reference to use of biotechnological approaches for attaining host resistance. *Journal Oilseed Brassica* 4:1-10.
- Arie, T., H. Takahashi, M. Kodama and T. Teraoka. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant. Biotechnol.* 24(1):135-147.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.* 24(1):1-15.
- Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant. Soil.* 39(1):205-207.
- Capell, B. and K. Dörffling. 1993. Genotype specific differences in chilling tolerance of maize in relation to chilling induced changes in water status and abscisic acid accumulation. *Physiol. Plant.* 88(4):638-646.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant. Sci.* 168(1):241-248.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.T. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3):350-356.
- El-Khallal, S.M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* 1(4):717-732.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2018. Faostat. Retrieved of <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fondevilla, S., C. M. Avila, J. I. Cubero and D. Rubiales. 2005. Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding*, 124: 313-315
- Gachande, B.D. and V.A. Jadhav. 2010. Effect of culture filtrates on seed germination and seedling growth of gram (*Cicer arietinum* L.). *BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sci.* 7(2): 173-174.
- Hadi, H. W. 2019. Secondary metabolites importance in *Alternaria alternata* fungus. *Pak. J. Biotechnol.* 16(4):237-244.
- Hadizadeh, I., B. Peivastegan and M. Kolahi. 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pak. J. Biol. Sci.* 12(1):58-63.
- Hiscox, J.T. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12):1332-1334.
- Houssien, A.A., S.M. Ahmed and A.A. Ismail. 2010. Activation of tomato plant defense response against *Fusarium* wilt disease using *Trichoderma harzianum* and salicylic acid under greenhouse conditions. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6(3):328-338.
- Khan, A., I.A. Nasir, B. Tabassum, K. Aaliya, M. Tariq, A.Q. Rao. 2017. Expression studies of chitinase gene intransgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult.* 128:563-576.
- Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11:591-592.
- Lin, Q., H. Su and H. He. 2014. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Bruguiera gymnorhiza* in China. *Plant Dis.* 99:286.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- Maia, G.C.M., C.O. Goshi, J.F. Vieira, R.O. Pierre, J.B. Maia, P.M.R. Júnior and M.S. de Abreu. 2012. Pigments, total soluble phenols and lignin levels

- of coffee seedlings inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. Coffee. Sci. 7:152-159.
- Meena, P.D., A. Rani, R. Meena, P. Sharma, R. Gupta and P. Chowdappa. 2012. Aggressiveness, diversity and distribution of *Alternaria brassicae* isolates infecting oilseed Brassica in India. Afr. J. Microbiol. 6:5249-5258.
- Mostafavi, K., H.S. Geive, M. Dadresan and M. Zarabi. 2011. Effects of drought stress on germination indices of corn hybrids (*Zea mays* L.). Int. J. Agri. Sci. 1(1):10-18.
- Noelting, M.S., M. Sisterna, M. Lovisolo, A. Molla-Kralj, G. Lori, M.C. Sandoval, M. Sulyok and M.C. Molina. 2016. Discoloured seeds of amaranth plant infected by *Alternaria alternata*: physiological, histopathological alterations and fungal secondary metabolites associated or registered. J. Plant. Protect. Res. 56(3):244-249.
- Orcutt, D.M. and E.T. Nilsen. 2000. Influence of plant phytopathogens on host physiology. The physiology of plants under stress. Soil and biotic factors. Wiley, USA p. 236-239.
- Pangrikar, P.P., D.P. Gadgile, A.D. Hatti and A.M. Chavan. 2009. Seed physiology of different crops under the influence of bt and non-bt cotton rhizospheric fungi culture filtrate. J. Phytol. 1(6):404-407.
- Perelló, A., M. Gruhlke and A.J. Slusarenko. 2013. Effect of garlic extract on seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat. J. Plant. Prot. Res. 53(4):317-323.
- Rodino, S., M. Butu, P. Petrache, A. Butu and C.P. Cornea. 2014. Antifungal activity of four plants against *Alternaria alternata*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies 18:60-65.
- Scharte, J., H. Schön and E. Weis. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. Plant. Cell. Environ. 28(11):1421-1435.
- Sharma, M., G. Raju. and S. Pande. 2013. Occurrence of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* blight in pigeonpea in India. Adv. Biosci. Biotechnol. 4(6): 702-705.
- Shirurkar, D.D. and N.K. Wahegaonkar. 2012. Effect of aflatoxin on germination and seedling growth. Arch. Appl. Sci. Res. 4(6):2441-2446.
- Tapwal, A., S. Garg, N. Gautam and R. Kuma. 2011. *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. Braz. Arch. Biol. Technol. 54(6):1093-1098.
- Taj, G., P.D. Meena, P. Giri, D. Pandey, A. Kumar and A. Kumar. 2015. Pathogenesis mechanisms employed by *Alternaria* species. Journal Oilseed Brassica 6(2):213-240.
- Tsuge, T., Y. Harimoto, K. Akimitsu, K. Ohtani, M. Kodama, Y. Akagi, M. Egusa, M. Yamamoto and H. Otani. 2013. Host-Selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol. Rev. 37: 44-66.
- Wang, J., Y. Jiang, S. Chen, X. Xia, K. Shi, Y. Zhou and J. Yu. 2010. The different responses of glutathione-dependent detoxification pathway to fungicide chlorothalonil and carbendazim in tomato leaves. Chemosphere 79(9):958-965.
- Weatherley, P. 1950. Studies in the water relations of the cotton plant. New Phytol. 49(1):81-97.
- Yang, W.X., F. Liu, N. Zhang, X.D. Ren and D.Q. Liu. 2013. First report of *A. alternata* causing blight on *Zanthoxylum piperitum* in China. Plant. Dis. 97:840.
- Younas, A., K. Jabeen, S. Iqbal and S. Javed. 2016. Effect of *Macrophomina phaseolina* on germination, growth and physiology of *Capsicum frutescens* L. Pak. J. Phytopathol 28(02):207-211.