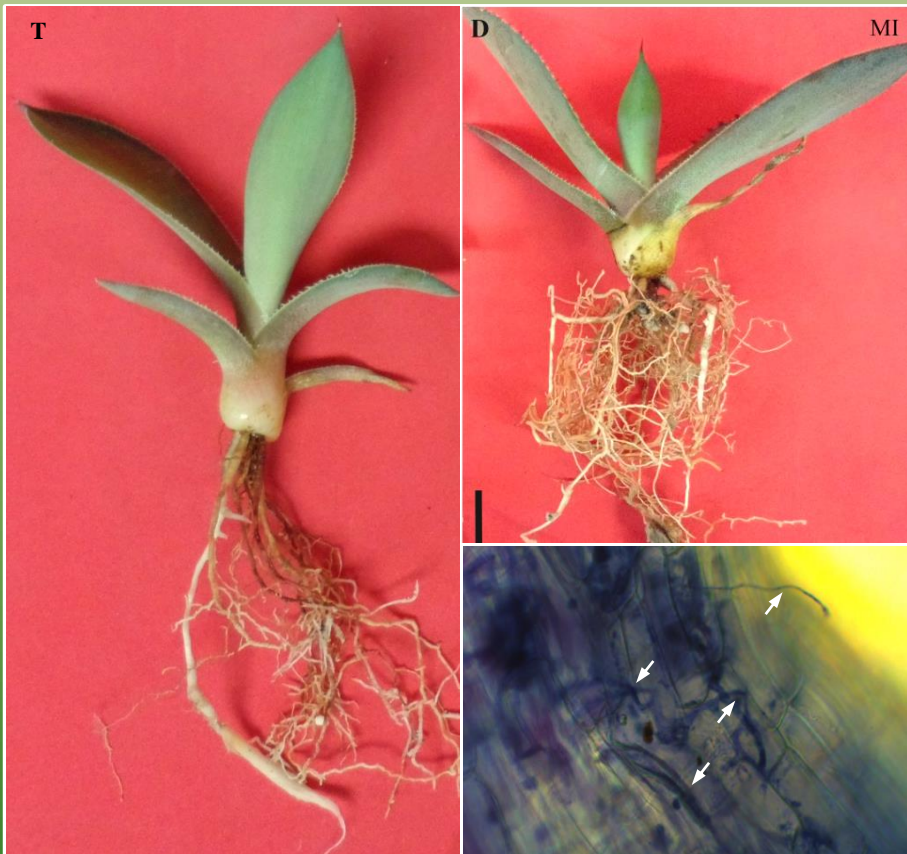


# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

VOLUMEN 35, NÚMERO 2, Mayo 2017



Órgano Internacional de Difusión de la  
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

**Editor en Jefe \* Editor in Chief**

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados.

**Editor Técnico \* Technical Editor**

Tec. Noemi De La Rosa Sánchez, RMF.

**Composición Web \* Web Composition**

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, Colegio de Postgraduados.

**Editoras(es) Adjuntos \* Senior Editors**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

**Comité Editorial Internacional \* International Editorial Advisory Board**

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA.

Dr. Sami Jorge Micheref, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Br.

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

**Editoras(es) Asociados \* Associate Editors**

Dr. Jesús Pérez Moreno, COLPOS.

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM.

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Dr. Andrés Quezada Salinas, DGSV.

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Instituto Tecnológico de Conkal.

Dra. M. Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS.

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN.

Dr. Gabriel Gallegos Morales, UAAAN.

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP.

---

**Portada:** *Agave cupreata*: Raíces del testigo (T) y de plantas tratadas con micorriza INIFAP® (D/MI).  
Las flechas indican colonización.

**Original:** Gabriel Rincón Enríquez/Pag. 151-169.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS \* SCIENTIFIC ARTICLES

- Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion\*** 151  
Micorrización de *Agave cupreata*: Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal.  
Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Hernández-Cuevas LV.
- In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves\*** 170  
Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.).  
Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O, Salgado-Siclán ML, Aquino-Martínez JG.
- Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to tiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides\*** 186  
Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin.  
Espinoza-Altamirano D, Silva-Rojas HV, Leyva-Mir SG, Marbán-Mendoza N, Rebollar-Alviter A.
- Chemical characterization, compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata*\*** 204  
Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*.  
Black-Solis J, Ventura-Aguilar RI, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S.
- Effects of climatological factors on fluctuation of spores in mango trees cv. Ataulfo, in Guerrero, México\*** 227  
Efecto de factores climatológicos sobre la fluctuación de esporas en árboles de mango cv. Ataulfo en Guerrero, México.  
Noriega-Cantú DH, Pereyda-Hernández J, Garrido-Ramírez ER.
- Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico\*** 242  
Hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* y trips en cultivos de cebolla de Morelos y Michoacán, México.  
Ávila-Alistac N, Ramírez-Rojas S, Lozoya-Saldaña H, Rebollar-Alviter A, Guzmán-Plazola RA.
- Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*)\*** 263  
Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*).  
Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V, Zavaleta-Mejía E.
- Characterization of *Citrus exocortis viroid* in different conditions of indexing\*** 284  
Caracterización del *Viroide exocortis de los cítricos* en diferentes condiciones de indexado.  
Alcántara-Mendoza S, Vergara-Pineda S, García-Rubio O, Cambrón-Sandoval VH, Colmenares-Aragón D, Nava-Díaz C.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS \* PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Distribution, life cycle and histological changes by *Heterodera* sp. in carrot in Puebla\*** Dis- 304  
tribución, ciclo de vida y alteraciones histológicas de *Heterodera* sp. en zanahoria, en Puebla.  
Escobar-Avila IM, Medina-Canales MG, Tovar-Soto A.
- Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with 314  
*Candidatus Liberibacter asiaticus*\*** Comparación de enzimas y compuesto fenólicos en tres  
especies de cítricos infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus*.  
Flores-Torres LM, Flores-Olivas A, Ochoa-Fuentes YM, López-Arroyo JI, Olalde-Portugal V,  
Benavides-Mendoza A, González-Morales S, Zamora-Villa VM.
- Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An in vitro approach towards its 326  
biological control\*** Etiología de la mancha necrótica del *Agave angustifolia*: Una aproxima-  
ción *in vitro* hacia su control biológico.  
Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Nemesio Villa-Ruano N.
- Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico\*** 338  
Características patogénicas de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en México.  
García-Rodríguez JC, Morishita M, Kato M, Yamanaka N.

# Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion

## Micorrización de *Agave cupreata*: Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal

Jesús Rafael Trinidad-Cruz, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Gabriel Rincón-Enríquez\*, Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México; Luis López-Pérez, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México; Laura Verónica Hernández-Cuevas, Laboratorio de Micorrizas, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Carretera San Martín Texmelucan-Tlaxcala S/N, San Felipe Ixtacuixtla, C.P. 90120, Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala, México. \*Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx.

Recibido: 18 de Julio, 2016.

Aceptado: 06 de Enero, 2017.

Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Hernández-Cuevas LV. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 151-169.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-5

Primera publicación DOI: 56 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** Se evaluó el efecto de la inoculación micorrícica de plantas de *Agave cupreata* en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y en la promoción del crecimiento vegetal. En invernadero, semillas de *A. cupreata* fueron inoculadas con cuatro consorcios de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) nativos, denominados El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD), Paso Ancho (PA) y Cerro del Metate (CM), un inóculo comercial micorriza INIFAP®

**Abstract.** The effect of mycorrhizal of *Agave cupreata* in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* and promoting plant growth was evaluated. In greenhouse, seeds of *A. cupreata* were inoculated with four consortia of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) native: The Huizachal (EH), Agua Dulce (AD), Paso Ancho (PA) and Cerro del Metate (CM), a commercial inoculum mycorrhizal INIFAP® (MI) and a control without AMF. Seven months after inoculating of the AMF, in a group of plants with and without mycorrhizal was evaluated the promoting plant growth and another similar group of plants were inoculated with or without *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) to evaluate the potential biocontrol effect of AMF. The results showed that mycorrhizal plants increased significantly (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) dry biomass total, in a range between 148 and 239 % more than the control without AMF. At 240 days after inoculation of Fox; the treatments PA+Fox and MI+Fox showed

(MI) y un testigo sin HMA. Siete meses después de inocular los HMA, en un grupo de plantas micorrizadas y sin micorrizar se evaluó la promoción del crecimiento vegetal y otro grupo similar de plantas fueron inoculadas con o sin *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) para evaluar el potencial efecto de biocontrol de los HMA. Los resultados mostraron que la micorrización incrementó significativamente (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) la biomasa seca total de las plantas, en un intervalo entre 148 y 239 % más con respecto al testigo sin HMA. A los 240 días después de la inoculación de Fox, los tratamientos PA+Fox y MI+Fox mostraron un efecto significativo (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) en la disminución de la severidad de la marchitez del agave con un promedio de daño de 33 % con respecto al testigo+Fox que presentó daños de 74 %. PA y MI pueden considerarse como potenciales biofertilizantes y agentes de biocontrol de *F. oxysporum* en el cultivo del agave.

**Palabras clave:** Hongos micorrícicos arbusculares, consorcios nativos de HMA, marchitez del agave, *Rhizophagus intraradices*, bioprotección contra fitopatógenos.

## INTRODUCCIÓN

*Agave cupreata* es una especie endémica de la Cuenca del Balsas, México. Su cultivo se ha intensificado debido a que a partir de la fermentación del jugo de las piñas de las plantas adultas se produce una bebida alcohólica artesanal conocida como mezcal (Martínez-Palacios *et al.*, 2011). En el estado de Michoacán, en alrededor de 29 municipios se produce mezcal a partir de esta especie de agave. Durante el año 2013, estos municipios obtuvieron la denominación de origen del mezcal (DOM), lo cual traerá beneficios dentro de los que se incluye su exportación (Gobierno de Michoacán,

a reducing significant (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) in the severity of agave wilt, averaging 33 % damage compared to the control+Fox, which presented damage of 74 %. PA and MI may be considered as potential biofertilizers and biocontrol agents of *F. oxysporum* in the cultivation of agave.

**Key words:** Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF native consortia, agave wilt, *Rhizophagus intraradices*, bioprotection against plant-pathogens.

## INTRODUCTION

*Agave cupreata* is an endemic species of the Balsas river basin, in Mexico. Its growth has become intensified since the juice obtained from the heart of adult plants is fermented to produce an alcoholic beverage known as mezcal (Martínez-Palacios *et al.*, 2011). In the state of Michoacán, in approximately 29 municipalities, mezcal is produced using this species of agave. During the year 2013, these municipalities obtained the *denominación de origen* of mezcal (DOM), which will bring benefits including its export (Michoacán government, 2012). Due to this, an increase is expected in the surface of *A. cupreata* planted, which will require an adequate agronomic and plant health management to maintain this crop's sustainability, as is the case for other agaves (*A. angustifolia* and *A. potatorum*) used in the production of mezcal in southeastern Mexico (Aguirre-Dugua and Eguiarte, 2013). The increase in the surface for the plantation of this crop could increase the incidence of diseases, as in the case of plantations of *A. tequilana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2010). The wilting caused by the fungus *Fusarium oxysporum* is one of the plant health problems that significantly affects the productivity of tequila agave; the infection process begins in the roots,

2012). Debido a esto, se espera un incremento en la superficie cultivada de *A. cupreata*, por lo que será necesario efectuar un manejo agronómico y fitosanitario adecuados para mantener la sustentabilidad de este cultivo, como se efectúa para otros agaves (*A. angustifolia* y *A. potatorum*) empleados en la producción de mezcal en el sureste de México (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013). El incremento en la superficie del cultivo potencialmente podría incrementar la incidencia de enfermedades como ha sucedido en plantaciones de *A. tequilana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2010). La marchitez causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* es uno de los problemas fitosanitarios que afecta significativamente la productividad del agave tequilero; el proceso de infección se inicia en las raíces, posteriormente se observa un enrollamiento y muerte en las puntas de las hojas, que culmina con la marchitez de toda la planta (Vega-Ramos *et al.*, 2013). Esta problemática fitosanitaria también se presenta en plantaciones de *A. cupreata* en el estado de Michoacán.

El control convencional de hongos fitopatógenos a través de la aplicación de fungicidas no ha sido efectivo, además de que estos productos originan problemas ambientales, deterioran el suelo, generan resistencia e incrementan los costos de producción (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005). En las últimas décadas, el biocontrol ha sido una de las estrategias para controlar diferentes enfermedades en plantas a través del uso de microorganismos benéficos los cuales suprimen la densidad de población o el impacto de patógenos, por lo que se reduce su abundancia o efecto dañino (Eilenberg, 2006). Dentro de los microorganismos con capacidad de biocontrol se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Los HMA forman simbiosis con alrededor de 80 % de las plantas terrestres. En esta asociación, las hifas simbióticas del hongo micorrícico transportan nutrientes del suelo hacia la

followed by the tips of leaves curling and dying, and finally, the entire plant wilts (Vega-Ramos *et al.*, 2013). This plant health problem also appears in *A. cupreata* plantations in the state of Michoacán.

The conventional control of disease-inducing fungi with fungicides has not been effective and these products also cause environmental problems, deteriorate the soil, create resistance, and increase production costs (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005). In the last few decades, biocontrol has been one of the strategies to control different plant diseases with the use of beneficial microorganisms that suppress the population density or the impact of pathogens, reducing their abundance or harmful effect (Eilenberg, 2006). Among the microorganisms with the capability of biocontrol are the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). AMFs form a symbiosis with around 80 % of terrestrial plants. In this association, the symbiotic hyphae of the mycorrhizal fungi transport nutrients from the soil to the plant which, in compensation, provides the fungus space and a source of carbon, which is exchanged through the arbuscles (Smith and Read, 2008). Several authors have reported that mycorrhized plants can cause, in most cases, a reduction in the incidence and/or severity of diseases caused by diverse plant pathogens of the soil, including *Fusarium oxysporum* (Akhtar and Siddiqui, 2008; Saldajeno *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008). Hage-Ahmed *et al.* (2013) found that the inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with a commercial AMF inoculant (Symbivit<sup>®</sup>) reduced the incidence of the disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by 35%. Hu *et al.* (2010) inoculated cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) with a native AMF consortium (*Glomus* spp. *sensu lato* and *Acaulospora* spp.) and found an effect on the suppression of wilting caused by *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in regard to plants inoculated only with the pathogen. Jaiti *et al.* (2007)

planta y ésta en compensación le brinda espacio y una fuente de carbono al hongo que es intercambiada a través de los arbusculos (Smith y Read, 2008). Diversos autores han reportado que las plantas micorrizadas pueden originar en la mayoría de los casos una reducción de la incidencia y/o severidad de las enfermedades causadas por diversos fitopatógenos del suelo incluyendo a *Fusarium oxysporum* (Akhtar y Siddiqui, 2008; Saldajeno *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008). Hage-Ahmed *et al.* (2013) encontraron que la inoculación de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con un inóculo comercial de HMA (Symbivit®) generó una disminución de 35 % en la incidencia de la enfermedad provocada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Hu *et al.* (2010) inocularon plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) con un consorcio nativo de HMA (*Glomus* spp. *sensu lato* y *Acaulospora* spp.) y encontraron un efecto en la supresión de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* con respecto a las plantas inoculadas sólo con el patógeno. Jaiti *et al.* (2007) mostraron que plantas de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) inoculadas con un consorcio nativo de HMA presentaron una disminución de la mortalidad de 56 % con respecto a plantas no micorrizadas cuatro meses después de la inoculación con *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. A pesar de lo anterior, aun no hay reportes del biocontrol de *F. oxysporum* en *A. cupreata* por los HMA. Por otra parte, se ha reportado el uso de HMA en la promoción del crecimiento de algunas especies de agave. Cui y Nobel (1992) encontraron diferencias significativas en el contenido de P en raíz y la parte aérea en plantas de *Agave deserti* inoculadas con un consorcio nativo de HMA integrado por especies del género *Glomus sensu lato*, en contraste con las plantas no micorrizadas. Robles-Martínez *et al.* (2013) observaron incrementos en el peso seco de la parte aérea y en el contenido de P en plantas de *A. angustifolia* inoculadas con diferentes

showed that date palms (*Phoenix dactylifera* L.) inoculated with a native AMF consortium presented a reduction in mortality by 56 % in regard to plants not mycorrhized four months after inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. Despite this, there are still no reports on the biocontrol of *F. oxysporum* in *A. cupreata* by AMFs.

On the other hand, there have been reports on the use of AMFs in the enhancement of growth of some agave species. Cui and Nobel (1992) found significant differences in the content of P in the root and aerial section of *Agave deserti* plants inoculated with a native AMF consortium composed of species of the genus *Glomus sensu lato*, in contrast with non-mycorrhized plants. Robles-Martínez *et al.* (2013) observed increases in the dry weight of the aerial section and the content of P in *A. angustifolia* plants inoculated with different native AMF consortia or with *Rhizophagus intraradices* (synonymous with *Glomus intraradices*) in regard to non-inoculated plants. This highlights, on the one hand, the beneficial effect of AMFs in plant growth, and on the other, its biocontrol capability on *F. oxysporum*. The aim of this investigation was to evaluate the effect of mycorrhizal inoculation of *Agave cupreata* plants on the biocontrol of *Fusarium oxysporum* and in the enhancement of plant growth.

## MATERIALS AND METHODS

### Mycorrhizal inoculant

We used spores from four AMF consortia, native of the state of Michoacán, contained in sand, and a commercial inoculant [mycorrhiza INIFAP® (MI)]. The spores of four native consortia were multiplied on trap plants of hybrid sorghum (Sweet Chow, Western Seed Co.), belonging to the



consorcios nativos de HMA o con *Rhizophagus intraradices* (sinónimo *Glomus intraradices*) con respecto a plantas no inoculadas. Lo anterior destaca por un lado el efecto benéfico de los HMA en el crecimiento vegetal y por otro su capacidad de biocontrol sobre *F. oxysporum*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación micorrícica de plantas de *Agave cupreata* en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y en la promoción del crecimiento vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Inóculo micorrícico

Se utilizaron esporas de cuatro consorcios de HMA, nativos del estado de Michoacán contenidas en arena y un inóculo comercial [micorriza INIFAP® (MI)]. Las esporas de los cuatro consorcios nativos fueron obtenidas de cultivos trampa en propagación con sorgo híbrido (Sweet Chow, Western Seed Co.), pertenecientes a la colección de consorcios nativos de HMA del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Los consorcios nativos empleados fueron denominados El Huizachal (EH) (*Acaulospora morrowiae*, *A. spinosa*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporum* y *F. mosseae*), Cerro del Metate (CM) (*A. mellea*, *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* y *F. geosporum*), Paso Ancho (PA) (*A. spinosa*, *C. claroideum*, *C. etunicatum* y *Glomus* sp. 1) y Agua Dulce (AD) (*A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum*, *F. mosseae* y *Rhizophagus clarus*) (Reyes-Tena *et al.*, 2016). El inóculo comercial MI, contuvo esporas de *R. intraradices*. Para inocular la cantidad de esporas requeridas en el experimento, se realizó el conteo de esporas de los consorcios nativos y del inóculo comercial

collection of native AMF consortia from the Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (Center for Research and Assistance in Technology and Design of the State of Jalisco, or CIATEJ). The native consortia used were named El Huizachal (EH) (*Acaulospora morrowiae*, *A. spinosa*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporum*, and *F. mosseae*), Cerro del Metate (CM) (*A. mellea*, *A. scrobiculata*, *C. etunicatum*, and *F. geosporum*), Paso Ancho (PA) (*A. spinosa*, *C. claroideum*, *C. etunicatum*, and *Glomus* sp. 1), and Agua Dulce (AD) (*A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum*, *F. mosseae*, and *Rhizophagus clarus*) (Reyes-Tena *et al.*, 2016). The commercial inoculant MI, withheld *R. intraradices* spores. To inoculate the amount of spores required in the experiment, the spores from the native consortia and the commercial inoculant were counted, taking 10 g of dry soil to extract the spores using the dry sieving technique, decantation (Gerdemann and Nicolson, 1963), and centrifuging with saccharose at 50 % (Brundrett *et al.*, 1996) three times. The spores were counted in a stereomicroscope (VE-S6, VELAB<sup>MR</sup>). From each inoculant, 4-10 g were taken to inoculate with 100 AMF spores per agave seed, and for the control without AMF, 10 g of dry sand were inoculated for each seed.

### *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) inoculant

The isolate *F. oxysporum* FPC was obtained from the collection of pathogenic fungi of CIATEJ Plant Biotechnology. This isolate was taken from *A. tequilana* plants with symptoms of wilting (Qui-Zapata *et al.*, 2011) and previously (Trinidad-Cruz *et al.*, 2013) its pathogenic activity was tested against *A. cupreata*. From a FoxFPC conservation plantation, a mycelium transfer was carried out to reactivate the isolate in Petri dishes (90 mm in

tomando 10 g de suelo seco para extraer las esporas mediante la técnica de tamizado húmedo, decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) y centrifugación con sacarosa al 50 % (Brundrett *et al.*, 1996) por triplicado. Las esporas fueron contadas en un estéreo microscopio (VE-S6, VELAB<sup>MR</sup>). De cada inóculo se tomaron entre 4-10 g para inocular con 100 esporas de HMA por semilla de agave y para el testigo sin HMA se inocularon 10 g de arena esterilizada por semilla.

### Inóculo de *Fusarium oxysporum* FPC (Fox)

La cepa FPC de *F. oxysporum* fue obtenida de la colección de hongos fitopatógenos de Biotecnología Vegetal del CIATEJ. Esta cepa fue aislada de plantas de *A. tequilana* con síntomas de marchitez (Qui-Zapata *et al.*, 2011) y previamente (Trinidad-Cruz *et al.*, 2013) se comprobó su actividad fitopatógena en contra de *A. cupreata*. A partir de un cultivo de conservación de FoxFPC, se realizó una transferencia de micelio para reactivar la cepa en placas Petri (90 mm de diámetro) con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA DIFCO) estéril (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min); las placas fueron incubadas a 27±1 °C durante 11 días en oscuridad, seguidos de cuatro días con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Después de 15 días de crecimiento, se recolectaron las esporas de FoxFPC, para ello se agregaron 15 mL de agua destilada estéril (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min) en cada placa Petri. Con ayuda de un pincel estéril se realizó un barrido suave sobre la superficie del medio de cultivo y se recuperó el agua destilada con las esporas con ayuda de una micropipeta y puntas esterilizadas. La concentración de esporas se ajustó a 1×10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup> con ayuda de un hematocitómetro. La suspensión de esporas se almacenó en tubos de 50 mL de capacidad a 4 °C hasta su uso.

diameter) with a sterile potato-dextrose-agar (PDA DIFCO) medium (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min); the Petri dishes were incubated at 27±1 °C for 11 days, followed by 4 days with a photoperiod of 16/8 h (light/darkness). After 15 days of growth, the FoxFPC spores were gathered; this was carried out by adding 15 mL of sterile distilled water (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min) in each Petri dish. Using a sterile brush, the surface of the culture medium was softly swept, and the distilled water with the spores was recovered using a micropipette and sterilized tips. The concentration of spores was adjusted to 1×10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> using a hemocytometer. The spore suspension was stored in 50 mL tubes at 4 °C until use.

### Preparation of the *F. oxysporum* FPC substrate

Before inoculating the substrate with Fox, oat flakes were used to increase the amount of Fox propagules in plastic, 1 L containers with 60 g of oat flakes, hydrated with 50 mL of distilled water, sterilized earlier (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min). The oat flakes were inoculated with 10 mL of the spore suspension at a concentration of 1×10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> and incubated in the dark for 15 days at room temperature. After this time, the number of colony forming units (CFU) per gram of oat was determined. One gram of oat was placed under serial decimal dilutions and the dilutions were planted 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-6</sup> in a Petri dish with a PDA culture medium with Bengal Rose (25 mg L<sup>-1</sup>) threefold; the dishes were incubated at 27±1 °C for 2 days in the dark before they were counted. After determining the number of CFU, the oat flakes with the Fox propagules were vigorously mixed with a sterile substrate mixture (sand-peat of sphagnum -agrolite, 4:1:1, v:v:v) adjusting a final concentration of 1×10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> of dry substrate.

### Preparación del sustrato de *F. oxysporum* FPC

Previamente a la inoculación del sustrato con Fox, se utilizaron hojuelas de avena para incrementar la cantidad de propágulos de Fox en recipientes de plástico de 1 L de capacidad con 60 g de hojuelas de avena hidratadas con 50 mL de agua destilada, previamente esterilizados (121 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 20 min). Las hojuelas de avena fueron inoculadas con 10 mL de la suspensión de esporas a una concentración de 1×10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup> y se incubaron en oscuridad durante 15 días a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de avena. Un gramo de avena se sometió a diluciones decimales seriadas y se sembraron las diluciones 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-6</sup> en placa Petri con medio de cultivo PDA con rosa de bengala (25 mg L<sup>-1</sup>) por triplicado; las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C durante dos días en oscuridad antes de realizar el conteo. Una vez determinado el número de UFC, las hojuelas de avena con los propágulos de Fox fueron mezclados vigorosamente con una mezcla de sustrato estéril (arena-turba de esfagno-agrolita, 4:1:1, v:v:v) ajustando a una concentración final de 1×10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de sustrato seco.

### Material vegetal

Las plántulas de *A. cupreata* fueron obtenidas a partir de semillas desinfectadas con una solución de cloro comercial a 3 % (cloro activo al 6 %) durante 10 min y después fueron enjuagadas con agua destilada, tres veces, durante 5 min cada vez. Las semillas se sembraron en charolas de plástico de 38 cavidades y se colocaron dentro de un contenedor de agua de aproximadamente 4 L. Se sembró una semilla por cada cavidad, la cual contenía como sustrato 30 g de una mezcla de arena-agrolita (4:1, v:v) esterilizada (120 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h).

### Plant material

The *A. cupreata* plantlets were obtained from seeds disinfected with a commercial 3 % chlorine solution (active chlorine at 6 %) for 10 min and then rinsed using distilled water, three times, for 5 min each time. The seeds were planted in plastic trays with 38 holes and placed inside a container with approximately 4 L of water. One seed was planted in each hole, which contained, as a substrate, 30 g of a mixture of sand-agrolite (4:1, v:v), sterilized (120 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h).

### Inoculation of AMF in *Agave cupreata* plants

To evaluate the promotion of the AMF growth, each agave seed was inoculated with 100 AMF spores directly into the planting orifice of each of the four native consortia (CM, PA, EH, and AD), the commercial inoculant MI or 10 g of sterile sand for the control without AMF. The trays with the inoculated seeds remained under greenhouse conditions and were watered with distilled water twice a week; starting three months after planting, they were fertilized with a nutritious solution (Jarstfer and Sylvia, 1992) low in phosphorous (3 µM) with a pH of 6.1±0.1 every two weeks. We added 1.5 L of the nutritious solution into each container; if plants needed water between fertilizations, then were added distilled water. Six months after planting, the nutrient solution was suspended, and irrigated with distilled water until the ending of the experiment.

To evaluate the effect of the Fox biocontrol, mycorrhized seven month old *A. cupreata* plants contained in trays were transplanted with their rootballs into expanded 250 mL polystyrene cups, which were added between 65 and 75 g of the mixture of substrate sand-peat of sphagnum-agrolite (4:1:1, v:v:v) sterilized (120 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h);

## Inoculación de HMA en plantas de *Agave cupreata*

Para evaluar la promoción del crecimiento de los HMA, cada semilla de agave fue inoculada con 100 esporas de HMA directamente al orificio de siembra de cada uno de los cuatro consorcios nativos (CM, PA, EH y AD), el inóculo comercial MI o 10 g de arena estéril para el testigo sin HMA. Las charolas con las semillas inoculadas permanecieron en condiciones de invernadero y fueron regadas con agua destilada dos veces por semana; a partir de los tres meses después de la siembra, fueron fertilizadas con solución nutritiva (Jarstfer y Sylvia, 1992) baja en fósforo (3  $\mu$ M) con un pH de  $6.1 \pm 0.1$  cada dos semanas. Se adicionó 1.5 L de la solución nutritiva en cada contenedor; si las plantas necesitaban agua entre cada fertilización, se les agregó agua destilada. Seis meses después de la siembra se suspendió la aplicación de solución nutritiva y se regó con agua destilada hasta concluir el experimento.

Para evaluar el efecto de biocontrol de Fox, plantas de *A. cupreata* micorrizadas de siete meses de edad contenidas en charolas fueron trasplantadas con su cepellón a vasos de poliestireno expandido (unicel) de 250 mL, a los que se les agregaron entre 65 a 75 g de la mezcla de sustrato arena-turba de esfagno-agrolita (4:1:1, v:v:v) esterilizada (120 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h); según el tratamiento correspondiente se agregó el sustrato con Fox a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> o sustrato sin Fox. Las plantas fueron separadas para evitar la contaminación; para ello, las plantas previamente trasplantadas e inoculadas con Fox fueron ubicadas dentro de siete charolas de plástico (18 vasos de unicel por charola) y colocadas en una incubadora refrigerada (Thermo Scientific™, Modelo Precision 3759) a 28 °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). El otro grupo de plantas sin inocula-

dependiendo on the corresponding treatment, we added the Fox substrate at a concentration of  $1 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> or substrate without Fox. The plants were separated to avoid contamination; for this, those previously transplanted and inoculated with Fox were placed in seven plastic trays (18 styrofoam cups per tray) and into a refrigerated incubator (Thermo Scientific™, Model Precision 3759) at 28 °C and a photoperiod of 16/8 h (light/dark). The other group of plants without Fox inoculation were placed in five plastic trays (23 styrofoam cups per tray) in an incubation room for plant growth at  $27 \pm 1$  °C and a photoperiod of 16/8 h (light/dark). All plants were irrigated with distilled water twice a week.

## Experimental design and response variables

To evaluate the promotion of the growth of *A. cupreata* plants, a completely random design was established, in which six treatments were evaluated, one for each AMF (EH, CM, PA, AD, and MI) and a control without AMF. Five and three repetitions were used with AMF and control, respectively. Each plant represented one experimental unit. Seven months after inoculation with AMF, the number of leaves, the dry weight of the foliage and of the roots, and the total dry biomass (dried foliage samples and roots at 60 °C until weight was constant), were evaluated. Finally, in order to observe the colonization of the agave roots with the AMFs, roots were lightened and stained using the technique proposed by Phillips and Hayman (1970); later, photographs were taken of the typical structures of the mycorrhiza, using a digital camera (Leica DFC450C, Leica Application Suite LAS ver. 4.1.0 software) adapted to an optic microscope.

To evaluate the effect of the Fox biocontrol, we used a completely random design with a factorial arrangement in which 12 treatments were evaluated,

ción de Fox fueron colocadas en cinco charolas de plástico (23 vasos de unicel por charola) en un cuarto de incubación para crecimiento de plantas a  $27\pm 1$  °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Todas las plantas fueron regadas con agua destilada dos veces por semana.

### Diseño experimental y variables de respuesta

Para evaluar la promoción del crecimiento de las plantas de *A. cupreata*, se estableció un diseño completamente al azar en donde se evaluaron seis tratamientos, uno para cada HMA (EH, CM, PA, AD y MI) y un testigo sin HMA. Se utilizaron cinco y tres repeticiones para los tratamientos con HMA y testigo, respectivamente. Cada planta representó una unidad experimental. A los siete meses después de la inoculación con HMA, se evaluó el número de hojas, el peso fresco del follaje y de las raíces, así como la biomasa seca total (secado de las muestras de follaje y de raíces en estufa a 60 °C hasta peso constante). Finalmente, con el objetivo de observar la colonización de las raíces de agave por los HMA se realizó el clareo y tinción de raíces mediante la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970); posteriormente se tomaron registros fotográficos de las estructuras típicas de la micorriza con una cámara digital (Leica DFC450C, Leica Application Suite LAS ver. 4.1.0 software) acoplada al microscopio óptico.

Para evaluar el efecto de biocontrol de Fox, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial en donde se evaluaron 12 tratamientos, resultantes de la combinación de los factores: 1) inoculación con HMA (seis niveles: CM, PA, EH, AD, MI y testigo sin hongo micorrízico); 2) inoculación con Fox (dos niveles: con y sin patógeno). Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento; se consideró como unidad experimental a una planta de *A. cupreata* contenida en una maceta. Se evaluó el grado

resulting from the combination of the factors: 1) inoculation with AMF (six levels: CM, PA, EH, AD, MI, and a control without the mycorrhizal fungus); 2) inoculation with Fox (two levels: with and without the pathogen). Ten repetitions were used per treatment; one *A. cupreata* plant held in a pot was considered an experimental unit. The degree of the disease severity (DS) was evaluated according to the scale proposed by De Cal *et al.* (2000): 1 (DS del 0 %)= healthy plant; 1.1 to 1.9 (DS de 1 a 24 %)= the first yellow leaf; 2 to 2.9 (DS de 25 a 49 %)= more than one yellow lower leaf and first dead leaf; 3 to 3.9 (DS de 50 a 74 %)= lower leaves dead and some upper leaves dead; 4 to 4.9 (DS of 75 to 99 %)= lower leaves dead and upper leaves wilted; and 5 (DS of 100 %)= dead plant. The degree of DS was determined 240 days after inoculation with the pathogen, fifteen months after the initial experiment was established.

### Statistical analysis

The plant growth variables were analyzed with an analysis of variance and Tukey's range test ( $p\leq 0.05$ ). The DS data were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis statistical test ( $p\leq 0.05$ ) and trust intervals of the median ( $p\leq 0.05$ ). Analyses were carried out using the statistical package StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

## RESULTS

Statistical differences were found (Tukey,  $p\leq 0.05$ ) between the native consortia and the control without AMF for all the growth enhancement variables evaluated seven months after inoculation (Table 1). The native consortia named El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD) and the commercial inoculant (MI) increased *A. cupreata* plant growth

de severidad de la enfermedad (SE) de acuerdo con la escala propuesta por De Cal *et al.* (2000): 1 (SE del 0 %) = planta sana; 1.1 a 1.9 (SE de 1 a 24 %) = la primera hoja amarilla; 2 a 2.9 (SE de 25 a 49 %) = más de una hoja inferior amarilla y primera hoja muerta; 3 a 3.9 (SE de 50 a 74 %) = hojas inferiores muertas y algunas hojas superiores amarillas; 4 a 4.9 (SE de 75 a 99 %) = hojas inferiores muertas y hojas superiores marchitas; y 5 (SE del 100 %) = planta muerta. El grado de SE fue determinado a los 240 días después de la inoculación con el patógeno, quince meses después de establecido el experimento inicial.

### Análisis estadístico

Las variables de crecimiento vegetal fueron analizadas mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los datos de SE fueron analizados con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ) e intervalos de confianza de la mediana ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

## RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) entre los consorcios nativos y el testigo sin HMA para todas las variables de promoción de crecimiento evaluadas siete meses después de la inoculación (Cuadro 1). Los consorcios nativos denominados El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD) y el inóculo comercial (MI) incrementaron el crecimiento de las plantas de *A. cupreata* (Figura 1A). En estos consorcios nativos existió un incremento de dos a tres hojas; de peso fresco de follaje del 186, 168 y 154 %; de peso fresco de raíces del

(Figura 1A). In these native consortia, there was an increase of two to three leaves; in dry weight, of 186, 168, and 154 %; in the fresh weight of leaves, of 273, 196, and 282 % (Figure 1B) respectively, all in comparison to the control without AMF. For the total dry biomass variable, all native consortia and MI increased their biomasses between 148 and 239 % in comparison with the control without AMF (Table 1) (Figure 1C).

On the other hand, symptoms of wilting were observed starting on day 20 after inoculation with Fox (ddif); in this time, the average disease severity (DS) in the treatments FoxFPC was between 1.08 and 1.32 (first yellow lower leaf, damage in plant between 2.8 and 8 %). Typical symptoms such as chlorosis (Figure 2A), and curling and death of the tips of leaves (Figure 2B and 2C) and wilting of the entire plant (Figure 2D) were observed throughout the experiment. The DS in the treatments PA+Fox and MI+Fox (240 ddif) was lower than in the treatment control+Fox (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) (Figure 3). Treatments PA+Fox and MI+Fox presented an average of 41 % less damage in agave plants (DS of 2.3, more than one yellow lower leaf and first dead leaf) with regard to the treatment control+Fox, which displayed an average of 74 % damage in plants (DS of 3.9, lower leaves dead and some yellow upper leaves). The treatments with consortia EH, CM, and AD did not seem to have an effect on the biocontrol of *F. oxysporum* FPC (Figure 3).

## DISCUSSION

Inoculation with the native AMF consortia and the inoculant MI promoted the growth of *A. cupreata* plants significantly, although the response to the inoculation with AMF in other agave species has been variable. For *A. tequilana*, Ruiz

**Cuadro 1. Efecto de distintos consorcios nativos y un inoculante comercial de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento vegetal de plantas de *Agave cupreata* siete meses después de la inoculación en condiciones de invernadero.****Table 1. Effect of different native consortia and a commercial Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) inoculant on the plant growth of *Agave cupreata* seven months after inoculation under greenhouse conditions.**

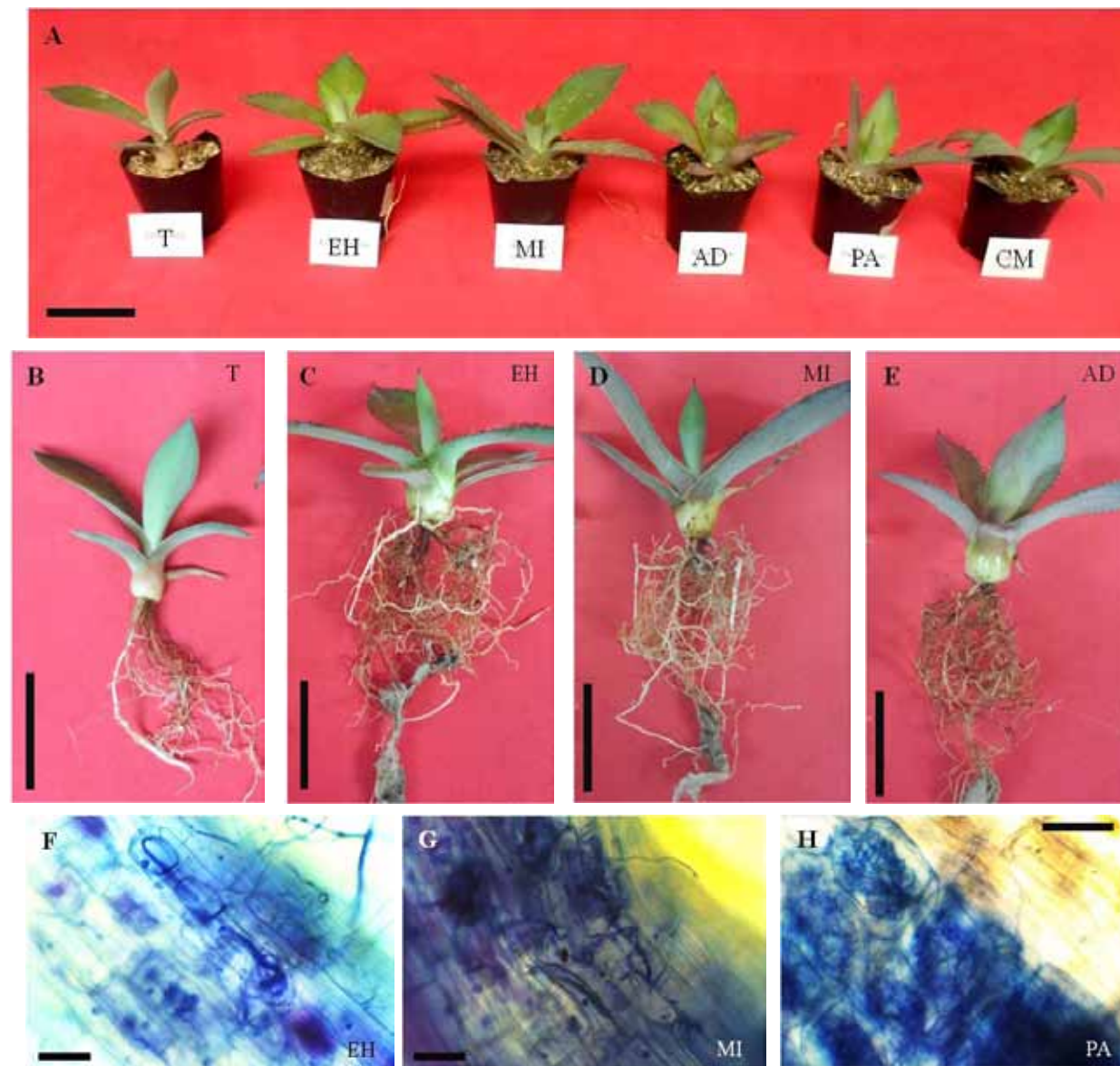
Inóculo micorrízico	Número de hojas	Peso fresco (g)		Biomasa seca total (g)
		Follaje	Raíz	
Cerro del Metate	5.8ab	12.4 ± 2.7bc	2.0 ± 0.6a	1.9 ± 0.5a
Paso Ancho	5.8ab	10.7 ± 1.0cd	1.5 ± 0.3ab	1.8 ± 0.2a
El Huizachal	6.6a	19.3 ± 0.9a	2.0 ± 0.2a	2.4 ± 0.2a
Agua Dulce	7.0a	18.1 ± 3.8a	1.7 ± 0.6a	2.4 ± 0.5a
Micorriza INIFAP®	6.2a	17.1 ± 2.1ab	2.1 ± 0.4a	2.4 ± 0.4a
Testigo sin HMA	4.3b	6.7 ± 2.6d	0.6 ± 0.3b	0.7 ± 0.3b

Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $\pm$  desviación estándar. Tratamientos con HMA,  $n=5$ ; testigo sin HMA,  $n=3$  / Values with the same letter in each column are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ );  $\pm$  standard deviation. Treatments with AMF,  $n=5$ ; control without AMF,  $n=3$ .

273, 196 y 282 % (Figura 1B); respectivamente, en comparación con el testigo sin HMA. Para la variable biomasa seca total todos los consorcios nativos y MI incrementaron la biomasa entre 148 a 239 % con respecto al testigo sin HMA (Cuadro 1) (Figura 1C).

Por otra parte, los síntomas de la marchitez fueron observados desde los 20 días después de la inoculación con Fox (ddif), a este tiempo la severidad de la enfermedad (SE) en los tratamientos con FoxFPC fue en promedio entre 1.08 a 1.32 (primera hoja inferior amarilla, daño en planta entre 2.8 a 8 %). Los síntomas típicos como clorosis (Figura 2A), enrollamiento y muerte en las puntas de las hojas (Figura 2B y 2C) y marchitez de toda la planta (Figura 2D) fueron observados durante el transcurso del experimento. La SE en los tratamientos PA+Fox y MI+Fox (240 ddif) fue menor que en el tratamiento testigo+Fox (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) (Figura 3). Los tratamientos PA+Fox y MI+Fox presentaron en promedio 41 % menos daño en las plantas de agave (SE de 2.3, más de una hoja inferior amarilla y la primera hoja muerta) con respecto al tratamiento Testigo+Fox que presentó en

*et al.* (2011) found that plants *in vitro* inoculated with *R. intraradices* did not display significant differences in the variables evaluated, such as the number of leaves, plant height, fresh weight, and dry weight in regard to the non-inoculated control, 263 days after inoculation. Pimienta-Barrios *et al.* (2009) did not find significant differences either in the growth of *A. tequilana* plants inoculated with *R. intraradices* or *R. fasciculatus* in regard to plants not inoculated with AMF. In contrast, Robles-Martínez *et al.* (2013) found significant differences in regard to plants without AMF for the dry weight of foliage in *A. angustifolia* plants inoculated with *R. intraradices* or with at least one native consortium, 98 days after inoculation. This variability in the response of the growth of agave plants associated with AMF can be explained by several factors, such as the AMF species (native consortia or monospecies plantations), the functional complementarity or synergism of the AMFs, and to the response of each host (high or low dependence to AMFs) (Gustafson and Casper, 2006; Jansa *et al.*, 2008; Camprubi *et al.*, 2011). The capability and efficiency of the AMFs to absorb P



**Figura 1.** Efecto de los consorcios nativos y un inóculo comercial de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento de plantas de *Agave cupreata* a los siete meses después de la inoculación. A) Vista del crecimiento de los agaves micorrizados y testigo sin inoculación de HMA; B, C, D y E) Vista del crecimiento de las raíces; F, G y H) Observaciones de la tinción de raíces de *Agave cupreata* con azul de tripano, se muestra la colonización intraradical de los HMA; Barra de A-E= 5 cm; Barra de F-H= 50  $\mu$ m; T: Testigo; EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate.

**Figure 1.** Effect of native consortia and a commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculant on the enhancement of plant growth of *Agave cupreata* seven months after inoculation. A) View of the growth of mycorrhized agaves and control without AMF inoculation; B, C, D, and E) View of root growth; F, G y H) Observations of the trypan blue staining of *Agave cupreata* roots, intraradical coloring of the AMF is shown; Bar A-E= 5 cm; Bar F-H= 50  $\mu$ m; T: Control; EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate.



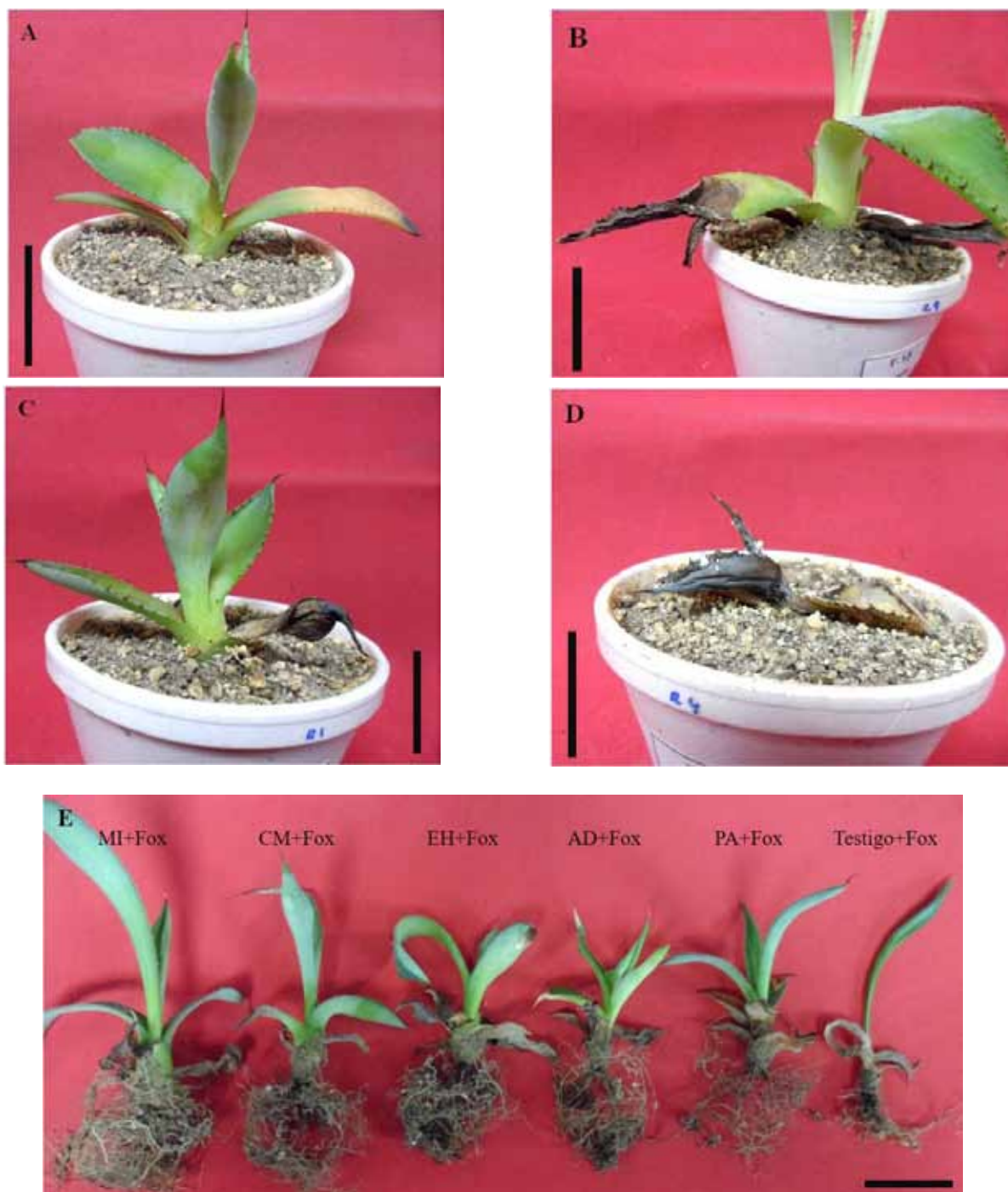


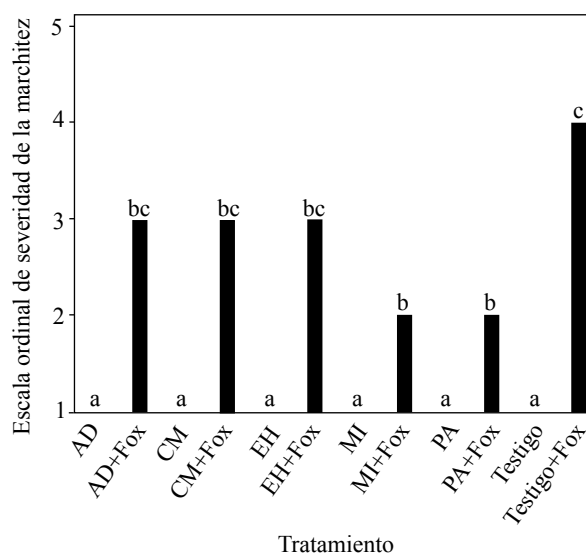
Figura 2. Presencia de síntomas asociados a la marchitez provocado por *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) en plantas de *Agave cupreata*. A) Hoja con clorosis; B y C) Hojas con enrollamiento y necrosis; D) Planta con marchitez severa; E) Vista del marchitamiento de las raíces a los 240 días después de la inoculación de Fox; Barra= 5 cm.

Figure 2. Presence of symptoms related to wilting caused by *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) in *Agave cupreata* plants. A) Leaf with chlorosis; B and C) Leaves curled and with necrosis; D) Plant with severe wilting; E) View of root wilting 240 days after inoculation with Fox; Bar= 5 cm.

promedio 74 % de daño en las plantas (SE de 3.9, hojas inferiores muertas y algunas hojas superiores amarillas). Los tratamientos con los consorcios EH, CM y AD no mostraron tener un efecto en el biocontrol de *F. oxysporum* FPC (Figura 3).

## DISCUSIÓN

La inoculación con los consorcios de HMA nativos y el inóculo MI promovieron significativamente el crecimiento de las plantas de *A. cupreata*, sin embargo, la respuesta a la inoculación con HMA en otras especies de agave ha sido variable. Para *A. tequilana*, Ruiz *et al.* (2011) encontraron que plantas *in vitro* inoculadas con *R. intraradices* no mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas como el número de hojas, altura de planta, peso fresco y seco con respecto al control no inoculado, 263 días después de la inoculación. Pimentía-Barrios *et al.* (2009) tampoco encontraron diferencias significativas en el crecimiento de plantas de *A. tequilana* inoculadas con *R. intraradices* o *R. fasciculatus* con respecto a las plantas no inoculadas con HMA. En contraste, Robles-Martínez *et al.* (2013) encontraron diferencias significativas con respecto a las plantas sin HMA para el peso seco del follaje de plantas de *A. angustifolia* inoculadas con *R. intraradices* o con al menos un consorcio nativo, a los 98 días después de la inoculación. Esta variabilidad en la respuesta de crecimiento de las plantas de agave asociadas con HMA puede deberse a varios factores como las especies de HMA (consorcios nativos o cultivos monoespecie), la complementariedad funcional o sinergismo de los HMA y a la respuesta de cada hospedero (alta o baja dependencia a los HMA) (Gustafson y Casper, 2006; Jansa *et al.*, 2008; Camprubi *et al.*, 2011). La capacidad y la eficiencia de los HMA para absorber P varían entre diferentes especies (variación



**Figura 3.** Severidad de la marchitez en plantas de *Agave cupreata* inoculadas con *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) a los 240 días después de la inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) e intervalos de confianza (95 %) de la mediana. Hongos micorrizicos arbusculares (HMA): EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate; Testigo: sin HMA.

**Figure 3.** Severity of wilting in *Agave cupreata* plants inoculated with *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) 240 days after inoculation. Different letters indicate significant differences (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ ) and confidence intervals (95 %) of the median. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF): EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate; Control: without AMF.

varies between species (interspecific variation) and between isolates of the same species (intraspecific variation), even with the same host plant species (Pearson and Jakobsen, 1993; Munkvold *et al.*, 2004; Abdel-Fattah and Asrar, 2012). Consortia EH and AD that displayed a positive significant effect on the growth of *A. cupreata* contained the same five species of AMF (*A. morrowiae*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum* and *F. mosseae*), plus two species (*A. scrobiculata* and *R. clarus*)

interespecífica) y entre cepas de la misma especie (variación intraespecífica) aún con la misma especie vegetal hospedera (Pearson y Jakobsen, 1993; Munkvold *et al.*, 2004; Abdel-Fattah y Asrar, 2012). Los consorcios EH y AD que mostraron un efecto positivo significativo en el crecimiento de *A. cupreata* contuvieron las mismas cinco especies de HMA (*A. morrowiae*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum* y *F. mosseae*), más dos especies (*A. scrobiculata* y *R. clarus*) sólo presentes en el consorcio AD. De estas especies, *F. mosseae* (George *et al.*, 1992; Ozgonen y Erkilic, 2007) y *A. scrobiculata* (Shukla *et al.*, 2012) se han reportado como eficientes para la adquisición de P; mientras que *F. geosporum* se ha encontrado que produce respuestas diferenciales en el hospedero de acuerdo con el origen del aislado (Oliveira *et al.*, 2010).

Por otra parte, se demuestra parcialmente lo encontrado por otros autores, es decir, que la micorrización influye en la disminución de la severidad de la enfermedad (Akhtar *et al.*, 2011), aunque de manera diferencial. Sólo uno de los consorcios nativos (PA) y el inóculo comercial (MI) mostraron un efecto en la disminución de la severidad de la marchitez causada por la cepa FPC de *F. oxysporum*. El consorcio PA contuvo cuatro especies de HMA (*A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. claroideum* y *C. etunicatum*). De estas especies, se sabe que *C. claroideum* en combinación con otras especies de HMA (*F. geosporum*, *F. mosseae* y *R. intraradices*) inducen el biocontrol de *Pythium ultimum* (Del Fabbro y Prati, 2014). Efectos de biocontrol como resultado de la micorrización fueron encontrados por Fierro-Coronado *et al.* (2013) quienes mostraron que la micorrización de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con *R. intraradices* crecidas con una concentración baja en P (20 µM) disminuyó significativamente el índice de pudrición radical causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con respecto a las plantas no micorri-

only present in the consortium AD. Out of these species, *F. mosseae* (George *et al.*, 1992; Ozgonen and Erkilic, 2007) and *A. scrobiculata* (Shukla *et al.*, 2012) have been reported as efficient for the acquisition of P; whereas *F. geosporum* has been known to produce differential responses in the host depending on the origin of the isolate (Oliveira *et al.*, 2010).

On the other hand, there is partial proof of findings by other authors, that is, that mycorrhization influences the reduction in the disease severity (Akhtar *et al.*, 2011), although differentially. Only one of the native consortia (PA) and the commercial inoculant (MI) displayed an effect in the reduction in the severity of wilting caused by the isolate FPC of *F. oxysporum*. Consortium PA contained four AMF species (*A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. claroideum* and *C. etunicatum*). Out of these species, it is known that *C. claroideum* in combination with other AMF species (*F. geosporum*, *F. mosseae*, and *R. intraradices*) induce the biocontrol of *Pythium ultimum* (Del Fabbro and Prati, 2014). Effects of biocontrol as a result of mycorrhization were found by Fierro-Coronado *et al.* (2013), who proved that mycorrhization in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with *R. intraradices* grown with a low P concentration (20 µM) reduced significantly the rotting in roots caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in regard to non-mycorrhized plants; Gardezi *et al.* (2001) evaluated the effect of a native consortium (*Glomus* sp. Zac-19) and *Glomus aggregatum* individually in the biocontrol of *Fusarium* sp. in gladiola plants (*Gladiolus grandiflorus* Andrews) and found that the AMFs reduced root rotting significantly in comparison to plants without inoculation; meanwhile, Hernández-Montiel *et al.* (2013) found that the inoculation of papaya plants (*Carica papaya* L.) with a MTZ01 native consortium (*R. intraradices*, *F. mosseae*, *C. etunicatum* and *Gigaspora albida*) reduced

zadas; Gardezi *et al.* (2001) evaluaron el efecto de un consorcio nativo (*Glomus* sp. Zac-19) y *Glomus aggregatum* de manera individual en el biocontrol de *Fusarium* sp. en plantas de gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Andrews) encontrando que los HMA disminuyeron significativamente la pudrición radical con respecto a las plantas sin inocular; mientras que Hernández-Montiel *et al.* (2013) encontraron que la inoculación de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) con un consorcio nativo MTZ01 (*R. intraradices*, *F. mosseae*, *C. etunicatum* y *Gigaspora albida*) disminuyeron significativamente el índice de la severidad de la enfermedad en 56 % y la colonización radical de *F. oxysporum* en 54 % con respecto al control. Los HMA juegan un papel importante en el control de diversos fitopatógenos a través de mecanismos directos o indirectos (Jung *et al.*, 2012). Mecanismos directos como la competencia por sitios de colonización (Cordier *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2012; Hernández-Montiel *et al.*, 2013; Reyes-Tena *et al.*, 2016), cambios en la composición de exudados radicales (Scheffknecht *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2015) e indirectos como la resistencia inducida por la micorrización de los diferentes mecanismos de defensa vegetal (Jung *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013). Jaiti *et al.* (2007) encontraron que plantas de palma datilera (*Phoenix dactylifera*) inoculadas con un consorcio nativo (*Glomus* sp., *Sclerocystis* sp., *Acaulospora* sp. y *Scutellospora* sp.) indujo cambios en las actividades de dos enzimas relacionadas con la defensa vegetal (peroxidasa y polifenoloxidasas) sólo cuando fueron confrontadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Estos mecanismos pueden estar implicados en la disminución de la severidad de la marchitez en los tratamientos PA+Fox y MI+Fox. La aparición de los síntomas de la marchitez originados por el patógeno inoculado en las plantas de *A. cupreata* fue de manera lenta y diferencial pero progresiva, similar a lo reportado por Ávila-

significantly the rate of disease severity by 56 %, and root colonization with *F. oxysporum* by 54 % in regard to the control. AMFs play an important role in the control of several plant pathogens through direct or indirect mechanisms (Jung *et al.*, 2012). Direct mechanisms include the competition for colonization sites (Cordier *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2012; Hernández-Montiel *et al.*, 2013; Reyes-Tena *et al.*, 2016), changes in the composition of root exudates (Scheffknecht *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2015), and indirect mechanisms include the resistance induced by mycorrhization of the different plant defense mechanisms (Jung *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013). Jaiti *et al.* (2007) found that date palm plants (*Phoenix dactylifera*) inoculated with a native consortium (*Glomus* sp., *Sclerocystis* sp., *Acaulospora* sp. and *Scutellospora* sp.) induced changes in the activities of two enzymes related to plant defense (peroxidase and polyphenol oxidase) only when confronted with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. These mechanisms may be implied in the reduction of the severity of wilting in treatments PA+Fox and MI+Fox. The appearance of symptoms of wilting caused by the pathogen inoculated in the *A. cupreata* plants appeared in a slow and differential but progressive manner, similar to reports by Ávila-Miranda *et al.* (2010), who inoculated *A. tequilana* plants with two *F. oxysporum* isolates to evaluate their pathogenicity and found the initial symptoms of the disease in the tips of leaves (chlorosis, curling, and wilting) 200 days after inoculation.

## CONCLUSIONS

The native AMF consortia and the commercial inoculant INIFAP<sup>®</sup> mycorrhiza displayed a significant effect on the growth of *A. cupreata* plants under greenhouse conditions seven months

Miranda *et al.* (2010) quienes al inocular plantas de *A. tequilana* con dos cepas de *F. oxysporum* para evaluar su patogenicidad observaron los síntomas iniciales de la enfermedad en las puntas de las hojas (clorosis, enrollamiento y marchitez) a los 200 días después de la inoculación.

## CONCLUSIONES

Los consorcios nativos de HMA y el inóculo comercial micorriza INIFAP® mostraron un efecto significativo en el crecimiento de plantas de *A. cupreata* en condiciones de invernadero a los siete meses después de la inoculación, por lo que pueden considerarse como potenciales biofertilizantes para *A. cupreata* en la etapa de vivero. Se encontró un efecto de biocontrol de dos inóculos, el consorcio nativo Paso Ancho (PA) y el inóculo comercial micorriza INIFAP® al disminuir en 41 % la severidad de la marchitez en las plantas de *A. cupreata* inoculadas con *F. oxysporum* FPC, ambos inóculos pueden ser considerados como posibles agentes de biocontrol. Este es el primer reporte del uso de HMA para la promoción del crecimiento vegetal y en el biocontrol de *F. oxysporum* en *A. cupreata*.

## AGRADECIMIENTOS

J. R. Trinidad-Cruz agradece al CONACYT por el apoyo de beca para realizar sus estudios de maestría desarrollada como parte del proyecto MICH-2010-03-148208 financiado por el Fondo Mixto del gobierno del estado de Michoacán y el CONACYT. La Dra. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de tesis de maestría de J. R. Trinidad-Cruz. Se agradece al Dr. Joaquín Qui-Zapata del CIATEJ por proporcionar al hongo fitopatógeno *F. oxysporum* FPC para este estudio.

after inoculation, and can therefore be considered potential biofertilizers for *A. cupreata* in the greenhouse phase. A biocontrol effect was found in two inoculants: the native consortium Paso Ancho (PA) and the commercial inoculant INIFAP® mycorrhiza, which reduced by 41% the severity of wilting in *A. cupreata* plants inoculated with *F. oxysporum* FPC; both inoculants can be considered possible biocontrol agents. This is the first report on the use of AMF to promote plant growth and in the biocontrol of *F. oxysporum* in *A. cupreata*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

J. R. Trinidad-Cruz thanks CONACYT for the scholarship support granted to carry out his Master's degree studies as a part of the project MICH-2010-03-148208 financed by the Fondo Mixto of the Michoacán state government and CONACYT. Dr. E. Quiñones-Aguilar participated as a codirector of J. R. Trinidad-Cruz's Master's degree thesis. Thanks to Dr. Joaquín Qui-Zapata from CIATEJ for providing the *F. oxysporum* FPC fungus for this study.

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

## LITERATURA CITADA

- Abdel-Fattah GM and Asrar AWA. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal application to improve growth and tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in saline soil. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:267-277. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0825-6>
- Aguirre-Dugua X and Eguiarte LE. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90:36-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Akhtar MS and Siddiqui ZA. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. Pp:61-97. In: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds.). *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 359p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7_3)

- Akhtar MS, Siddipqui ZA and Wiemken A. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to control plant fungal diseases. Pp:263-292. In: Lichtfouse E (ed.). Alternative farming systems, biotechnology, drought stress and ecological fertilization. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 354p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0186-1\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0186-1_9)
- Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán-de Peña DA, Vera-Núñez JA and Peña-Cabriales JJ. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Journal of the Professional Association for Cactus Development 12:166-180. Disponible en línea: [http://www.jpacd.org/downloads/Vol12/13\\_JJPenaJPACD12.pdf](http://www.jpacd.org/downloads/Vol12/13_JJPenaJPACD12.pdf)
- Bernal-Alcocer A, Zamora-Natera JF, Virgen-Calleros G y Nuño-Romero R. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:140-146. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223205.pdf>
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T and Malajczuc N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra, Australia. 155 p.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM and Ton J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. Cell Press 18:539-545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.004>
- Camprubi A, Estaun V and Calvet C. 2011. Greenhouse inoculation of psammophilic plant species with arbuscular mycorrhiza fungi to improve survival and early growth. European Journal of Soil Biology 47:194-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.02.001>
- Cui M and Nobel PS. 1992. Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. New Phytologist 122:643-649. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00092.x>
- Cordier C, Pozo JM, Barea JM, Gianinazzi S and Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant-Microbe Interactions 11:1017-1028. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.10.1017>
- De Cal A, Garcia-Lepe R and Melgarejo P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. Phytopathology 90:260-268. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.3.260>
- Del Fabbro C and Prati D. 2014. Early responses of wild plant seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and pathogens. Basic and Applied Ecology 15:534-542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2014.08.004>
- Eilenberg J. 2006. Concepts and visions of biological control. Pp:1-11. In: Eilenberg J and Hokkanen HMT (eds.). An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Vol. 2. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 322 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-4401-4>
- Fierro-Coronado RA, Castro-Moreno MG, Ruelas-Ayala RD, Apodaca-Sánchez MA and Maldonado-Mendoza IE. 2013. Induced protection by *Rhizophagus intraradices* against *Fusarium* wilt of tomato. Interciencia 38:48-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33926506008>
- Gardezi AK, Cetina VM, Ferrera-Cerrato R, Velázquez J, Pérez CA y Larqué M. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiola. Terra Latinoamericana 19:259-264. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57319307>
- George E, Haussler KU, Vetterlein D, Gorgus E and Marschner H. 1992. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. Canadian Journal of Botany 70:2130-2137. <http://dx.doi.org/10.1139/b92-265>
- Gerdemann JW and Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46:235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Gobierno de Michoacán. 2012. Establece Fausto Vallejo corredor geográfico del mezcal en Michoacán. <http://michoacan.gob.mx/index.php/noticias/1076-elevacion-mezcal>. (consulta, marzo 2014).
- Gustafson JD and Casper BB. 2006. Differential host plant performance as a function of soil arbuscular mycorrhizal fungal: Experimentally manipulating co-occurring *Glomus* species. Plant Ecology 183:257-263. <http://dx.doi.org/10.1007/s11258-005-9037-8>
- Hage-Ahmed K, Krammer J and Steinkellner S. 2013. The intercropping partner affects arbuscular mycorrhizal fungi and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* interactions in tomato. Mycorrhiza 23:543-550. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-013-0495-x>
- Hernández-Montiel LG, Rueda-Puente EO, Cordoba-Matson MV, Holguín-Peña JR and Zulueta-Rodríguez R. 2013. Mutualistic interaction of rizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* in *Carica papaya* seedlings. Crop Protection 47:61-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.01.008>
- Hu JL, Lin XG, Wang JH, Shen WS, Wu S, Peng SP and Mao TT. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber *Fusarium* wilt in greenhouse soils. Pedosphere 20:586-593. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60048-3)
- Jaiti F, Meddipch A and Hadrami IE. 2007. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. Physiological and Molecular Plant Pathology 71:166-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.01.002>
- Jansa J, Smith FA and Smith SE. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. New Phytologist 177:779-789. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x>
- Jarstfer AG and Sylvia DM. 1992. The production and use of aeroponically grown inocula of VAM fungi in the native plant nursery. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series No. R-02398. Florida, US. 11 p.
- Jung SC, Martínez-Medina A, López-Raéz JA and Pozo MJ. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. Journal of Chemical Ecology 38:651-664. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Larsen J, Graham JH, Cubero J and Ravnskov S. 2012. Biocontrol traits of plant growth suppressive arbuscular mycorrhizal

- fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. European Journal of Plant Pathology 133:361-369. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9909-9>
- Martínez-Palacios A, Gómez-Sierra JM, Sáenz-Romero C, Pérez-Nasser N and Sánchez-Vargas N. 2011. Genetic diversity of *Agave cupreata* Trel. & Berger. considerations for its conservation. Revista Fitotecnia Mexicana 34:159-165. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v34n3/v34n3a6.pdf>
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S and Jakobsen I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 164:357-364. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>
- Oliveira RS, Boyer LR, de Carvahlo MF, Jeffries P, Vosatka M, Castro PML and Dodd CD. 2010. Genetic, phenotypic and functional variation within a *Glomus geosporum* isolate cultivated with or without the stress of a highly alkaline anthropogenic sediment. Applied Soil Ecology 45:39-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.01.008>
- Ozgonen H and Erkilic A. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. Crop Protection 26:1682-1688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.02.010>
- Pearson JN and Jakobsen I. 1993. The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labeling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. New Phytologist 124:489-494. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03840.x>
- Pimienta-Barrios E, Zañudo-Hernández J y López-Alcocer E. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. Acta Botánica Mexicana 89:63-78. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/abm/n89/n89a5.pdf>
- Phillips JM and Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153670801103>
- Qui-Zapata J, Rincón-Enríquez G, Rodríguez-Domínguez JM, Gutiérrez-Mora A, Dupré P y García-Vera AG. 2011. Pathogenicity tests *in vitro* and *in planta* of pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* associated with agave wilt. In: First International Symposium on Agave. CIATEJ-UNAM, August 29 to September 2, 2011. Guadalajara, Jalisco, México.
- Ren L, Zhang N, Wu P, Huo H, Xu G and Wu G. 2015. Arbuscular mycorrhizal colonization alleviates *Fusarium* wilt in watermelon and modulates the composition of root exudates. Plant Growth Regulation 77:77-85. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-015-0038-x>
- Reyes-Tena A, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G y López-Pérez L. 2016. Micorrización en *Capsicum annuum* L. para la promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici* L. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:857-870. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/es/282-rss/3938-micorrizacion-en-capsicum-annuum-1-para-promocion-de-crecimiento-y-bioproteccion-contra-phytophthora-capsici-1>
- Robles-Martínez ML, Robles C, Rivera-Becerril F, Ortega-Larrocea MP y Pliego-Marín L. 2013. Inoculación con consorcios nativos de hongos de micorriza arbuscular en *Agave angustifolia* Haw. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6:1231-1240. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263128353014.pdf>
- Ruiz S, Adriano L, Ovando I, Navarro C and Salvador M. 2011. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. African Journal of Biotechnology 10:9623-9630. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.641>
- Saldajeno MGB, Chandanie WA, Kubota M and Hyakumachi M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. Pp:211-226. In: Siddipqui ZA, Akhtar MS and Futai K (eds.). Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry. Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands. 349p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7_9)
- Scheffknecht S, Mamerler R, Steinkellner S and Vierheilig H. 2006. Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. Mycorrhiza 16:365-370. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-006-0048-7>
- Shukla A, Kumar A, Jha A and Rao DVKN. 2012. Phosphorus threshold for arbuscular mycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. Biology and Fertility of Soils 48:109-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-011-0576-y>
- Smith SE and Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press. Cambridge, UK. 800p.
- StatPoint Inc. 2005. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com).
- Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Qui-Zapata JA, Rodríguez-Domínguez JM, López-Pérez L y Rincón-Enríquez G. 2013. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en *Agave cupreata*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (suplemento):S90. Disponible en línea: <http://rnf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>
- Tripathi S, Kamal S, Sheramati I, Oelmüller R and Varma A. 2008. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. Pp:281-306. In: Varma A (ed.). Mycorrhiza. Springer Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. 797p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_14)
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. Biochemical Genetics 51:243-255. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>

# ***In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves**

## **Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.)**

**Isela Apolonio-Rodríguez, Omar Franco-Mora\***, Martha Lydia Salgado-Siclán, Laboratorio de Horticultura, Centro de Investigación y Estudios avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México; Campus “El Cerrillo” Toluca, México, CP. 50200; **Jesús Gaudencio Aquino-Martínez**, Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). Conjunto SEDAGRO s/n, Rancho Guadalupe - San Lorenzo. Metepec, México, CP. 52140. \*Autor para correspondencia: ofrancom@uaemex.mx.

**Recibido:** 08 de noviembre, 2016. **Aceptado:** 25 de enero, 2017.

Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O, Salgado-Siclán ML, Aquino-Martínez JG. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 170-185.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1611-1

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** Extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) (*Vitis* spp.) de tres accesiones (P-178, E-200 y TN-4) se evaluaron *in vitro* a 6, 8 y 12 % v/v con el fin de medir el efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Comparativamente, se empleó resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), extracto de cítricos (EC) (3, 5 y 8 % v/v) y cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL). En promedio, SW inhibió el crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación conidial (IGC) en 88.9, 85.5 y 93.7 %, respectivamente. RVS presentó el segundo mejor resultado.

**Abstract.** The extracts of wild grapevines (*Vitis*) leaves (EHVS) from three accessions (P-178, E-200 and TN-4) at 6, 8 and 12 % v/v, were tested *in vitro* to evaluate their inhibitory effect on *Botrytis cinerea* development. Resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), citrus extracts (EC) (3, 5 and 8 % v/v) and cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL) were compared against EHVS. In average, SW presented inhibition of mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and spore germination (IGC) (88.9; 85.5 and 93.7 %, average respectively). RVS presented the second higher inhibition rate. All EHVS presented antifungal activity; specially, P-178 at 12 % resulted in 72 % ICM, 75 % IE and 62 % IGC. This dose contained phenolic compounds 19.9 mg/mL, RVS 1.7 mg/mL, gallic acid 3.8 mg/mL and ferulic acid 2.5 mg/mL.

**Key words:** Ferulic acid, gallic acid, antifungal activity, phenolic compounds, resveratrol.



Todos los EHVS tuvieron acción inhibitoria; especialmente, P-178 al 12 % tuvo 72, 75 y 62 % de ICM, IE e IGC, respectivamente. Esta dosis tuvo 19.9 mg/mL de compuestos fenólicos, RVS 1.7 mg/mL, ácido gálico 3.8 mg/mL y ácido ferúlico 2.5 mg/mL.

**Palabras clave:** Ácido ferúlico, ácido gálico, actividad fúngica, compuestos fenólicos, resveratrol.

*Botrytis cinerea* (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*), agente causal de la pudrición gris, ataca un amplio rango de plantas en todo el mundo (Piesik *et al.*, 2015). Este hongo ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas convencionales, particularmente benzimidazoles y dicarboximidas (Panbianco *et al.*, 2015). Múltiples aplicaciones de los diferentes tratamientos de control químico en frutas y hortalizas pueden generar problemas a la salud del personal de campo agrícola y al consumidor, detención de exportaciones por residuos de plaguicidas, daños al ambiente y efectos perjudiciales a organismos benéficos para la agricultura (Yadav *et al.*, 2015). Por consiguiente, es necesario reemplazar el uso de sustancias tóxicas por alternativas naturales amigables con el ambiente y la salud humana (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

Una alternativa en el manejo integrado de enfermedades es el uso de compuestos naturales producidos por algunas plantas, a los cuales se les atribuye propiedades antifúngicas (Compean y Ynalvez, 2014). Entre estos compuestos se encuentran los isoflavonoides, diterpenoides, alcaloides, aceites esenciales, estilbenos y polipéptidos (Soylu *et al.*, 2010). Particularmente, se ha reportado que *Vitis vinifera* posee diversos compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica como miricetina, ácido elágico, kaempferol, quercitina, ácido gálico, entre otros (Schnee *et al.*, 2013). Entre los compuestos

*Botrytis cinerea* (Teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*), the causal agent of gray rot, damages a wide range of plants worldwide (Piesik *et al.*, 2015). This fungus has developed resistance to some conventional fungicides, particularly benzimidazole and dicarboximide fungicides (Panbianco *et al.*, 2015). Multiple applications of the different chemical control treatments to fruit and vegetables may cause health problems to field workers and consumers, export restrictions due to pesticide residues, damage to the environment and harmful effects on organisms beneficial to agriculture (Yadav *et al.*, 2015). Therefore, it is necessary to replace the use of toxic substances with natural ones (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

An alternative for integral plant disease management is to use natural compounds produced by some plants that have antifungal properties (Compean and Ynalvez, 2014). Among those compounds are isoflavonoids, diterpenoids, alkaloids, essential oils, stilbenes and polypeptides (Soylu *et al.*, 2010). In particular, *Vitis vinifera* has been reported to produce several compounds with antimicrobial and antifungal activity, such as myricetin, ellagic acid, kaempferol, quercetin, and gallic acid, among others (Schnee *et al.*, 2013). Within the phenolic compounds present in fruit peel extracts of a mix of three Chilean cultivars of *V. vinifera*, p-coumaric acid (98.5 µg/mL) and kaempferol (100.9 µg/mL) showed the highest antifungal activity; the phenolic extract was reported to have potential against *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013).

Also, resveratrol (RVS), a compound that was isolated for the first time from white hellebores (*Veratrum album*) and belongs to the stilbene group, has been reported as being active against different pathogenic fungi in grapevine crops, i.e. *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* and *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013).

fenólicos presentes en extractos de cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *V. vinifera* se reportó la mayor actividad antifúngica de ácido p-coumarico (98.5 µg/mL) y kaempferol (100.9 µg/mL); el extracto fenólico fue reportado con potencial contra *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013).

De la misma manera, el resveratrol (RVS), compuesto aislado por primera vez de eléboro blanco (*Veratrum album*) y perteneciente al grupo de los estilbenos, ha sido reportado como compuesto activo contra diferentes hongos fitopatógenos en el cultivo de la vid, i. e. *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* y *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Adrian y Jeandet (2012) indicaron que RVS, a 60 µg/mL, ocasionó disrupción de la membrana de los conidios de *B. cinerea*. Por otra parte, el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro* se inhibió entre 50 y 70 % por acción de RVS (Salgado *et al.*, 2015). Además, al evaluar la efectividad, de manera separada, de RVS y tres compuestos relacionados con éste, (E)-3,4,5-trimethoxy-β-(2-furyl)-estireno, (E)-4-methoxy-β-(2-furyl)-estireno y (E)-3,5-dimethoxy-β-(2-furyl)-estireno a 100 µg/mL, se logró inhibir 70 % de la germinación de conidios de *B. cinerea* (Caruso *et al.*, 2011).

En el territorio de México se reporta la presencia de más de 16 especies silvestres del género *Vitis* (Cruz, 2007). Actualmente, en la localidad de Santa Cruz, Municipio de Zumpahuacán, Estado de México, México, se tiene una colección de plantas de este género; a las cuales se les estudia sistemáticamente para incrementar su aprovechamiento. Particularmente, la hoja de las especies silvestres de vid del centro de México (*Vitis* spp.), al igual que la hojas de *V. vinifera*, presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mencionan que de RVS se pueden encontrar de 0.04 a 39.5 µg/g de peso fresco; además, determinaron la existencia de

Adrian and Jeandet (2012) reported that RVS, at 60 µg/mL, ruptured the membrane of *B. cinerea* conidia. On the other hand, micelial growth of *B. cinerea in vitro* was inhibited between 50 and 70 % by the action of RVS (Salgado *et al.*, 2015). Also, when individually assessing the effectiveness of RVS and three RVS-related compounds, (E)-3,4,5-trimethoxy-β-(2-furyl)-styrene, (E)-4-methoxy-β-(2-furyl)-styrene and (E)-3,5-dimethoxy-β-(2-furyl)-styrene at 100 µg/mL, 70 % of *B. cinerea* conidia germination was inhibited (Caruso *et al.*, 2011).

Over 16 wild species of the genus *Vitis* have been reported to be present in Mexico (Cruz, 2007). Today, there is a collection of plants of this genus in Santa Cruz, municipality of Zumpahuacán, State of Mexico. These plants are being systematically studied to enhance their use. In particular, the leaves of wild grapevines (*Vitis* spp.) from central Mexico, as well as leaves of *V. vinifera*, contain significant amounts of phenolic compounds (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mentioned that they found RVS from 0.04 to 39.5 µg/g fresh weight of leaves; the authors also found the presence of gallic acid, rutin and caffeic acid. Given that the presence of phenolic compounds in wild grapevine indicates their potential as a natural control agent for plant diseases, in this study we evaluated their *in vitro* antifungal activity against *B. cinerea* using extracts of fresh leaves of wild grapevine accessions P-178, E-200 and TN-4.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal isolate

Bell peppers (*Capsicum annuum*) showing gray rot were collected at the Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho

ácido gálico, rutín y ácido caféico. Debido a que la presencia de compuestos fenólicos en hojas de vid silvestre indica su potencial como agente de control natural de enfermedades en vegetales, en el presente trabajo se evaluó *in vitro* la actividad antifúngica contra *B. cinerea* de extractos de hojas frescas de las accesiones de vid silvestre P-178, E-200 y TN-4.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa fúngica

Se colectaron frutos de pimiento morrón (*Cap-sicum annuum*) con síntomas de pudrición gris, en el Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho El Islote”, del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), localizado en Villa Guerrero, Estado de México a 18° 58' 04" latitud norte y 99° 39' 21" longitud oeste. Posteriormente, en el Laboratorio de Fitopatología del ICAMEX se tomaron fragmentos de aproximadamente 5 × 5 mm de tejido de los frutos enfermos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo avena-agar (MCAvA) acidificado, con ácido láctico al 25 % (v/v), a pH 4.5 y se incubaron a 26±2 °C durante 8 días. Posteriormente, usando la técnica de punta de hifa, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con MCAvA, con la finalidad de obtener una cepa pura del hongo. Para comprobar la patogenicidad de los aislamientos se inocularon frutos sanos de fresa (*Fragaria × ananassa*) cv. Festival, previamente desinfectados como se describió anteriormente. A los frutos se les ocasionaron tres heridas, de aproximadamente 2 mm de diámetro por 2 mm de profundidad, con agujas de

El Islote” of the Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), in Villa Guerrero, State of Mexico, at 18° 58' 04" North latitude and 99° 39' 21" West longitude. Then, at ICAMEX's Laboratory of Phytopathology, tissue fragments, measuring approximately 5 × 5 mm, were taken from the diseased bell peppers and disinfected with 1 % (v/v) sodium hypochlorite for 3 min; they were rinsed three times with sterile distilled water, and transferred to Petri dishes containing acidified at pH 4.5, with 25 % (v/v) lactic acid, oat-agar culture medium (MCAvA), and, then, incubated at 26±2 °C for 8 days. Later, using the hyphal tip technique, a portion of mycelial tissue was transferred to another Petri dish containing MCAvA to obtain a pure isolate of the fungus. To confirm the isolates' pathogenicity, we inoculated healthy (*Fragaria × ananassa*) cv. Festival strawberries that had been previously disinfected as described earlier. Three perforations measuring approximately 2 mm in diameter × 2 mm deep were made on the strawberries using previously sterilized dissection needles. The perforations were filled with 20 µL of a suspension of 1×10<sup>6</sup> conidia per millimeter. Once the typical symptoms of gray rot appeared, the fungus was identified by comparing the morphological structures observed (mycelium type and color, septation, conidiophores, conidiophore branching, conidia length and width) using the Barnett and Hunter keys (1998). The specialized descriptions by Ellis (1971) and Crous *et al.* (2007) were used to determine the species.

Samples of the fungus were also sent to the Laboratory of Phytosanitary Diagnosis of Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, where they were molecularly analyzed. The ITS sequence obtained from the fungus was compared to sequences of the most similar reference organisms through a search in the BLAST database of

disección previamente esterilizadas. En dichas heridas se depositaron 20 µL de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios por mililitro. Una vez que se observaron los síntomas típicos de pudrición gris, se procedió a la identificación del hongo comparando las estructuras morfológicas observadas (tipo y color de micelio, septación, conidióforos, ramificación de conidióforos, largo y ancho de conidios) con las claves de Barnett y Hunter (1998); mientras que para la determinación de la especie se emplearon las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2007).

Adicionalmente, se enviaron muestras del hongo al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, en donde se analizaron molecularmente. La secuencia ITS obtenida del hongo se comparó con secuencias de organismos referencia con mayor similitud, por medio de una búsqueda en la base de datos BLAST del GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Una vez comprobada la especie, el hongo fue cultivado para realizar las pruebas del presente experimento.

### Obtención de extractos vegetales

Se obtuvieron hojas sanas y uniformes en tamaño y color (Franco *et al.*, 2012) de tres accesiones de vid silvestre: (1) E-200, originaria de Tejupilco, Estado de México, (2) TN-4, originaria de Tenancingo, Estado de México y (3) P-178, originaria de Hueytamalco, Puebla; todas ellas establecidas en el banco de germoplasma de vid silvestre de Zumpahuacán, México. El tejido vegetal se trasladó al Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México; en donde se maceraron 200 g de hojas por accesión en 250 mL de metanol al 99 %; esta mezcla se dejó en reposo en oscuridad durante una semana. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró en un

GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Once the species was confirmed, the fungus was grown to perform the tests of this experiment.

### Obtaining vegetable extracts

Healthy leaves of uniform size and color were obtained (Franco *et al.*, 2012) from three wild grapevine accessions: (1) E-200, from Tejupilco, State of Mexico, (2) TN-4, from Tenancingo, State of Mexico, and (3) P-178, from Hueytamalco, Puebla; all the accessions were grown at the wild grapevine germplasm bank in Zumpahuacán, Mexico. The vegetable tissue was moved to the Laboratory of Horticulture of the Universidad Autónoma del Estado de México, in Toluca, State of Mexico, where 200 g of leaves per accession were macerated in 250 mL of 99 % methanol; these mixtures were left standing in darkness for a week. Afterwards, the extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator until 50 mL of stock solution free of the extraction solvent was obtained. The extracts were poured into amber glass jars and placed in cold storage (4 °C) for conservation.

### Identification of polyphenols

Using gallic acid as a standard, the total amount of phenols contained in extracts of wild grapevine leaves (EHVS) was determined using the method of Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009) at 760 nm on a spectrophotometer. The result was expressed in gallic acid equivalents (EAG). Some polyphenolic compounds of EHVS of each individual accession were identified using an HPLC Shimadzu isocratic pump (serial 42205) and a reversed-phase Spherisorb C18  $1 \mu\text{m} \times 250 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$  column (Waters, USA). For the mobile phase we used

rotavapor, hasta tener 50 mL de la solución madre libre del solvente de extracción. Los extractos se envasaron en un frasco ámbar y se colocaron en refrigeración (4 °C) para su conservación.

### Identificación de polifenoles

Empleando como estándar ácido gálico, se determinó el contenido de fenoles totales en los extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) con el método Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009), a 760 nm en un espectrofotómetro; se expresó el resultado en equivalentes de ácido gálico (EAG). La identificación de algunos compuestos polifenólicos de los EHVS de cada accesión se realizó con un HPLC Shimadzu bomba isocrática (serie 42205), empleando una columna Spherisorb fase reversa C18 1  $\mu\text{m}$   $\times$  250 mm  $\times$  4.6 mm (Waters, USA). Como fase móvil se usó agua: acetonitrilo: ácido acético (70:29.9:0.1). El nivel de flujo fue 1 mL min<sup>-1</sup> permitiendo cinco minutos de estabilización entre cada muestra. La señal fue monitoreada a 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Las muestras fueron inyectadas por triplicado en el sistema cromatográfico; cuantificando los compuestos detectados por el método de estándar interno.

### Actividad antifúngica

En matraces con MCAvA a pH 4.5, sin solidificar, se vertieron las cantidades correspondientes (Cuadro 1) de los EHVS de cada una de las tres accesiones, resveratrol (RVS) (Sigma), extracto de cítricos (EC) (Tecnosafe), cyprodinil+ fludioxonil (funguicida Switch® 62.5 WG) (SW), además como testigo absoluto (TA) se tuvo MCAvA sin ningún ingrediente adicional.

De cada EHVS se tomaron 6, 8 y 12 mL para aforar a 100 mL de MCAvA a pH 4.5. Cada solución se vació en cajas de Petri debidamente

water: acetonitrile: acetic acid (70:29.9:0.1). The flow level was 1 mL min<sup>-1</sup> and we allowed a five-minute stabilization interval between each sample. The signal was monitored at 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). The samples were injected three times in the chromatographic system and the compounds detected using the standard internal method were quantified.

### Antifungal activity

The respective amounts (Table 1) of the EHVS of each accession, resveratrol (RVS) (Sigma), citric extract (EC) (Tecnosafe), and cyprodinil+ fludioxonil (fungicide Switch® 62.5 WG) (SW) were poured into flasks containing unsolidified MCAvA (pH 4.5); MCAvA with no ingredients added was used as the absolute tester (TA).

From each EHVS, we took 6, 8 and 12 mL for dilution at 100 mL of MCAvA at pH 4.5. Each solution was poured into properly labeled Petri dishes and allowed to solidify. Treatments with RVS (60, 90 and 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), EC (3, 5 and 8 % (v/v)) and SW (500, 800 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared in the same way, using RVS diluted in: methanol 1:1, SW in distilled water, while EC was used in its liquid commercial form. Each of the 19 treatments were repeated four times using three Petri dishes per replication; each of the Petri dishes was an experimental unit. The experiment was performed twice, and because of the similarity of both results, the statistical analysis included in this report corresponds to only one experiment.

Later, a disk 5 mm in diameter of MCAvA with 5-day old active *B. cinerea* mycelium was placed in the middle of each Petri dish containing MCAvA and its corresponding treatment. The dishes were incubated at 26 $\pm$ 2 °C and the diameter of each *B. cinerea* colony was measured every 48 h using a digital Vernier caliper. Measurement of each

**Cuadro 1. Concentración de compuestos fenólicos en medio de cultivo avena agar adicionado con extractos de hoja de vid silvestre (*Vitis* spp.).**

**Table 1. Concentration of phenolic compounds in oat-agar adding extracts of leaves of wild grapevine (*Vitis* spp).**

| Extracto de hoja de vid silvestre | Concentración (%; v/v) | Fenoles totales (EAG) | Concentración (mg/mL) |                |             |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|-------------|
|                                   |                        |                       | Ácido gálico          | Ácido ferúlico | resveratrol |
| P-178                             | 6                      | 20.8 d                | 1.9 c                 | 1.2 c          | 0.9 c       |
|                                   | 8                      | 27.7 c                | 2.5 b                 | 1.7 b          | 1.1 b       |
|                                   | 12                     | 41.4 a                | 3.8 a                 | 2.5 a          | 1.7 a       |
| E-200                             | 6                      | 13.9 e                | 1.9 c                 | 1.3 c          |             |
|                                   | 8                      | 18.5 d                | 2.5 bc                | 1.6 b          |             |
|                                   | 12                     | 26.7 c                | 3.6 a                 | 2.3 ab         |             |
| TN-4                              | 6                      | 18.6 d                | 1.5 d                 | 1.1 d          |             |
|                                   | 8                      | 24.5 c                | 1.9 c                 | 1.4 c          |             |
|                                   | 12                     | 35.4 b                | 2.8 b                 | 2.5 a          |             |

EAG: Equivalentes de ácido gálico. Los datos son la media de tres repeticiones; valores con letra diferente presentan diferencia estadística a  $P \leq 0.05$  / EAG: Equivalentents of gallic acid. Data are the average of three replications; values with the same letter show a statistical difference at  $P \leq 0.05$ .

etiquetadas y se dejó solidificar. Los tratamientos con RVS (60, 90 y 120  $\mu\text{g/mL}$ ), EC (3, 5 y 8 % (v/v)) y SW (500, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) se prepararon de la misma manera, empleando RVS disuelto en agua: metanol 1:1, SW en agua destilada, mientras que EC se empleó en su forma comercial líquida. Para cada uno de los 19 tratamientos se realizaron cuatro repeticiones, con tres cajas de Petri por repetición, siendo cada caja de Petri una unidad experimental. El experimento se realizó por duplicado, debido a la similitud de ambos resultados, el análisis estadístico presentado en este reporte corresponde a uno solo de los experimentos.

Posteriormente, se colocó, en el centro de cada una de las cajas de Petri con MCAvA y su respectivo tratamiento, un disco de 5 mm de diámetro de MCAvA con micelio activo de *B. cinerea* de 5 días de edad. Las cajas se incubaron a  $26 \pm 2$  °C y el diámetro de la colonia de *B. cinerea* se midió cada 48 h con ayuda de un vernier digital. Para cada repetición, las mediciones concluyeron cuando la superficie del MCAvA en todas las cajas del TA fue cubierta totalmente por el micelio. Los valores medios del crecimiento micelial fueron transformados

replicación ended when the surface of MCAvA in all the TA dishes was completely covered by mycelium. Average values of mycelium growth were converted to percentage inhibition of mycelial growth compared (ICM) to TA by applying the formula:  $\text{ICM} (\%) = [(d\text{Ta} - dt)/d\text{Ta} (\text{ICM})] \times 100$ , where dTa and dt denote the diameter of the mycelium growth of TA and of each of the other treatments, respectively (Soylu *et al.*, 2010). The Petri dishes within the incubator were arranged in a completely randomized design.

At the end of the experiment, MCAvA spores were collected from each treatment using a glass rod and sterile distilled water. For each previously described experimental unit, an aliquot of the suspension containing conidia was taken and transferred to a Neubauer chamber to count the conidia following the methodology of Moo-Koh *et al.* (2014). Data were converted to percentages, and the results were reported as inhibition of sporulation (IE) following the formula:  $\text{IE} (\%) = [(E\text{Ta} - E\text{t})/E\text{Ta}] \times 100$ , where ETa and Et denote the number of conidia in TA and in each of the remaining treatments, respectively (Soylu *et al.*, 2010).

a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) en relación con el TA utilizando la fórmula:  $ICM (\%) = [(dT_a - dt)/dT_a (ICM)] \times 100$ , donde  $dT_a$  y  $dt$  representan el diámetro del crecimiento micelial del TA y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar.

Al final del experimento, de cada tratamiento se obtuvieron esporas del MCAvA con ayuda de una varilla de vidrio y agua destilada estéril. Por cada unidad experimental previamente descrita, se tomó una alícuota de la suspensión con conidios y fue transferida a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de los conidios de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014). Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como inhibición de la esporulación (IE) siguiendo la fórmula:  $IE (\%) = [(ET_a - Et)/ET_a] \times 100$ , donde  $ET_a$  y  $Et$  representan el número de conidios en el TA y en cada uno de los tratamientos restantes, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010).

Por otro lado, a partir de un cultivo esporulado (8 días de edad), se preparó una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios por mililitro en agua destilada estéril. Se colocaron 200  $\mu$ L de esta suspensión en cajas de Petri con MCAvA suplementadas con las diferentes dosis de cada uno de los 19 tratamientos. Al final de un periodo de 48 h de incubación a  $22 \pm 2$  °C, se evaluó la germinación de 100 conidios ubicados de manera aleatoria. Se consideró germinado cuando el largo del tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño del diámetro del conidio. El porcentaje de inhibición de la germinación (IGC) se determinó mediante la fórmula empleada por Soyly *et al.* (2010):  $IGC (\%) = [(GT_a - Gt)/GT_a] \times 100$ , donde  $GT_a$  y  $Gt$  representan el número de conidios germinados en el TA y en cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente. El diseño experimental

On the other hand, using a sporulated culture medium (8 days old), a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia per milliliter was prepared in sterile distilled water. Two hundred microliters of the suspension were poured in Petri dishes with MCAvA supplemented with the different doses of each of the 19 treatments. After 48 h of incubation at  $22 \pm 2$  °C, germination of 100 randomly placed conidia was evaluated. The conidia were considered germinated when the length of the germ tube was equal to or greater than the diameter of the conidium. The percentage of spore germination inhibition (IGC) was determined with the formula used by Soyly *et al.* (2010):  $IGC (\%) = [(GT_a - Gt)/GT_a] \times 100$ , where  $GT_a$  and  $Gt$  denote the number of germinated conidia in TA and in each of the other treatments, respectively. The experimental design and number of replications per treatment were the same ones used for mycelium growth.

### Statistical analysis

ICM, IE and IGC percentages were converted to  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ . The data were processed through analysis of variance of a complete randomized design with a single factor, and when significance was found, we compared the means using Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ); all analysis were performed with the SAS® statistical software (SAS Institute, 2002).

## RESULTS

### Morphological-molecular identification.

Four days after inoculation with *Botrytis* sp., all strawberries showed symptoms of gray rot, as well as abundant fungal sporulation (Figure 1A). On the other hand, in MCAvA, colonies showed

y el número de repeticiones por tratamiento fue el mismo del trabajo de crecimiento micelial.

### Análisis estadístico

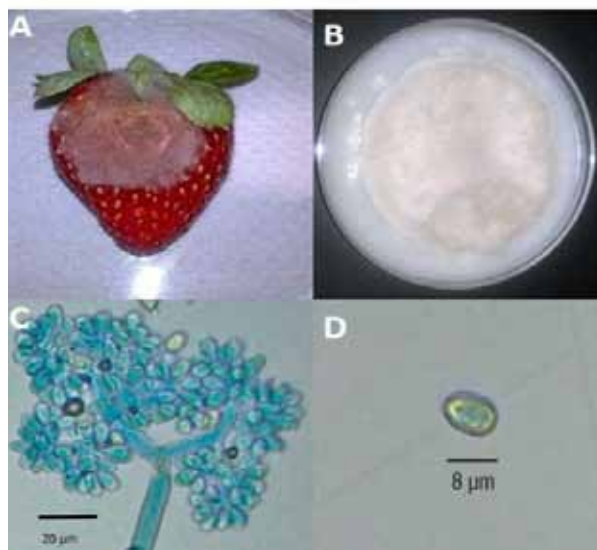
Los datos de porcentajes de ICM, IE e IGC se transformaron a  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ . Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza de bloques completamente al azar con un factor y en caso de significancia se procedió a la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS

### Identificación morfológico-molecular

Cuatro días después de la inoculación con *Botrytis* sp., todos los frutos de fresa mostraron síntomas de pudrición gris, además de abundante esporulación del hongo (Figura 1A). Por otra parte, en el MCAvA las colonias exhibieron crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color blanco y siete días después, el micelio se tornó de color gris (Figura 1B). Bajo microscopía de luz, se observaron conidióforos largos, septados, pigmentados, con pared lisa, ramificados apicalmente y con racimos de conidios (Figura 1C). Los conidios fueron unicelulares, ovoides, lisos, hialinos y de  $8-15 \times 6-9 \mu\text{m}$  (Figura 1D). Todas las características observadas correspondieron a *B. cinerea* de acuerdo con la descripción de Ellis (1971). Por otro lado, la comparación en el BLAST de la secuencia mostró 100 % de similitud con la secuencia KR055051. Basado en características morfológicas y moleculares se confirmó que el agente causal de la pudrición gris del pimiento morrón en el CITT “Rancho el Islote” del ICAMEX es *Botrytis cinerea*.

white concentric mycelium growth of velvety consistency; seven days later, the mycelium turned gray (Figure 1B). Under a light microscope, we observed long, septate, pigmented conidia with smooth walls, apically branched and with bunches of conidia (Figure 1C). The conidia were unicellular, ovoid, smooth, hyaline, and measured  $8-15 \times 6-9 \mu\text{m}$  (Figure 1D). All the features observed corresponded to *B. cinerea*, as described by Ellis (1971). On the other hand, when we compared the sequence in BLAST, it was 100 % similar to the KR055051 sequence. Based on the morphological and molecular features, we confirmed that the causal agent of gray rot on the bell pepper at CITT “Rancho el Islote” of ICAMEX is *Botrytis cinerea*.



**Figura 1.** Aislado de *Botrytis cinerea* obtenido a partir de frutos de *Capsicum annuum*. A) Síntomas de pudrición gris en fruto de fresa. B). Colonia de 4 días de edad cultivada en medio avena agar. C) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios; D) conidio de *Botrytis cinerea*.

**Figure 1.** Isolate of *Botrytis cinerea* from *Capsicum annuum* fruits. A) Symptoms of gray rot in strawberry fruits. B). Four-day old colony cultivated in oat-agar. C) Branched tip of a conidiophore with conidia bunches; D) *Botrytis cinerea* conidia.



## Compuestos fenólicos

En los EHVS de las tres accesiones se determinó la presencia de ácido gálico y ácido ferúlico, mientras que en P-178 se determinó la presencia de resveratrol. Al aumentar la cantidad de EHVS por mililitro de MCAvA, se incrementó la concentración de los diversos fenoles indicados (Cuadro 1).

## Actividad antifúngica

Todas las concentraciones de EHVS de las tres accesiones presentaron ICM. P-178 12 % presentó mayor ICM, superior al 70 % en relación a TA. SW a sus dos dosis más altas presentó 90 % de ICM, mientras que, de manera general, la ICM por RVS grado reactivo se ubicó entre SW y los EHVS. El EC inhibió no más de 25 % el crecimiento del micelio (Cuadro 2, Figura 2). La mayor IE se presentó con SW, seguida de RVS; mientras que el porcentaje de los EHVS fue entre 53 a 75 %, en relación al TA.

Por otro lado, todos los tratamientos presentaron IGC. SW, en sus tres dosis, inhibió más del 90 %, seguido de RVS, cuyo promedio de las tres dosis fue de 64 %. La mayor IGC de un EHVS fue observada en P-178 12 % cuyo porcentaje fue superior a 60 %, en relación al TA.

## DISCUSIÓN

La mayor concentración de ácido gálico, ácido ferúlico y RVS en los EHVS de P-178 en relación a E-200 y TN-4 está relacionado con la variabilidad en la presencia y concentración de polifenoles en hojas de distintas accesiones de vid silvestre de México; identificando a los factores genético, ambiental y genético-ambiental como los responsables de esta variabilidad (Katalinić *et al.*, 2009;

## Phenolic compounds

We found gallic and ferulic acids in the EHVS of the three accessions, and resveratrol in P-178. When the amount of EHVS per millimeter of MCAvA increased, the concentration of the different phenols increased (Table 1).

## Antifungal activity

All the concentrations of EHVS of the three accessions showed ICM. Accession P-178 12 % showed higher ICM, 70 % higher than TA. SW at its two highest doses showed 90 % of ICM, while the ICM per RVS reactive grade was between SW and EHVS. EC inhibited no more than 25 % of mycelium growth (Table 2, Figure 2). SW had the highest IE, followed by RVS; the percentage of the EHVS was 53 to 75 % compared to TA.

On the other hand, all the treatments showed IGC. The three doses of SW inhibited more than 90 %, followed by RVS, whose average of the three doses was 64 %. The highest IGC of an EHVS was observed in P-178 12 %, whose percentage was higher than 60 % in relation to TA.

## DISCUSSION

The highest concentration of gallic acid, ferulic acid and RVS in the EHVS of P-178 compared to E-200 and TN-4 may be related to the variability in the presence and concentration of polyphenols in leaves of different Mexican wild grapevine accessions; genetic, environmental and genetic-environmental factors have been identified as causing this variability (Katalinić *et al.*, 2009; Tobar-Reyes *et al.*, 2011). This study suggests that the difference among the accessions in the total content of phenolic compounds, and especially of the three phenols

**Cuadro 2. Actividad inhibitoria de diferentes tratamientos sobre crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación de la espora (IGC) de *Botrytis cinerea* in vitro.**

**Table 2. Inhibitory activity of different treatments on *in vitro* mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and spore germination (IGC) of *Botrytis cinerea*.**

| Tratamiento                                         | ICM (%)    | IE (%)        | IGC (%)      |               |
|-----------------------------------------------------|------------|---------------|--------------|---------------|
| Extracto de hoja de vid silvestre<br>accesión P-178 | 6 % (v/v)  | 45.1 ± 3.8 f  | 55.9 ± 3.8 e | 41.2 ± 4.6 f  |
|                                                     | 8 % (v/v)  | 52.5 ± 3.1 e  | 53.5 ± 3.1 e | 41.3 ± 3.4 d  |
|                                                     | 12 % (v/v) | 72.0 ± 2.2 c  | 75.3 ± 2.2 c | 61.8 ± 1.9 c  |
| Extracto de hoja de vid silvestre<br>accesión E-200 | 6 % (v/v)  | 34.8 ± 2.3 g  | 54.7 ± 11 e  | 34.5 ± 4.1 ef |
|                                                     | 8 % (v/v)  | 37.7 ± 1.2 g  | 60.6 ± 0.6 d | 35.3 ± 2.1 ed |
|                                                     | 12 % (v/v) | 55.8 ± 2.4 e  | 61.2 ± 0.4 d | 37.7 ± 6.1 g  |
| Extracto de hoja de vid silvestre<br>accesión TN-4  | 6 % (v/v)  | 27.5 ± 1.2 h  | 53.5 ± 2.3 e | 34.9 ± 7.5 ef |
|                                                     | 8 % (v/v)  | 35.0 ± 3.5 g  | 55.9 ± 0.5 e | 33.3 ± 3.5 ef |
|                                                     | 12 % (v/v) | 47.9 ± 1.8 f  | 60.0 ± 2.4 d | 35.7 ± 1.3 ed |
| Extracto de cítricos                                | 3 % (v/v)  | 24.7 ± 3.8 h  | 27.1 ± 1.1 f | 20.4 ± 2.3 g  |
|                                                     | 5 % (v/v)  | 25.3 ± 3.5 h  | 27.6 ± 5.1 f | 28.9 ± 4.1 f  |
|                                                     | 8 % (v/v)  | 27.2 ± 3.8 h  | 24.1 ± 1.3 f | 33.3 ± 2.8 ef |
| Resveratrol                                         | 60 µg/mL   | 62.2 ± 2.1 d  | 77.6 ± 0.7 b | 59.8 ± 5.9 c  |
|                                                     | 90 µg/mL   | 64.0 ± 2.7 d  | 78.2 ± 0.6 b | 63.6 ± 4.9 c  |
|                                                     | 120 µg/mL  | 72.9 ± 1.9 c  | 82.9 ± 0.5 a | 70.2 ± 5.9 b  |
| Switch (cyprodinil+fludioxinil)                     | 500 µg/mL  | 85.7 ± 3.4 b  | 85.3 ± 0.6 a | 91.4 ± 3.4 a  |
|                                                     | 800 µg/mL  | 89.8 ± 3.5 ab | 84.7 ± 0.6 a | 93.0 ± 3.5 a  |
|                                                     | 1000 µg/mL | 91.4 ± 3.2 a  | 86.5 ± 0.3 a | 96.6 ± 2.8 a  |
| Testigo absoluto                                    | 0          | 0 ± 0 i       | 0 ± 0 g      | 0 ± 0 h       |

Los datos son la media ± EE de cuatro repeticiones, tres cajas de Petri por repetición. Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentan diferencia significativas con la prueba de Tukey a  $P \leq 0.05$  / Data are the average ± SE of four replications, three Petri dishes per replication. Averages followed by the same letter in each column show no significant difference using Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .

Tobar-Reyes *et al.*, 2011). En este trabajo, se sugiere que la diferencia entre accesiones en el contenido total de compuestos fenólicos y particular de los tres fenoles identificados, es debida principalmente a la genética, ya que los tejidos vegetales de las tres accesiones provinieron de un mismo banco de germoplasma.

El efecto inhibitorio del desarrollo de *B. cinerea* de los EHVS empleados puede deberse a la presencia de ácido gálico, ferúlico y resveratrol, polifenoles que han mostrado propiedades antifúngicas (Katalinić *et al.*, 2009; Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). Vio-Michaelis *et al.* (2012), indicaron la presencia de ácido ferúlico en los extractos etanólicos de dos especies vegetales que poseen potencial para el control de *B. cinerea*; mientras

identified, is mainly the result of genetics, as the plant tissues of the three accesions came from the same germplasm bank.

The inhibitory effect of the development of *B. cinerea* by the EHVS used may have been caused by the presence of gallic acid, ferulic acid and resveratrol, three polyphenols that have shown antifungal properties (Katalinić *et al.*, 2009; Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). Vio-Michaelis *et al.* (2012) reported the presence of ferulic acid in the ethanolic extracts of two plant species that have the potential to control *B. cinerea*, while the application of gallic acid to an *in vitro* system showed less *B. cinerea* development (Mendoza *et al.*, 2013). Thus, the higher ICM, IE and IGC of EHVS P-178 12 % compared with the other EHVS may

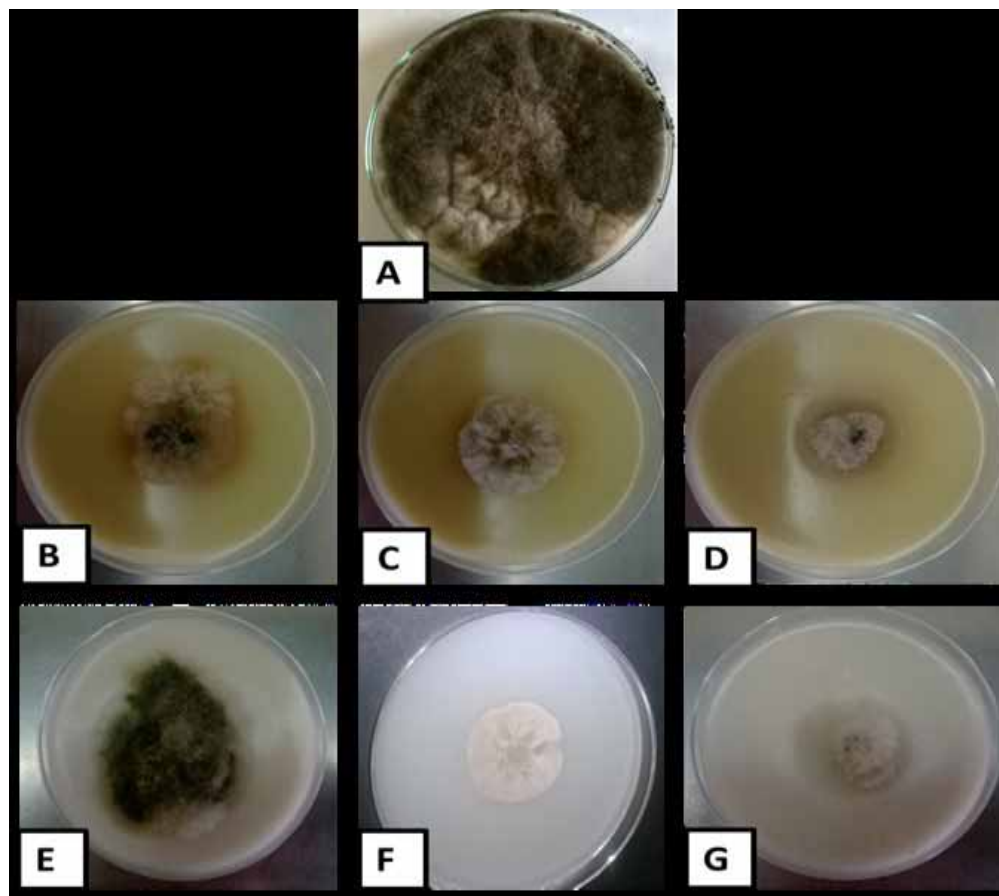


Figura 2. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en medio avena agar a los 8 días de la inoculación a  $26\pm 2$  °C A: testigo absoluto; B: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre (*Vitis* spp.) E-200 12 % (v/v); C: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre TN-4 12 % (v/v); D: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre P-178 12 % (v/v); E: extracto de cítricos 8 % (v/v); F: resveratrol 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; G: cyprodinil + fludioxonil 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Figure 2. Development of *Botrytis cinerea* in oat-agar 8 days after inoculation at  $26\pm 2$  °C A: absolute tester; B: extract of leaves of the wild grapevine accession E-200 12 % (v/v) (*Vitis* spp.); C: extract of leaves of the wild grapevine accession TN-4 12 % (v/v); D: extract of leaves of the wild grapevine accession P-178 12 % (v/v); E: citrus extract 8 % (v/v); F: resveratrol 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; G: cyprodinil + fludioxonil 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

que la aplicación de ácido gálico a un sistema *in vitro* implicó menor desarrollo de *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). Así, la mayor ICM, IE e IGC de EHVS P-178 12 % en comparación al resto de los EHVS puede estar relacionada tanto por la presencia, determinada y potencial, de más compuestos fenólicos, como por la mayor concentración de los mismos en relación a TN-4 y E-200. La elucidación completa de los polifenoles presentes en los EHVS

be related both to the real and potential presence of more phenolic compounds and to a higher concentration of phenolic compounds compared to TN-4 and E-200. Identifying all the polyphenols present in the EHVS and each compound's particular antifungal activity is a subject for further scientific study.

While the ICM, IE and IGC of P-178 12 % were lower than those of SW and RVS, the antifungal

y la actividad antifúngica particular de cada compuesto es una actividad científica a desarrollar.

Si bien la ICM, IE e IGC por P-178 12 % fue inferior a lo observado con SW y RVS, la actividad antifúngica de este extracto es importante por ser superior a 70 % para ICM e IE y superior a 60 % de IGC. En este sentido, la ICM es similar a la reportada por El- Kateeb *et al.* (2013) con extractos metanólicos al 0.4 % de hojas de *V. vinifera* 'Thompson seedless' y 'Flame seedless' (entre 63 y 72 %). Particularmente, el modo de acción de los polifenoles contra *B. cinerea* no ha sido totalmente explicado, pero se ha sugerido que actúan sobre la membrana citoplasmática, produciendo cambios en su permeabilidad, ocasionando liberación del contenido celular, coagulación del material citoplasmático y desorganización de organelos y membrana celular, todo ello inhibe el desarrollo del micelio y evita su esporulación (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha indicado que polifenoles del tipo ácido 3b-hydroxy-kaurenoico están involucrados con reducción en la germinación de *B. cinerea* (Cotoras *et al.*, 2011).

La concentración de RVS en el MCAvA con EHVS P-178, a cualquier dosis, fue superior a la obtenida con la adición de cualquiera de los tratamientos con RVS grado reactivo, pero el efecto antifúngico de los EHVS fue menor. Estos resultados pueden deberse a lo reportado por Guerrero *et al.* (2010), indicando que entre los compuestos fenólicos presentes en un extracto vegetal existen interacciones sinérgicas y/o antagónicas, las cuales pueden modificar su efecto antifúngico. A pesar del menor control *in vitro* de *B. cinerea* con EHVS en relación a SW, RVS grado reactivo e incluso otros extractos vegetales reportados en la literatura i.e. extractos de *Citrus paradisi* (Xu *et al.*, 2007); este trabajo indica el potencial de los EHVS de México como reductores de la dispersión e infección efectiva de *B. cinerea*, hongo causante de graves pérdidas económicas en diversos cultivos (Piesik *et al.*,

activity of this extract is important because it is higher than 70 % for ICM and IE, and higher than 60 % for IGC. In this sense, the ICM is similar to the ICM reported by El- Kateeb *et al.* (2013) using 0.4 % methanolic extracts of leaves of *V. vinifera* 'Thompson seedless' and 'Flame seedless' (63 to 72 %). In particular, the action mode of polyphenols against *B. cinerea* has not been fully explained, but it has been suggested that they act upon the cytoplasmic membrane and change its permeability causing the cell content to be released, the cytoplasmic material to coagulate and the organelles and cell membrane to become disorganized. All this inhibits the development of mycelium and prevents sporulation (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015). It has been suggested that polyphenols of the type 3b-hydroxy-kaurenoic acid are involved in the reduction of *B. cinerea* spores germination (Cotoras *et al.*, 2011).

The concentration of RVS in MCAvA with EHVS P-178, at any dose, was higher than that obtained by adding any of the treatments with reactive grade RVS, but the antifungal effect of the EHVS was lower. These results may be due to results reported by Guerrero *et al.* (2010) who suggest that among the phenolic compounds present in a plant extract there are synergistic and/or antagonistic interactions that may modify their antifungal effect. In spite of the lower control *in vitro* of *B. cinerea* with EHVS in relation to SW, reactive grade RVS and other plant extracts reported in literature, i.e., extracts of *Citrus paradisi* (Xu *et al.*, 2007), this study indicates the potential of Mexican EHVS as reducers of the effective spread and infection of *B. cinerea*, a fungus that causes serious economic losses in different crops (Piesik *et al.*, 2005). The widespread presence of wild grapevine in Mexico and its low cost are other factors that also contribute to the interest in fully identifying the phenols present in EHVS and their particular effect on the studied fungus.

2005). La amplia presencia de la vid silvestre en México y su bajo costo de adquisición son factores que también contribuyen al interés de identificar completamente a los polifenoles presentes en los EHVS y su efecto particular contra el hongo en estudio.

## CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de hojas tres accesiones de vid silvestre (*Vitis* spp.) mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra *B. cinerea*; particularmente, el extracto de hojas de la accesión P-178 12 % inhibió 70 % el crecimiento micelial, 75 % la esporulación y 61 % la germinación de esporas, siempre en relación al testigo absoluto. Se detectó resveratrol, ácido gálico y ácido ferúlico en los extractos de dicha accesión y se sugiere la participación de estos fenoles contra *Botrytis cinerea*. Resveratrol grado reactivo produjo mejor control del hongo que los extractos de hoja de vid silvestre; generalmente, cualquier dosis de ambos, extracto de hoja de vid silvestre y resveratrol grado reactivo, no superaron la actividad antifúngica de cyprodinil + fludioxonil.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por el financiamiento de los estudios de postgrado de Isela Apolonio-Rodríguez y al ICAMEX por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental.

## LITERATURA CITADA

Adrian M and Jeandet P. 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83:1345-1350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.004>

## CONCLUSIONS

The methanolic extracts of leaves of three wild grapevine (*Vitis* spp.) accessions showed *in vitro* antifungal activity against *B. cinerea*; in particular, the extract of leaves of accession P-178 12 % inhibited mycelial growth by 70 %, sporulation by 75 % and spore germination by 61 %, always compared to the absolute tester. Resveratrol, gallic acid and ferulic acid were detected in the extracts of accession P-178 12 %, which suggests the participation of these phenols against *Botrytis cinerea*. Reactive grade resveratrol showed better control of the fungus than the extracts of wild grapevine leaves. In general, both wild grapevine leaves and reactive grade resveratrol at any dose did not exceed the fungal activity of cyprodinil + fludioxonil.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, for funding Isela Apolonio Rodríguez' postgraduate studies, and ICAMEX for supporting and facilitating our experimental work.

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

- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL and Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:265-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Ed. Minnesota US: Burgess Publishing Company, New York. 241 p.
- Caruso F, Mendoza L, Castro P, Cotoras M, Aguirre M, Matsuhiro B, Isaacs M, Rossi M, Viglianti A and Antonioletti R. 2011. Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis* is improved using 2-furyl derivatives PLOS ONE 6:e25421. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0025421>
- Compean KL and Ynalvez RA. 2014. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 8:204-213. <http://dx.doi.org/10.3923/jrmp.2014.204.213>

- Cotoras M, Mendoza L, Muñoz A, Yáñez K, Castro P and Aguirre M. 2011. Fungitoxicity against *Botrytis cinerea* of a flavonoid isolated from *Pseudognaphalium robustum*. *Molecules* 16:3885-3895. <http://dx.doi.org/doi:10.3390/molecules16053885>
- Crous PW, Braun U and Groenewald JZ. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58:1-32. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Cruz, C. 2007. Las uvas (*Vitis*) silvestres: Distribución y usos en la región central de Veracruz, pp. 225-235. En: Nieto AR (Ed.): Frutales nativos, un recurso filogenético de México. Ed. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Ellis MB. 1971. More dematiaceous hyphomycetes. Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 608 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01989814>
- El-Khateeb AY, Elsherbiny EA, Tadros LK, Ali SM and Hamed HB. 2013. Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the mycelial growth of fungal plant pathogens. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4:1-6. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000199>
- Enríquez-Guevara EA, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro, I y Martínez-Téllez MA. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 144-155. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a7.pdf>
- Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Beasley ED, Fall LA and Brannen PM. 2013. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a blackberry field in Georgia. *Plant Disease* 98:848. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1020-PDN>
- Franco MO, Cruz CJG, González HA y Pérez LDJ. 2012. Distribución y caracterización. En: Franco MO, Cruz CJG. (Eds.): La vid silvestre en México. Actualidades y potencial, pp. 42-67. México: Universidad Autónoma del Estado de México-Altres-Costa Amic Editores. [https://www.researchgate.net/publication/262014593\\_La\\_vid\\_silvestre\\_en\\_Mexico\\_Actualidades\\_y\\_potencial](https://www.researchgate.net/publication/262014593_La_vid_silvestre_en_Mexico_Actualidades_y_potencial)
- Guerrero RF, Puertas B, Fernández MI, Palma M and Cantos-Villar E. 2010. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science Emerging Technology* 11:231-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.005>
- Katalinić V, Generalić I, Skroza D, Ljubenković I, Teskera A, Konta I and Boban M. 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1:7-15. <https://www.researchgate.net/publication/44201407>
- Lorrain B, Ky I, Pechamat L and Teissedre PL. 2013. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* 18:1076-1100. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18011076>
- Mendoza L, Yáñez K, Vivanco M, Melo R and Cotoras M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>
- Minova S, Seđična R, Voitkāne S, Metla Z, Daugavietis M and Jankeviča L. 2015. Impact of pine (*Pinus sylvestris* L.) and (*Picea abies* (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences* 69: 62-67. <http://dx.doi.org/10.1515/prolas-2015-0008>
- Mora VHF, Franco-Mora OF, López-Sandoval JA, Pérez-López DJ y Balbuena-Melgarejo A. 2009. Characterization of wild plum (*Ximenia americana* L. var. americana; Olacaceae) fruit growing at Tepexi de Rodríguez, Puebla, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:719-727. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-009-9422-6>
- Moo-Koh FA, Alejo CJ, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez J M, Sandoval-Luna R y Ramírez-Pool JA. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48:833-845. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/nov-dic/art-6.pdf>
- Panebianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Polizzi G, Walters DR and Vitale A. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection* 77:65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.010>
- Piesik D, Miler N, Lemańczyk G, Bocianowski J and Buszewski B. 2015. *Botrytis cinerea* infection in three cultivars of chrysanthemum in 'Alchemist' and its mutants: Volatile induction of pathogen-infected plants. *Scientia Horticulturae* 193:127-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.040>
- Salgado M, Rodríguez-Rojo S, Alves-Santos FM and Cocero MJ. 2015. Encapsulation of resveratrol on lecithin and  $\beta$ -glucans to enhance its action against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Engineering* 165:13-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.002>
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT software: Version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis P. H, Wolfender JL and Gindro K. 2013. *Vitis vinifera* Canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5459-5467. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4010252>
- Soylu EM, Kurt Ş and Soylu S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143:183-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Tobar-Reyes JR, Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2009. Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 41: 127-37. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010)
- Tobar-Reyes JR, Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2011. Fenoles de interés farmacológico en vides silvestres (*Vitis* spp.) de México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10:167-172. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617384011](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617384011)
- Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G, Gómez M, Pena-Vera R and Montenegro G. 2012. Antifungal activity of tree

- Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. Botanical Sciences 90:179-183. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.482>
- Wu CF, Yang JY, Wang F and Wang X. 2013. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. Chinese Journal of Natural Medicines 11:1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60001-1)
- Xu W-T, Huang K-L, Guo F, Qu W, Yang JJ, Liang Z-H and Luo YB. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology 46:86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>
- Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G and Jones KC. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. Science of the Total Environment 511:123-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>

# Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides

## Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin

David Espinoza-Altamirano, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56235 Tel. 5959521500; Hilda Victoria Silva-Rojas, Producción de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56230 Tel. 5959520265; Santos Gerardo Leyva-Mir, Nahum Marbán-Mendoza, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56235 Tel. 5959521608; Ángel Rebollar-Alviter\*. Centro Regional Morelia, y Posgrado en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. Periférico Paseo de la República No. 1000, Morelia, Michoacán, México. CP 58170 Tel. 4433161489. \*Autor para correspondencia: rebollaralviter@gmail.com.

Recibido: 11 de diciembre, 2016.

Aceptado: 17 de enero, 2017.

Espinoza-Altamirano D, Silva-Rojas HV, Leyva-Mir SG, Marbán-Mendoza N, Rebollar-Alviter A. 2017. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 186-203.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-4

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin, basada en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Se evaluaron 60 aislados monoconidiales de dos regiones productoras de fresa del estado de Michoacán, en medio de cultivo enmendado con

**Abstract.** The objective of this study was to determine the sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to the fungicides thiophanate-methyl and azoxystrobin, based on mycelial growth and conidia germination. Sixty monoconidial isolates from two strawberry-producing regions of Michoacan state were evaluated in culture medium amended with fungicides at 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10, 100 and 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The effective dose that reduced mycelial growth by 50 % ( $\text{ED}_{50}$ ) of thiophanate-methyl varied from 0.28 to 9.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío Valley and from 1.39 to 2.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the Zamora Valley. In conidia, the  $\text{ED}_{50}$  ranged from 0.9 to 396.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío Valley and from 0.43 to 63.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the Zamora Valley. For azoxystrobin the  $\text{ED}_{50}$  in mycelium ranged from 0.04 to 0.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in Maravatío and from 0.07 to 0.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in Zamora. In the



0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10, 100 y 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fungicidas. La dosis efectiva que redujo en un 50% el crecimiento micelial ( $\text{DE}_{50}$ ) del metil tiofanato varió de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el valle de Maravatío y de 1.39 a 2.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el valle de Zamora. En conidios la  $\text{DE}_{50}$  varió entre 0.9 a 396.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el valle de Zamora. Para el azoxystrobin las  $\text{DE}_{50}$  en micelio variaron de 0.04 a 0.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en Maravatío y de 0.07 a 0.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en Zamora. En conidios las  $\text{DE}_{50}$  variaron de 0.01 a 0.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Maravatío y 0.006 a 0.15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en Zamora. Las distribuciones de las  $\text{DE}_{50}$  indicaron que los aislados de *C. acutatum* fueron sensibles al azoxystrobin y moderadamente resistentes al metil tiofanato.

**Palabras clave:** Benzimidazoles, QoI, Resistencia a fungicidas

En México, la superficie cultivada de fresa (*Fragaria* × *ananassa*) supera las 10,000 ha. De esta superficie, cerca del 60 % se encuentra en el estado de Michoacán (SIAP, 2016). Entre los factores fitopatológicos que más impactan en la producción de fresa, se encuentra la antracnosis del fruto, la cual se ha asociado principalmente a la especie *Colletotrichum acutatum* (Turecheck *et al.*, 2006) especialmente en los sistemas de producción en campo abierto y de nivel tecnológico medio a bajo y en las áreas del cultivo expuesta a la lluvia en los sistemas protegidos, en la cual se favorece la dispersión de conidios por salpique a partir de fuentes de infección primaria y de planta a planta (Smith, 2008).

El manejo de la enfermedad, se basa principalmente en el establecimiento de plantas libres del patógeno (Smith, 2008; Freeman, 2008), la eliminación de plantas y frutos con síntomas, residuos

conidia the  $\text{ED}_{50}$  varied from 0.01 to 0.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for Maravatío and 0.006 to 0.15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in Zamora. The  $\text{ED}_{50}$  distributions indicated that *C. acutatum* isolates were sensitive to azoxystrobin and moderately resistant to methyl thiophanate.

**Key words:** Benzimidazole, QoI, fungicide resistance

In Mexico, the area planted to strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) accounts for more than 10,000 hectares, nearly 60 % of which is located in the state of Michoacán (SIAP, 2016). Among the phytopathological factors that mostly affect strawberry production is anthracnose. This disease has been associated mainly with the species *Colletotrichum acutatum* (Turecheck *et al.*, 2006), especially in farm systems where the crop is grown in open fields with a low to medium level of technology, or in protected systems where the crop is exposed to rain. This condition favors the spread of conidia by splashing from primary infection sources and from plant to plant (Smith, 2008).

The disease management is based mainly on establishing pathogen-free plants (Smith, 2008; Freeman, 2008), elimination of symptomatic plants and fruits and removing crop residues and alternate hosts (Freeman, 2008; Parikka and Lemmetty, 2009). Resistant varieties and biological control have also been used (Wharton and Diéguez-Uribeondo, 2004; Hammerschlag *et al.*, 2006). Although preventive fungicides, such as Captan, Thiram, and different copper-based formulations, are the most frequently used, and other fungicides with specific mode of action, such as cyprodinil+fludioxonil, pyraclostrobin, azoxystrobin and thiophanate methyl, are often used as well (Turechek *et al.*, 2006; Wedge *et al.*, 2007). The specific mode of action of these fungicides and

de plantas y remoción de hospedantes alternos (Freeman, 2008; Parikka y Lemmetty, 2009), variedades resistentes y control biológico (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004; Hammerschlag *et al.*, 2006). Aunque entre los fungicidas usados con frecuencia se encuentran los de efecto preventivo como captan, thiram y diferentes formulaciones a base de cobre, aquellos de modo de acción específica se aplican con frecuencia para el manejo de esta enfermedad, entre ellos el ciprodinil+fludioxonil, pyraclostrobin, azoxystrobin y metil tiofanato (Turcek *et al.*, 2006; Wedge *et al.*, 2007). El modo de acción específica y el uso frecuente de estos fungicida implican riesgo para el desarrollo de resistencia en los hongos por lo que deben ser utilizados bajo ciertos principios para un manejo efectivo de la resistencia como son la dosis correcta, número de aplicaciones, mezclas del modo de acción, alternaciones y los tiempos o momentos de aplicación (van den Bosh *et al.*, 2014). Al respecto, es esencial el monitoreo frecuente de la sensibilidad de las poblaciones de hongos y oomycetes en diferentes zonas a nivel regional o nacional a fin de determinar posibles cambios en la distribución de la sensibilidad originados por diferentes mecanismos y en su caso, tomar las medidas correspondientes para retardar, posponer o evitar el desarrollo de resistencia que resulte en pérdidas significativas en los cultivos por la reducción en la vida efectiva del fungicida (van den Bosh *et al.*, 2014; Corio-Costet, 2015), enfoque que debe formar parte de una estrategia de manejo integrado de enfermedades (Hollomon, 2015).

Al ser *C. acutatum* uno de los agentes causales de antracnosis en varios cultivos y en especial en cítricos y fresa, conocer la sensibilidad a los fungicidas de mayor uso, permiten una mejor toma de decisiones en el diseño de estrategias de manejo integrado de la enfermedad. En cítricos Mondal *et al.* (2005) reportaron líneas base (previo al uso de

their frequent use pose a risk because they cause the pathogen to develop resistance. Therefore, they must be utilized following certain guidelines for effectively managing resistance (the correct dose, number of applications, mixing fungicides that have a different mode of action, alternation and application timing) (van den Bosh *et al.*, 2014). It is also essential to frequently monitor the sensitivity of fungal and oomycete populations in different areas at the regional or national level so as to detect changes in the distribution of sensitivity caused by different mechanisms. If necessary, implement appropriate measures to delay, postpone or prevent the development of resistance, which could cause significant crop losses due to the reduction of the fungicides' effective life (van den Bosh *et al.*, 2014; Corio-Costet, 2015). This approach must be included in all integrated disease management strategies (Hollomon, 2015).

Given that *C. acutatum* is one of the causal agents of anthracnose in several crops, and especially in citrus and strawberry, knowing their sensitivity to the most frequently used fungicides would allow us to make better decisions when formulating integrated disease management strategies. In the case of citrus, Mondal *et al.* (2005) reported base lines (before fungicide use) with  $DE_{50}$  between 0.09-0.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and 0.01 a 0.034  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for azoxystrobin and pyraclostrobin, respectively. On the other hand, Forcelini *et al.* (2016) evaluated the resistance of *C. acutatum* isolates to strobilurin fungicides or QoI (quinone outside inhibitors) on strawberry crops in Florida, based on mycelial growth and germ tube length.  $DE_{50}$  values for azoxystrobin were 0.22  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in isolates collected from 1994 to 2011; for pyraclostrobin, the average  $DE_{50}$  was 0.012  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Isolates obtained later from sites that had a history of use of these fungicides showed no sensitivity with values higher than 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$  for pyraclostrobin

los fungicidas) con  $DE_{50}$  entre 0.09 a 0.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0.01 a 0.034  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para azoxystrobin y pyraclostrobin respectivamente. Por otro lado, Forcelini *et al.* (2016) evaluó la resistencia de aislados de *C. acutatum* a fungicidas estrobilurinas o QoI (Inhibidores Externos de la Quinona) en el cultivo de fresa en Florida con base en crecimiento micelial y la longitud del tubo germinativo. Los valores de las  $DE_{50}$  para azoxystrobin resultaron en 0.22  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en aislados colectados de 1994 al 2011, mientras que para el pyraclostrobin la  $DE_{50}$  media resultó en 0.012  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Aislados obtenidos posteriormente con historial de uso de estos fungicidas mostraron insensibilidad con valores superiores a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para pyraclostrobin y azoxystrobin respectivamente. La secuenciación de gen del citocromo *b* confirmó que los aislados resistentes tuvieron las mutaciones G143A y F129L.

El grupo de fungicidas benzimidazoles, entre ellos en benomil, tiabendazol, carbendazim y metil tiofanato, son ampliamente usados en el cultivo de fresa en México desde hace más de 3 décadas. Asimismo, el grupo de las estrobilurinas, está en el mercado desde mediados de los años 90 y se encuentran registrados para su uso en este cultivo en México, por lo que el uso frecuente de estos ingredientes activos, podría resultar en falta de eficacia en campo. El objetivo de esta investigación fue determinar la sensibilidad de aislados de *C. acutatum*, obtenidos de fresa de los Valles de Maravatío y de Zamora en el estado de Michoacán, al metil tiofanato y al azoxystrobin con base en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Conocer el estado de la sensibilidad de *C. acutatum*, causante de la antracnosis de la fresa en dos de las principales zonas productoras de fresa en México permitirá ajustar los programas de manejo de la resistencia para posponer, retardar o evitar el desarrollo de este fenómeno y contribuir a un manejo más eficiente de la enfermedad.

and azoxystrobin, respectively. Sequencing of the cytochrome *b* gene confirmed that the resistant isolates had the G143A and F129L mutations.

Benzimidazole fungicides (benomyl, thiabendazole, carbendazim and thiophanate methyl, among others) have been widely used on strawberry crops in Mexico for over three decades. Furthermore, QoI (strobilurin) fungicides have been on the market since the mid-90s; in Mexico, their use on strawberry has been approved. However, the frequent use of these active ingredients may result in the lack of effectiveness in the field. The objective of this study was to determine the sensitivity of *C. acutatum* isolates obtained from strawberries collected in the Maravatío and Zamora valleys, state of Michoacán, to thiophanate methyl and azoxystrobin, based on mycelial growth and conidia germination. By knowing the sensitivity status of *C. acutatum*, which causes strawberry anthracnose in the two main strawberry producing areas of Mexico, we will be able to adjust resistance management programs to postpone, delay or prevent this phenomenon from developing and thus contribute to more effective disease management.

## MATERIALS AND METHODS

### Collecting and obtaining isolates

In 2009-2011, leaves, stolons and strawberries showing typical anthracnose symptoms were collected in commercial plots of Festival, Albión and Camino Real strawberry varieties in the Maravatío and Zamora valleys. To capture greater variability in the samples, they were taken from plots separated by a distance of 1 to 3 km, approximately.

The sensitivity test was conducted at the Phytopathology Laboratory of the Centro Regional

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y obtención de aislados

En la temporada 2009 al 2011 se colectaron hojas, estolones y frutos con síntomas típicos de antracnosis en parcelas comerciales de fresa de las variedades Festival, Albión y Camino Real en los Valles de Maravatío y Zamora. A fin de capturar una mayor variabilidad en las muestras, se consideraron parcelas con una separación entre 1 a 3 km aproximadamente.

El ensayo de sensibilidad se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Universitario Centro-Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia, Michoacán y la identificación molecular del patógeno se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP) del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

### Obtención de aislados monoconidiales

De los frutos, hojas o estolones con síntomas, se seleccionaron porciones de tejido de aproximadamente 2 cm del área del área de avance del síntoma, se lavaron con agua, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 2 a 3 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente se secaron en una cámara de flujo laminar y se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA). A partir de los cultivos madre se obtuvieron cultivos monoconidiales mediante diluciones seriadas, los conidios se colocaron en agua-agar (AA) al 2 % y se incubaron por 10 a 18 h a temperatura del laboratorio. Posteriormente con una aguja de disección se extrajeron conidios individuales germinados y

Universitario Centro-Occidente (CRUCO), Universidad Autónoma de Chapingo, in Morelia, Michoacán, and the pathogen's molecular identification was performed at the Laboratory of Biotechnology and Seed Pathology for Postgraduate Students in Genetic Resources and Productivity (PREGEP), Colegio de Postgraduados, in Montecillo, State of Mexico.

### Obtaining monoconidial isolates

From strawberries, leaves and stolons showing symptoms, portions of tissue approximately 2 cm were selected from the area showing symptoms, washed with water, disinfected with a 1 % sodium hypochlorite solution for 2-3 minutes, and rinsed with sterile distilled water. They were then dried in a laminar flow cabinet and grown on potato-dextrose-agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA). From the stock cultures, monoconidial cultures were prepared using serial dilutions; the conidia were placed on 2 % water agar (WA) and incubated for 10-18 hours at room temperature. Later, using a dissection needle, the germinated conidia were extracted one by one and placed in Petri dishes containing PDA. The monosporic isolates (Table 1) were stored at 4° C and later used in fungicide sensitivity tests.

### Molecular identification

Monoconidial isolates from the Maravatío (8 isolates) and Zamora (11 isolates) valleys were selected. DNA extraction was carried out following the protocol of Doyle and Doyle (1990) with minor modifications. Later, through PCR, the ITS1, 5.8S and ITS2 regions of the ribosomal DNA were amplified using ITS5/ITS4 primers (White *et al.*, 1990) in a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-

se pasaron a cajas de Petri con medio PDA. Estos aislados monospóricos (Cuadro 1) se almacenaron a 4 °C y fueron posteriormente usados en las pruebas de sensibilidad a fungicidas.

### Identificación molecular

Para cada zona de muestreo, se seleccionaron 8 aislados monoconidiales del valle de Maravatío y 11 del valle de Zamora. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo de Doyle y Doyle

Rad, USA) as follows: initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles at 95° for 2 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 2 min. Later, the PCR products were cleaned using a QIAquick purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed in Macrogen, Maryland, USA; then the sequences were edited in Bioedit Sequence Alignment Editor v.7.0.5 (Hall, 1999), and consensus sequences were generated. The

**Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum acutatum* de acuerdo al cultivar, estructura y origen de colecta en campos de fresa durante 2009-2010.**

**Table 1. *Colletotrichum acutatum* isolates according to cultivar, structure and location where strawberries were collected in 2009-2010.**

| Aislado | Origen    | Órgano  | Variiedad | Aislado | Origen | Órgano | Variiedad |
|---------|-----------|---------|-----------|---------|--------|--------|-----------|
| Ms38    | Maravatío | Estolón | Albion    | Ms41    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms39    | Maravatío | Estolón | Albion    | Ms44    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms40    | Maravatío | Estolón | Albion    | Ms45    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms1     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms46    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms2     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms47    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms3     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms48    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms36    | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms49    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms15    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms51    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms34    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms53    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms30    | Maravatío | Estolón | Camino R  | Ms54    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms31    | Maravatío | Estolón | Camino R  | Ms55    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms32    | Maravatío | Estolón | Camino R  | Ms57    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms33    | Maravatío | Estolón | Camino R  | Ms58    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms6     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms59    | Zamora | Fruto  | Tioga     |
| Ms7     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms60    | Zamora | Fruto  | Tioga     |
| Ms9     | Maravatío | Fruto   | Albion    | Ms61    | Zamora | Fruto  | Tioga     |
| Ms11    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms63    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms12    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms64    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms13    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms65    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms14    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms66    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms16    | Maravatío | Fruto   | Camino R  | Ms67    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms18    | Maravatío | Fruto   | Camino R  | Ms70    | Zamora | Fruto  | Camino R  |
| Ms28    | Maravatío | Fruto   | Camino R  | Ms71    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms20    | Maravatío | Hoja    | Albion    | Ms72    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms21    | Maravatío | Hoja    | Albion    | Ms73    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms22    | Maravatío | Hoja    | Albion    | Ms74    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms23    | Maravatío | Hoja    | Albion    | Ms75    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms25    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms76    | Zamora | Fruto  | Festival  |
| Ms26    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms77    | Zamora | Fruto  | Albion    |
| Ms27    | Maravatío | Fruto   | Festival  | Ms79    | Zamora | Fruto  | Albion    |

(1990) con ligeras modificaciones. Posteriormente por PCR se realizó la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2 del DNA ribosomal con los iniciadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos con 95° por 2 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 2 min. Posteriormente, se realizó la limpieza de los productos de PCR con el kit de purificación QIAquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en Macrogen, (Maryland, USA). Las secuencias se editaron mediante el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v.7.0.5 (Hall, 1999) y se crearon secuencias consenso. Estas secuencias se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa BLASTNucleotide (Zhang *et al.*, 2000) considerando el valor más alto de las comparaciones realizadas.

### **Aplicación de Fungicidas**

Para los estudios, se usaron formulaciones comerciales de metil tiofanato del grupo químico benzimidazoles (Cercobin M<sup>®</sup>, BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco), a una concentración de 70 % y el azoxystrobin de grupo químico inhibidores externos de la quinona (QoI), Amistar<sup>®</sup> a una concentración del 50 % de ingrediente activo (Syngenta Agro S.A de C.V. México, D.F.).

### **Preparación de soluciones madre y medio de cultivo enmendado**

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas, con base en el ingrediente activo

sequences were then compared with the sequences stored in the Genbank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTNucleotide (Zhang *et al.*, 2000) program; we took into consideration the highest value resulting from the comparisons.

### **Fungicide application**

Commercial formulations of thiophanate methyl from the benzimidazole group (Cercobin M<sup>®</sup>, BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco) at 70 % concentration were used in the tests, as well as azoxystrobin, which belongs to the group of quinone outside inhibitors (QoI) (Amistar<sup>®</sup>), at 50 % concentration of the active ingredient (Syngenta Agro S.A de C.V. México, D.F.).

### **Stock solutions and amended culture medium preparation**

Stock solutions of each fungicide were prepared by mixing the active ingredient with sterile distilled water. Using the concentrated solution, 1:10 serial dilutions were prepared to logarithmically obtain the desired concentrations. The solution containing the corresponding fungicide concentration was added to the medium when it cooled to 50-60 °C, constantly stirring to ensure uniform homogenization, and immediately placed in 15 mL Petri dishes.

### **Mycelial growth test**

Six doses of each fungicide were evaluated: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 µg mL<sup>-1</sup> of azoxystrobin, and 2000, 1000, 100, 10, 1 and 0.1 µg mL<sup>-1</sup> of methyl thiophanate, plus an absolute tester to which no fungicide was added. From the margins of 6-day old active colonies of each of

en agua destilada estéril. A partir de esta solución concentrada se hicieron diluciones seriales 1:10 para obtener las concentraciones deseadas en forma logarítmica. La solución con la concentración correspondiente de fungicida se adicionó al medio cuando este se enfrió a una temperatura entre 50 y 60 °C, agitando constantemente para un buen homogenizado y se vació inmediatamente en cajas de Petri, con un volumen de 15 mL.

### Ensayo de crecimiento micelial

Se evaluaron 6 dosis de cada fungicida: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para azoxystrobin y 2000, 1000, 100, 10, 1 y 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para metil tiofanato, más un testigo absoluto al que no se le agregó fungicida. Del margen de colonias activas de 6 días de crecimiento de cada uno de los aislados monoconidiales se obtuvieron discos de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas de Petri de 90 x 15 mm con medio de cultivo adicionado con el fungicida. Se realizaron 3 repeticiones (cajas de Petri) de cada dosis. Las cajas se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente (20±4 °C) por 5 días. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de las colonias en dos direcciones en forma perpendicular y se obtuvo el promedio.

### Ensayo de germinación de conidios

Se evaluaron las mismas 6 dosis de cada fungicida, más un testigo al que no se le agregó fungicida. Se consideraron tres repeticiones para cada dosis (cajas de Petri de 50 x 15 mm). Se prepararon suspensiones monoconidiales a una concentración de  $10^3$  a  $10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Estas suspensiones se sembraron en medio de cultivo AA al 2 % adicionado con fungicida, solo como superficie de germinación, preparado de la misma forma que en la fase de inhibición de crecimiento micelial. Se cuantificó

the monoconidial isolates, we obtained disks 0.5 cm in diameter, which were placed in the middle of 90 x 15 mm Petri dishes containing culture medium to which the fungicide had been added. Three replications (Petri dishes) of each dose were prepared. The dishes were incubated in darkness at room temperature (20±4 °C) for five days. After this period, the diameters of the colonies were measured perpendicularly in two directions to obtain the average.

### Conidia germination test

The same six doses of each fungicide were evaluated, plus a tester to which no fungicide was added. Three replications of each dose (50x15 mm Petri dishes) were used. Monoconidial suspensions were prepared at concentrations of  $10^3$  to  $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The suspensions were grown in 2 % WA culture medium to which fungicide had been added, only as a germination surface, prepared in the same way as in the mycelial growth inhibition stage. Six hours after being sown, the number of germinated and non-germinated conidia in each replication of a 100-conidia random sample were counted. A conidium was considered germinated when the length of its germ tube was 2 times greater than the diameter of the conidium.

### Estimation of effective doses 50 ( $\text{ED}_{50}$ ) and data analysis

Based on the two measurements of the diameter of the colony during the mycelial growth tests, we obtained the average, and after the three replications (Petri dishes) —which were used to calculate growth or germination compared to the control per each fungicide dose and isolate, we adjusted the model and estimated the  $\text{ED}_{50}$  using the log- Logistic model with upper asymptote using the

el número de conidios germinados y no germinados en cada una de las repeticiones de una muestra al azar de 100 conidios, 6 horas después de la siembra. Un conidio, se consideró germinado, si la longitud del tubo germinativo fue 2 veces mayor al diámetro del conidio.

### Estimación de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) y análisis de datos

De las 2 mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial se obtuvo el promedio, y después de las 3 repeticiones (cajas de Petri), la cual se usó para calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada dosis de fungicida y por cada aislamiento y se procedió al ajuste del modelo y estimación de las DE<sub>50</sub> usando para ello el modelo log-logístico con asíntota superior con el procedimiento NLMIXED de SAS (Statistical Analysis System versión 9.3). El modelo se expresa como:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \text{Exp}\left(\beta \log\left(\frac{\text{Dosis}}{\text{DE}_{50}}\right)\right)}$$

Donde  $y$  es el crecimiento relativo de micelio o la germinación relativa de conidios,  $\alpha$  la asíntota superior (máximo valor posible de  $y$ ),  $\beta$  es la pendiente en el punto de inflexión y DE<sub>50</sub> es la dosis a la cual el crecimiento/germinación es reducido en 50 % (Schabenberguer y Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Debido a que no todos los valores de inicio resultaron en la convergencia para todos los aislados, se exploraron diferentes conjuntos de valores al inicio de las iteraciones a fin de alcanzar convergencia. El ajuste del modelo se comprobó considerando el patrón de residuales para cada uno de los aislados (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Una

NLMIXED procedure of SAS (Statistical Analysis System version 9.3). The model is expressed as follows:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \text{Exp}\left(\beta \log\left(\frac{\text{Dose}}{\text{ED}_{50}}\right)\right)}$$

Where  $y$  denotes relative mycelial growth or relative conidial germination,  $\alpha$  is the upper asymptote (maximum  $y$  value possible),  $\beta$  the slope at the inflection point, and ED<sub>50</sub> the dose at which growth/germination is reduced by 50% (Schabenberguer and Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Given that not all the initial values resulted in convergence for all the isolates, different sets of values were explored at the beginning of the iterations in order to achieve convergence. The adjustment to the model was confirmed considering the residuals pattern for each isolate (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Once ED<sub>50</sub> was estimated, an exploratory data analysis was conducted, and the sensitivity distributions were illustrated with frequency histograms.

Before estimating the statistical moments, normality tests were conducted on the original data, and the ED<sub>50</sub> values were converted to 10-base logarithms. The estimated moment, the dispersion of basic statistics, the bias or misalignment parameters and the normality tests were conducted using the Proc univariate included in SAS software (version 9.3). Once the general sensitivity distribution of the two strawberry producing areas was explored, the data from each area were individually analyzed to determine significant differences between the distributions in each strawberry producing valley in terms of the sensitivity of *C. acutatum* isolates. This was done because the two production areas may exert



vez que se estimó la  $DE_{50}$  se realizó un análisis exploratorio de los datos, y las distribuciones de la sensibilidad se ilustraron con histogramas de frecuencias.

Previo a la estimación de los momentos estadísticos, se realizaron pruebas de normalidad sobre los datos originales y transformados a logaritmo base 10 los valores de las  $DE_{50}$ . El momento estimado, mediciones de dispersión de estadística básica y parámetros de sesgo o desalineado y pruebas de normalidad se realizaron con el Proc univariate incluido en el software SAS (ver 9.3). Una vez que se exploró la distribución de la sensibilidad general de las 2 zonas productoras de fresa, los datos de cada zona se analizaron por separado, a fin de determinar diferencias significativas entre las distribuciones de cada valle productor de fresa en relación a la sensibilidad de los aislados de *C. acutatum*. Lo anterior, en virtud de que ambas zonas de producción podrían ejercer diferentes niveles de presión de selección al tener niveles tecnológicos contrastantes. Esta comparación se realizó con base en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a fin de probar si las distribuciones provenían de una sola población o de poblaciones diferentes usando el procedimiento NPAR1WAY (SAS ver 9.3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación morfológica y molecular de aislados

Todos los aislados del patógeno asociado a los frutos con síntomas y daños de antracnosis obtenidos de las dos regiones productoras de fresa en Michoacán correspondieron a *Colletotrichum acutatum*. Los aislados, se caracterizaron por la formación de colonias de color blanco, con el centro gris

different levels of selection pressure due to their contrasting technology levels. The comparison was made using the Kolmogorov-Smirnov test and the NPAR1WAY (SAS version 9.3) procedure to determine whether the distributions came from a single population or different populations.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological and molecular identification of isolates

All the pathogen isolates associated with strawberries showing anthracnose symptoms and damage collected in the two strawberry producing areas of Michoacán proved to be *Colletotrichum acutatum*. The isolates were characterized by forming white colonies with dark gray centers and concentric orange circles both at the center and at the edges. The conidia were smooth, unicellular, aseptate, spindle-shaped and measured 10-14 x 4-6 $\mu$ m, and similar to those reported by Damm *et al.* (2012). The sequences obtained by PCR amplification of the region included in the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the rDNA of the 20 isolates were 99 % identical to the AM991131 and AY266405 accessions placed in the NCBI's GenBank.

### $ED_{50}$ estimation

The log-Logistic model properly described the data of the dose-response to the fungicides used in this experiment for each of the isolates used. An example of  $ED_{50}$  estimation in the Ms12 isolate in response to mycelial growth using azoxystrobin is shown in Figure 1. This model has proved to be very useful for estimating  $ED_{50}$  when studying fungicide resistance and for detecting the hormesis

oscuro, destacando la presencia de coloraciones anaranjadas concéntricas tanto en centro como en las márgenes. Los conidios fueron lisos, unicelulares, aseptados, fusiformes y de 10-14 x 4-6µm, similar a los reportados por Damm *et al.* (2012). Las secuencias obtenidas producto de la amplificación por PCR de la región comprendida en el Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA de los 20 aislados tuvieron 99 % de identidad con las accesiones AM991131 y AY266405 depositadas en el GenBank del NCBI.

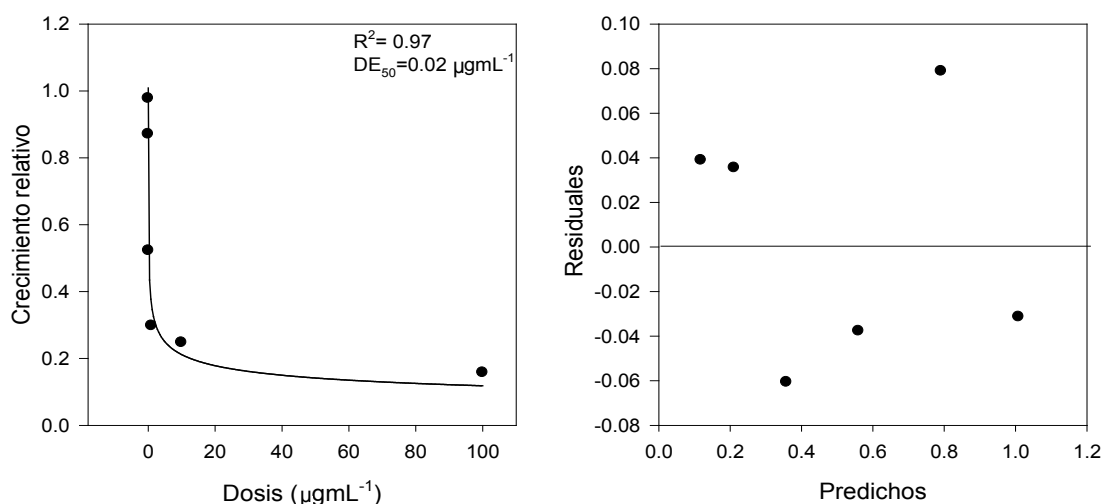
### Estimación de las $DE_{50}$

El modelo log-logístico describió adecuadamente los datos de dosis respuesta a los fungicidas usados en este estudio, para cada uno de los aislados usados. Un ejemplo de la estimación de la  $DE_{50}$  en el aislado Ms12 en respuesta al crecimiento micelial con el fungicida azoxystrobin se muestra en la Figura 1. Este modelo se ha encontrado útil para

phenomenon in these compounds (Schabenberger and Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007; Flores and Garzon, 2013).

### Distribution of the sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl

The sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl at the mycelial stage ranged from one 0.28 to 9.72 µg mL<sup>-1</sup> dose of  $ED_{50}$  with an average dose of 2.39 µg mL<sup>-1</sup> for the Maravatío valley, but it fit a normal distribution when the data were converted to the base-10 logarithm. The distribution of sensitivity in Zamora had a normal distribution and thus no data transformation of any type was required (Figure 2); its values ranged from 1.39 to 2.99 µg mL<sup>-1</sup>, and were similar to the ones obtained for Maravatío. In the case of conidia, their  $ED_{50}$  doses showed a wide distribution ranging from 0.9 to 396.4 µg mL<sup>-1</sup>, with a mean of 20.9 µg mL<sup>-1</sup> for the Maravatío valley; the values for the Zamora



**Figura 1.** Ejemplo del ajuste del modelo Log-Logístico con asíntota superior al crecimiento micelial relativo con el fungicida azoxystrobin en un aislado de *Colletotrichum acutatum* representativo de la zona productora de fresa de Maravatío, Michoacán.

**Figure 1.** Example of the Log-Logistic model adjustment with an asymptote greater than the relative mycelial growth using azoxystrobin in a *Colletotrichum acutatum* isolate representative from the strawberry producing area in Maravatío, Michoacán.

la estimación de  $DE_{50}$  en el estudio de resistencia a fungicidas y la detección del fenómeno de hormesis en estos compuestos (Schabenberger y Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007; Flores y Garzon, 2013).

### Distribución de la sensibilidad de aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato

La sensibilidad de los aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato, en etapa de micelio varió entre una dosis  $DE_{50}$  de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con una mediana de 2.39  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el valle de Maravatío, ajustándose a una distribución normal cuando se realizó la transformación de los datos al logaritmo base 10. Por su parte la distribución de la sensibilidad en Zamora se ajustó a una distribución normal y no requirió del uso de ningún tipo de transformación (Figura 2) con valores que variaron desde 1.39 a 2.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , similar a los obtenidos en Maravatío. En el caso de conidios, las  $DE_{50}$  presentaron una distribución amplia desde 0.9 a 396.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con una mediana de 20.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el Valle de Maravatío, mientras que para el Valle de Zamora se obtuvieron valores más bajos variando desde 0.43 a 63.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con una media 10.9 y una mediana de 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro 2). Al respecto, no hubo diferencias significativas entre las distribuciones de la sensibilidad en ambos valles para el caso de micelio ( $\text{Pr}>\text{Ksa}=0.13$ ), pero sí para el caso de los conidios ( $\text{Pr}>\text{Ksa}=0.0004$ ). Sin embargo, considerando el modo de acción del metil tiofanato, el crecimiento micelial es el proceso que refleja con mayor precisión la sensibilidad de los aislados, ya que el grupo de los benzimidazoles ejerce su acción al unirse a las subunidades de la proteína  $\beta$ -tubulina (*TUB2*), lo cual afecta el ensamble de los microtúbulos y por lo tanto, interfiere con procesos como la mitosis y formación del citoesqueleto que se manifiesta más directamente en la división celular (Ishii, 2012),

valley were lower and ranged from 0.43 to 63.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , with an average of 10.9 and a median of 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Table 2). In this case, there were no significant differences between the sensitivity distribution in both valleys for mycelium ( $\text{Pr}>\text{Ksa}=0.13$ ), but there were significant differences for conidia ( $\text{Pr}>\text{Ksa}=0.0004$ ). However, considering the mode of action of thiophanate methyl, mycelial growth is the process that most precisely reflects the isolates' sensitivity, since benzimidazoles act by joining the subunits of the  $\beta$ -tubulin (*TUB2*) protein, which affects the microtubule assembly, and therefore interferes with processes such as mitosis and cytoskeletal formation. This is directly manifested in cell division (Ishii, 2012); point mutations at this site result in a lack of effectiveness in the field (Ma and Michailidis, 2005).

In studies conducted by Peres *et al.* (2004) using *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* obtained from citrus, the authors found that in the case of benomyl (benzimidazole), *C. acutatum* isolates were moderately resistant, since their growth was inhibited by approximately 55 % at  $DE_{50}=0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  and 80 % at  $DE_{50}=1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The latter isolates showed point mutations in the *TUB2* gene. Chung *et al.* (2006) studied different *Colletotrichum* species and reported that in *C. acutatum* isolates they estimated  $ED_{50}$  between 1 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of thiophanate methyl, indicating that they were more resistant than *C. gloeosporioides*. Kim *et al.* (2007) also reported using  $ED_{50}$  doses between 3.8 and 8.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in *C. acutatum* isolates obtained from chili in concentrations higher than 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , but found no point mutations in the *TUB2* gene. The results of our study show that, based on mycelial growth, the isolates from both strawberry producing areas showed  $ED_{50}$  no higher than 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . For this reason, it may be considered that *C. acutatum* populations have moderate resistance to benzimidazole fungicides such as thiophanate

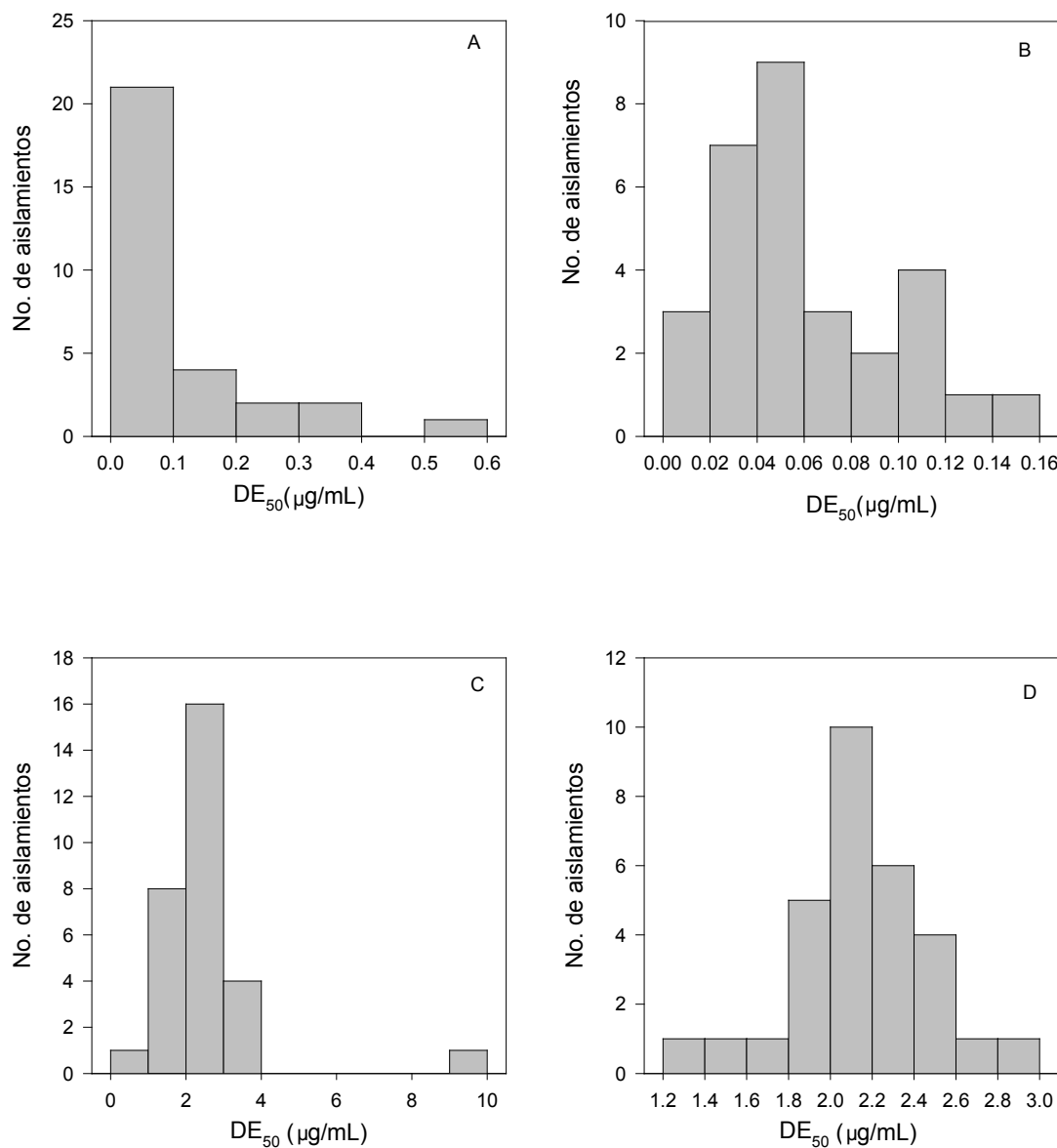


Figura 2. Distribución de la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* al fungicida azoxystrobin para la prueba de germinación de conidios. A= Valle de Maravatío, B= Valle de Zamora. Distribución de la sensibilidad al metil tiofanato (micelio), C= Valle de Maravatío, D= Valle de Zamora.

Figure 2. Sensitivity distribution of *Colletotrichum acutatum* to azoxystrobin fungicide for conidia germination test. A= Maravatío valley; B= Zamora valley. Sensitivity distribution to thiophanate methyl (mycelium), C= Maravatío valley; D= Zamora valley.

mutaciones puntuales en este sitio, resultan en falta de eficacia en campo (Ma y Michailidis, 2005).

Estudios realizado por Peres *et al.* (2004) en *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* obtenidos de cítricos,

methyl, and more likely to benomyl, because of they share the same mode action, as previously shown (Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010). These results suggest the need to implement

**Cuadro 2. Estadística básica y momentos de los valores de  $DE_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para el fungicida metil tiofanato en micelio y conidios de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora, Michoacán.**  
**Table 2. Basic statistics and moments of  $ED_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) values for thiophanate methyl in *Colletotrichum acutatum* mycelium and conidia obtained from strawberries collected in Maravatío and Zamora, Michoacán.**

| Variable | Origen    | Media | DS <sup>a</sup> | Mínimo | Máximo | Mediana | Rango | Skewness | Kurtosis |
|----------|-----------|-------|-----------------|--------|--------|---------|-------|----------|----------|
| Micelio  | Maravatío | 2.46  | 1.52            | 0.28   | 9.72   | 2.39    | 9.42  | 3.78     | 18.36    |
|          | Zamora    | 2.17  | 0.32            | 1.39   | 2.99   | 2.16    | 1.59  | -0.11    | 0.97     |
| Conidios | Maravatío | 50.4  | 84.2            | 0.9    | 396.4  | 20.9    | 395.5 | 3.1      | 10.31    |
|          | Zamora    | 10.94 | 15.17           | 0.43   | 63.75  | 5.0     | 63.32 | 2.28     | 5.21     |

<sup>a</sup>Desviación estándar / Standard deviation.

encontraron que para el caso del benomil (banzimidazol), los aislados de *C. acutatum* fueron moderadamente resistentes, pues el crecimiento de alrededor del 55 % se inhibió a una  $DE_{50} = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y de 80 % a  $DE_{50} = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , estos últimos aislados tuvieron mutaciones de punto en el gen *TUB2*. Chung *et al.* (2006), estudiando diferentes especies de *Colletotrichum* reportaron que en los aislados de *C. acutatum* se estimaron  $DE_{50}$  entre 1 y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metil tiofanato, siendo en general más resistentes que *C. gloeosporioides*. En el mismo sentido, Kim *et al.* (2007) reportaron  $DE_{50}$  entre 3.8 y  $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  en aislados de *C. acutatum* de Chile con concentraciones de más de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pero no encontraron mutaciones puntuales en el gen *TUB2*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que en los aislados de ambas zonas productoras de fresa con base en el crecimiento micelial, las  $DE_{50}$  no superaron los  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por lo que puede considerarse que las poblaciones de *C. acutatum* manifiestan una resistencia moderada a fungicidas benzimidazoles como el metil tiofanato, y muy probablemente al benomil, dado el mismo modo de acción como se ha demostrado previamente (Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren la necesidad de implementar estrategias de manejo de resistencia a benzimidazoles en las zonas de estudio dada la estabilidad que se ha aso-

benzimidazole resistance management strategies in the study areas given the stability found in some fungi such as *Botrytis cinerea* (Hollomon, 2015); among these strategies are the use of fungicide mixtures or alternating fungicides of different mode of action and not using them for eradication purposes (after symptom development) (Brent and Derek, 2007).

#### Distribution of the sensitivity of *C. acutatum* isolates to azoxystrobin

The distribution of the sensitivity to azoxystrobin of *C. acutatum* isolates in mycelium ranged between  $0.04$  to  $0.36 \mu\text{g mL}^{-1} ED_{50}$ , with a median of  $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío valley, while in the Zamora valley, the  $ED_{50}$  values ranged from  $0.07$  to  $0.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ , with the same median value. For conidia, the estimated  $ED_{50}$  ranged from  $0.01$  to  $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $0.006$  a  $0.15$ , with a median of  $0.05$  and  $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for Maravatío and Zamora, respectively (Table 3; Figure 2). Converting the  $ED_{50}$  values to base-10 logarithms satisfactorily normalized the distribution curve, except for the isolates from Zamora in the mycelium sensitivity test. The Kolmogorov-Smirnov test used to compare the two sensitivity distributions (for conidia and mycelium) did not show significant differences between the two

ciado en algunos hongos como *Botrytis cinerea* (Hollomon, 2015); entre ellas, el uso de mezclas o alternaciones con fungicidas de modo de acción diferente y evitar el uso con fines erradicantes (post-desarrollo de síntomas) (Brent and Derek, 2007).

### Distribución de la sensibilidad de aislados de *C. acutatum* al azoxystrobin

La distribución de la sensibilidad al azoxystrobin de los aislados de *C. acutatum*, en micelio varió entre una  $DE_{50}$  de 0.04 a 0.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con una mediana de 0.12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el valle de Maravatío, mientras que en el valle de Zamora los valores de  $DE_{50}$  variaron desde 0.07 a 0.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con el mismo valor de la mediana. Para los conidios, las  $DE_{50}$  estimadas variaron entre 0.01 a 0.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0.006 a 0.15 con una mediana de 0.05 y 0.04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para el valle de Maravatío y Zamora respectivamente (Cuadro 3; Figura 2). La transformación de los valores de  $DE_{50}$  a logaritmo base 10, normalizaron satisfactoriamente la curva de distribución excepto para los aislados de Zamora en la prueba de sensibilidad de micelio. La prueba de Kolmogorov-Smirnov, para la comparación de las dos distribuciones de la sensibilidad para conidios y para micelio no indicó diferencias significativas entre las zonas de estudio ( $Pr > Ks = 0.58$ , para conidios;  $Pr > Ks = 0.79$  para micelio).

study areas ( $Pr > Ks = 0.58$  for conidia;  $Pr > Ks = 0.79$  for mycelium).

Mondal *et al.* (2005) reported  $ED_{50}$  base values of 0.09 to 0.99 with a median of 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of azoxystrobin for *C. acutatum* mycelia obtained from citrus in Florida. Based on these results, they selected discriminatory doses of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Later, Forcelini *et al.* (2016) determined that azoxystrobin sensitivity in *C. acutatum* isolates obtained from strawberry in Florida was 0.30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . According to the authors, isolates showing inhibition up to  $ED_{50} = 3 \mu\text{g mL}^{-1}$  were considered sensitive; those with up to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were considered moderately resistant, and those with sensitivity higher than 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were considered completely resistant. Moderately resistant isolates were associated with point mutations at codon 129 of the cytochrome *bcl* gene, where the amino acid phenylalanine changed to leucine (F129L), while in the highly resistant isolates, the mutation was associated with the change from the amino acid glycine to alanine (G143A). Based on these studies, we may conclude that all the isolates tested in this study are sensitive to azoxystrobin, since the data show no evidence of resistance in the two strawberry producing areas studied based on  $ED_{50}$  distribution, although this active ingredient and other molecules of the same group have been in the Mexican market for over 10 years. However, given that this group is considered

**Cuadro 3. Estadística básica y momentos de los valores de  $DE_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para el fungicida azoxystrobin en micelio y conidios de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora.**

**Table 3. Basic statistics and moments of  $ED_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) values for azoxystrobin in *Colletotrichum acutatum* mycelium and conidia obtained from strawberries collected in Maravatío and Zamora valleys.**

| Variable | Origen    | Media | DS <sup>x</sup> | Mínimo | Máximo | Mediana | Rango | Skewness | Kurtosis |
|----------|-----------|-------|-----------------|--------|--------|---------|-------|----------|----------|
| Micelio  | Maravatío | 0.14  | 0.07            | 0.04   | 0.36   | 0.12    | 0.31  | 1.22     | 1.83     |
|          | Zamora    | 0.17  | 0.17            | 0.07   | 0.99   | 0.12    | 0.92  | 4.06     | 19.15    |
| Conidios | Maravatío | 0.10  | 0.12            | 0.01   | 0.56   | 0.05    | 0.55  | 2.31     | 5.69     |
|          | Zamora    | 0.05  | 0.03            | 0.006  | 0.15   | 0.04    | 0.14  | 0.85     | 0.21     |

<sup>x</sup>Desviación estándar / Standard deviation.

Mondal *et al.* (2005) reportaron valores base de  $DE_{50}$  de 0.09 a 0.99 con una media de  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de azoxistrobin para micelio de *C. acutatum* obtenidos de cítricos en Florida; con base en estos resultados seleccionaron una dosis discriminatoria de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Posteriormente Forcelini *et al.* (2016), determinaron que la sensibilidad al azoxystrobin en aislados de *C. acutatum* obtenidos de fresa en Florida fue de  $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . De acuerdo con los autores, los aislados que mostraron inhibición hasta una  $DE_{50} = 3 \mu\text{g mL}^{-1}$  se consideraron sensibles; hasta  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se consideraron moderadamente resistentes y superior a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se consideraron completamente resistentes. Los aislados moderadamente resistentes se asociaron a las mutaciones de punto en el codón 129 del gen citocromo *bcl* en el cual hay un cambio del aminoácido fenilalanina a leucina (F129L), mientras que en los aislados altamente resistentes, la mutación se asoció a un cambio del aminoácido glicina a alanina (G143A). Con base en estos estudios, es factible concluir que todos los aislados probados en este estudio son sensibles al azoxystrobin, pues los datos no indican evidencias de resistencia en las dos zonas productoras de fresa estudiadas con base en la distribución de las  $ED_{50}$ , a pesar de que este ingrediente activo y otras moléculas del mismo grupo han estado en el mercado en México por más de 10 años. Sin embargo, siendo un grupo considerado como de alto riesgo para la inducción de resistencia en hongos, es necesario la implementación de estrategias de manejo de resistencia (Hollomon, 2015) a fin de prevenir el un cambio en la distribución de la sensibilidad en el corto o mediano plazo. Esta implementación de estrategias de manejo de la resistencia debe tomar en cuenta principios generales que gobiernan el desarrollo de cepas resistentes (van den Bosch *et al.*, 2014).

to be high risk because it induces resistance in fungi, it is necessary to implement resistance management strategies (Hollomon, 2015) in order to avoid changes in sensitivity distribution in the short and long term. The implementation of resistance management strategies must take into account general principles that determine the development of resistant isolates (van den Bosch *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONS

The sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl based on mycelium ranged from  $ED_{50}$  0.28 to  $9.72 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío valley, and from  $1.39$  to  $2.99 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Zamora valley; for conidia  $ED_{50}$  ranged from  $0.9$  to  $396.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío valley, and from  $0.43$  to  $63.32 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Zamora valley.

As for azoxystrobin in mycelium, the  $ED_{50}$  ranged from  $0.04$  to  $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Maravatío valley, and from  $0.07$  to  $0.99 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the Zamora valley. In conidia,  $ED_{50}$  ranged from  $0.01$  to  $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the Maravatío valley, and from  $0.006$  to  $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the Zamora valley.

The data obtained based on sensitivity distribution ( $ED_{50}$ ) show that the *C. acutatum* isolates from Maravatío and Zamora, Michoacán, showed moderate resistance to thiophanate methyl, and complete sensitivity to azoxystrobin. In both cases, it is necessary to implement strategies for managing resistance to benzimidazole and strobirulin fungicides.

## CONCLUSIONES

La sensibilidad de los aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato basado en micelio varió entre una  $DE_{50}$  de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el Valle de Maravatío y de 1.39 a 2.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el Valle de Zamora, mientras que en conidios varió entre una  $DE_{50}$  de 0.9 a 396.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el Valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el Valle de Zamora.

Con respecto al azoxystrobin en micelio la  $DE_{50}$  varió entre 0.04 a 0.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en Maravatío y de 0.07 a 0.99  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el Valle de Zamora. En conidios, la  $DE_{50}$  varió de 0.01 a 0.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el Valle de Maravatío y 0.006 a 0.15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el Valle de Zamora.

Los datos obtenidos con base en la distribución de la sensibilidad ( $DE_{50}$ ) indican que los aislados de *C. acutatum* obtenidos del Valle de Maravatío y Zamora Michoacán mostraron resistencia moderada al metil tiofanato y sensibilidad completa al azoxystrobin. En ambos casos se hace necesaria la implementación de estrategias de manejo de la resistencia a fungicidas benzimidazoles y estrobilurinas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada al primer autor para los estudios de posgrado en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo.

## LITERATURA CITADA

- Brent KJ and Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. Fungicide Resistance Action Committee. Frac Monograph no. 1. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>
- Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Fukaya M, Yano K and Kajitani Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, for funding the first author's postgraduate studies in Plant Protection at the Universidad Autónoma Chapingo.

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

- crops in Japan. Plant Disease 90:506-512. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0506>
- Costet-Costet M. 2015. Monitoring resistance in obligate pathogens by bioassays relating to field use: grapevine powdery and downy mildews. Pp: 251-280 in: Ishii H, and Hollomon WWF (eds). Fungicide resistance in plant pathogens. Springer, Japan. 485 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8>
- Damm U, Cannon PF, Wouldenberg JHC and Crous PW. 2012. The *Colletotrichum* species complex. Studies in Mycology 73:37-113. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0010>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10005384640>
- Flores FJ and Garzon C. 2013. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth *in vitro* of Oomycetes and fungal pathogens. Dose-Response 11:361-373. <http://dx.doi.org/10.2203/dose-response.12-026.Garzon>
- Forcelini BB, Seijo TE, Amiri A and Peres NA. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone- outside inhibitor fungicides. Plant Disease 100:2050-2056. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0118-RE>
- Freeman S. 2008. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Hort Science 43:66-68. <http://hortsci.ashspublishings.org/content/43/1.toc>
- Hammerschlag F, Garcés S and Koch-Dean M. 2006. *In vitro* response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84:255. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-9027-5>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hollomon DW. 2015. Fungicide resistance: facing the challenge. Plant Protection Science 51:170-176. <http://dx.doi.org/10.17221/42/2015-PPS>
- Ishii H. 2012. Resistance in *Venturia nashicola* to benzimidazole fungicides and sterol demethylation Inhibitors. Pp: 21-31. In: Thind, T. (ed). Fungicide resistance in crop protection. CAB International. UK. 297 pp. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845939052.0157>
- Kim Y, Min J, Kang B, Bach N, Choi W, Park E and Kim H. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of



- the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. The Plant Pathology Journal 23:187-192. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.3.187>.
- Ma Z and Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24:853-863. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>.
- Mondal SN, Bhatia A, Shilts T and Timmer LW. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin and fenbuconazole. Plant Disease 89:1186-1194. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-1186>
- Parikka P and Lemetty A. 2009. *Colletotrichum acutatum*: survival in plant debris and infection of some weeds and cultivated plants. Acta Horticulturae 842:307-310. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.842.55>
- Peres NAR, Souza NL, Peever TL and Timmer LW. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Disease 88:125-130. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.125>
- Rebollar-Alviter A, Madden LV, Jeffers SN and Ellis MA. 2007. Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. Plant Disease 91:1625-1637. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1625>
- Schabenberger O and Pierce FJ. 2001. Contemporary Statistical Model for the Plant and Soil Science. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. 738 p.
- SIAP. 2016. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agrícola por Cultivo. <http://www.siap.gob.mx> (consulta en Marzo del 2016).
- Smith BJ. 2008. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: A North American perspective. Hort Science 43:69-73. <http://hortsci.ashspublishations.org/content/43/1.toc>
- Turechek WW, Peres NAR and Werner NA. 2006. Pre- and post-infection activity of pyraclostrobin for control of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 90:862-868. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0862>
- Valero M, García-Martínez S, Giner MJ, Aranzazu A and Ruiz JJ. 2010. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. European Journal of Plant Pathology 127:399-405. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-010-9606-0>
- van den Bosh F, Oliver R, van den Berg F and Paveley N. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. Annual Review of Phytopathology 52:175-195. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>
- Wedge D, Smith JN, Quebedeaux JP and Constantin RJ. 2007. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. Crop Protection 26:1449-1558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.12.007>
- Wharton SP and Diéguez-Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del jardín botánico de Madrid 61:3:22. <http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. A guide to methods and applications. Pp. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7:203-214. <http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>

# Chemical characterization, compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata*

## Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*

Jaime Black-Solis, Rosa Isela Ventura-Aguilar, Laura L. Barrera-Necha, Silvia Bautista-Baños\*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. \*Autor para correspondencia: sbautis@ipn.mx.

Recibido: 11 de diciembre, 2016.

Aceptado: 14 de febrero, 2017.

Black-Solis J, Ventura-Aguilar RI, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. 2017. Chemical characterization, compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 204-226.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-5

Primera publicación DOI: 25 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 25, 2017.

**Resumen.** Se desarrollaron modelos matemáticos del crecimiento y germinación *in vitro* de *Alternaria alternata* en presencia de aceites esenciales. Mediante el análisis de componentes principales, se encontraron similitudes entre ellos considerando su composición volátil. El crecimiento micelial y germinación de conidios de *A. alternata* se evaluó en PDA con aceites de canela, epazote y limón (0.25, 0.5, 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Los aceites se obtuvieron por hidrodestilación y comercialmente. Se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a

**Abstract.** Mathematical models of *in vitro* growth and germination of *Alternaria alternata* in the presence of essential oils were developed. By using principal component analysis, similarities were found among the oils in terms of their volatile composition. The mycelial growth and conidial germination of *A. alternata* was evaluated in PDA with cinnamon, epazote and lime oils (0.25, 0.5 and 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). The oils used were obtained by hydrodistillation and commercially and were characterized by gas chromatography-mass spectrometry. The Baranyi and Roberts and logistics equations were used to fit the experimental data and to predict its behavior. Due to their chemical composition, the oils were grouped into: 1) cinnamon (commercial and non-commercial), in which cis-cinnamaldehyde predominated, 2) commercial lime (D-limonene) and epazote (commercial and non-commercial) with ascaridole and p-cimene, and 3) non-commercial lime. Cinnamon oil (0.5 and 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) inhibited mycelial growth of *A. alternata*, whereas

espectrometría de masas. Para ajustar los datos experimentales y predecir su comportamiento se emplearon las ecuaciones de Baranyi y Roberts y logística. Por su composición química los aceites se agruparon en: 1) canela (comercial y no-comercial), en el que predominó el cis-Cinamaldehído, 2) limón comercial (D-Limoneno), y epazote (comercial y no-comercial), con Ascaridol y  $\rho$ -Cimeno y 3) limón no-comercial. El aceite de canela ( $0.5$  y  $1.0 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata*, mientras que, la germinación se inhibió  $100\%$  con la presencia de aceites de limón y epazote ( $0.25$  y  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Los modelos matemáticos y el análisis de componente principales, son herramientas eficaces para entender el efecto de los aceites esenciales en *A. alternata*.

**Palabras clave:** desarrollo fúngico, Baranyi y Roberts, limón, epazote, canela

## INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Alternaria* pueden causar enfermedades en numerosos productos hortofrutícolas, las cuales pueden presentarse durante el desarrollo del cultivo o en la postcosecha y causar la destrucción generalizada del cultivo y pérdidas en la producción (Mamgain *et al.*, 2013).

Durante la postcosecha, *Alternaria* tiene la capacidad de mantener una infección quiescente y manifestarse cuando se presentan las condiciones adecuadas, principalmente durante la maduración. En esta etapa, la principal especie que se ha identificado es *A. alternata* que causa la enfermedad del moho negro en solanáceas, principalmente (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

Para el control de las enfermedades en frutos y hortalizas, se utilizan tradicionalmente fungicidas sintéticos, los cuales por un mal manejo y presencia

germinación was  $100\%$  inhibited with the presence of lime and epazote oils ( $0.25$  and  $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Mathematical models and principal component analyses are effective tools for understanding the effect of essential oils on *A. alternata*.

**Key words:** fungal development, Baranyi and Roberts, lime, epazote, cinnamon

## INTRODUCTION

Fungi of *Alternaria* genus are responsible for diseases in a large number of vegetable and fruit products which may appear during crop development or postharvest, and cause widespread destruction of crops and production losses (Mamgain *et al.*, 2013).

During postharvest, *Alternaria* is able to maintain a quiescent infection and grow under favorable conditions, mostly at the maturity stage of horticultural products. At this stage, the main species identified is *A. alternata*, which produces black mold in Solanaceae mainly (Troncoso-Rojas and Tiznado-Hernández, 2014).

Synthetic fungicides have been traditionally used to control diseases on fruit and vegetables, but due to inappropriate management and presence of residues, they have affected the human health and caused in fungal strains, resistant (McCarroll *et al.*, 2002). For these reasons, over the last decades, the use of natural products, such as essential oils, has been studied as an option to control phytopathogenic fungi (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014).

Essential oils (AE) are volatile aromatic compounds that contain the characteristic fragrance of the plants from which they are extracted (Krisch *et al.*, 2011). In plants, they act as messengers, attract pollinators, and protect against herbivores and microorganisms that cause plant diseases

de residuos, originan afecciones a la salud humana y generan cepas de hongos resistentes (McCarroll *et al.*, 2002). Debido a esto, en las últimas décadas se ha estudiado el uso de productos naturales para el control de hongos fitopatógenos, entre los que se puede mencionar a los aceites esenciales (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014).

Los aceites esenciales (AEs) son derivados volátiles de plantas, los cuales son responsables de su aroma (Krisch *et al.*, 2011). En la planta funcionan como mensajeros, atrayentes de polinizadores y para defensa contra herbívoros y microorganismos que producen enfermedades (Baser y Buchbauer, 2009). Esta característica les confiere sus propiedades para su posible aplicación en el control de hongos fitopatógenos.

El contenido de compuestos y la efectividad de los AEs en el control de hongos fitopatógenos dependen de diversos factores que incluyen entre otros, la parte de la planta que se utiliza para la obtención del aceite, concentración y condiciones ambientales (Schmidt, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2011; Raut y Karuppaiyil, 2014).

En estudios previos, se ha reportado la eficacia y especificidad de distintos AEs sobre el control de hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Badawy y Abdelgaleil (2014) y Dimić *et al.* (2014) indicaron que el aceite esencial de limón (*Citrus limon*) inhibió el desarrollo de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium chrysogenum*. Manganyi *et al.* (2015) y Lu *et al.* (2013) también reportaron la efectividad del aceite esencial de corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en el control del crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos *Colletotrichum destructivum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *F. oxysporum*, mientras que en relación al aceite esencial de epazote (*Dysphania ambrosioides*) se ha reportado también su efecto inhibitorio sobre *Phyllosticta citricarpa* (Lombardo *et*

(Baser and Buchbauer, 2009). These characteristics make them suitable for controlling fungal phytopathogenic.

EOs compounds content and their effectiveness to control phytopathogenic fungi depend on various factors, e. g., the part of the plant from which oil is extracted, concentration and environment conditions (Schmidt, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2011; Raut and Karuppaiyil, 2014).

Results of effectiveness and specificity of different AE for controlling phytopathogenic fungi have been reported in earlier studies. For example, Badawy and Abdelgaleil (2014) and Dimić *et al.* (2014) reported that lime essential oil (*Citrus limon*) inhibited the development of *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium chrysogenum*. Manganyi *et al.* (2015) and Lu *et al.* (2013) also reported the effectiveness of (*Cinnamomum zeylanicum*) cinnamon bark essential oil in controlling mycelial growth and spore germination of *Colletotrichum destructivum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *F. oxysporum*; epazote essential oil has also been reported to have inhibitory effects on *Phyllosticta citricarpa* (Lombardo *et al.*, 2016), *F. oxysporum* (Jaramillo *et al.*, 2012), *A. flavus*, *A. niger* and *C. gloeosporioides* (Jardim *et al.*, 2010).

Essentials oils may contain over than 100 compounds (Dima and Dima, 2015), thus to analyze and compare them, it is necessary to use multivariate statistics, which would allow to describe and analyze multidimensional observations of information obtained from diverse variables in the same study unit (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Using EOs for controlling phytopathogenic fungi created the need to use mathematical models to understand and predict their development over time. In the beginning, models were developed to predict bacteria growth (Baranyi and Roberts,

*al.*, 2016), *F. oxysporum* (Jaramillo *et al.*, 2012), *A. flavus*, *A. niger* y *C. gloeosporioides* (Jardim *et al.*, 2010).

Un aceite esencial puede estar constituido por más de 100 compuestos (Dima y Dima, 2015) por lo que, para poder realizar análisis y comparaciones entre ellos es necesario emplear estadística multivariada, la que permitirá describir y analizar observaciones multidimensionales de información obtenida de diversas variables en una misma unidad de estudio (Di Rienzo *et al.*, 2008).

El uso de AEs para el control de hongos fitopatógenos ha generado la necesidad de contar con modelos matemáticos que permitan comprender y predecir el desarrollo de los mismos, a través del tiempo. En un principio, los modelos se desarrollaron para predecir el crecimiento de bacterias (Baranyi y Roberts, 1994). No obstante, debido a la importancia de los hongos, como vectores de contaminación de alimentos, se han adecuado los modelos existentes para evaluar su crecimiento (García *et al.*, 2009).

Dantigny *et al.* (2007), García *et al.* (2010) y Longhi *et al.* (2013) reportaron que existen tres tipos de modelos matemáticos que pueden aplicarse para el análisis de hongos. El primario, permite representar el crecimiento del hongo en el tiempo, dado un conjunto de factores restrictivos. El secundario, representar la influencia de factores restrictivos sobre los parámetros calculados en el modelo primario. El modelo terciario, es una combinación de modelos primario y secundario, y permite predecir la influencia de los factores restrictivos sobre el crecimiento del hongo. En este sentido Basak y Guha (2015) reportaron el uso de modelos matemáticos mediante el uso de datos experimentales del crecimiento micelial y germinación de esporas de *P. expansum*. Tremarin *et al.* (2015) ajustaron los datos de crecimiento de *Byssochlamys fulva* y *Neosartorya fischeri*, al modelo de Baranyi y

1994). However, due to the importance of fungi as food contamination vectors, the models have been adapted to evaluate their growth (García *et al.*, 2009).

Dantigny *et al.* (2007), García *et al.* (2010) and Longhi *et al.* (2013) reported three types of mathematical models that may be useful to analyze fungi. The first type represents fungal growth over time, given by a series of restrictive factors; the second type represents the influence of restrictive factors on the primary model; and the third type is a combination of the first and second model types, and allows to predict the influence of restrictive factors on fungal growth. Basak and Guha (2015) reported the use of mathematical models based on experimental data of *P. expansum* mycelial growth and spore germination. Tremarin *et al.* (2015) adjusted data of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* growth to the model of Baranyi and Roberts. Similarly, García *et al.* (2009) modeled the impact of optimal/suboptimal environment conditions on *A. carbonarius* and *P. expansum* growth by using Baranyi's function.

The objectives of this study were: 1. characterize chemically three essential oils; 2. evaluate their effectiveness in controlling *in vitro* *A. alternata*; 3. determine the variability of EOs by analyzing their main components, and 4. model the inhibitory effect of EOs on *A. alternata* mycelial growth and conidial germination.

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetal material and essential oil extraction

We used lime peel (*Citrus limon*), epazote above-ground plant parts (*Dysphania ambrosioides*) and cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). Limes were collected in orchards in Yautepec Morelos,

Roberts. De la misma manera, García *et al.* (2009) modelaron el impacto de condiciones ambientales óptimas/subóptimas en el crecimiento de *A. carbonarius* y *P. expansum* con el uso de la función de Baranyi.

Los objetivos del estudio fueron: 1. caracterizar químicamente tres aceites esenciales, 2. evaluar su efectividad en el control *in vitro* de *A. alternata*, 3. determinar la variabilidad en la composición de los AEs mediante el análisis de componentes principales y 4. modelizar el efecto inhibitorio de los AEs sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y extracción de aceites esenciales

Como material vegetal se utilizó la cáscara de frutos de limón (*Citrus limon*), parte aérea de epazote (*Dysphania ambrosioides*) y corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Los frutos de limón se recolectaron en huertos de Yautepec Morelos, México (18° 53' 09" Norte y 99° 03' 38" Oeste). Mientras que la parte aérea de epazote y la corteza de canela se adquirieron en la Central de Abasto en Cuautla Morelos, México (18° 48' 44" Norte y 98° 57' 21" Oeste). Las especies vegetales se identificaron en el Herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (número de especímenes 34057-limón y 34058-epazote).

El material vegetal se utilizó para la obtención de AEs mediante el método de hidrodestilación (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013). 1 kg del material vegetal se colocó en un destilador de cristal tipo italiano y se mantuvo en ebullición (97 °C) por 2 h. Los AEs que se obtuvieron, se almacenaron en frascos ámbar a 4 °C y el rendimiento se determinó por

México (18° 53' 09" north and 99° 03' 38" west). Epazote above-ground parts and cinnamon barks were purchased at the Central de Abasto (wholesale market) in Cuautla, Morelos, Mexico (18° 48' 44" north and 98° 57' 21" west). The vegetal species were identified at the Universidad Autónoma del Estado de Morelos Herbarium (number of specimens 34057-lime and 34058-epazote).

Vegetal material was used to obtain EOs by hydrodistillation (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013). One kilogram of vegetal material was placed in an Italian-type distiller and kept on boiling (97 °C) for 2 h. The EOs obtained were stored in amber jars at 4 °C and then their yield was gravimetrically determined. Furthermore, lime EOs were purchased at the company Hersol (State of Mexico, Mexico), epazote AE at the company Aceites y Esencias (State of Mexico, Mexico) and cinnamon bark AE at the company dōTERRA (Mexico City, Mexico). According to the manufacturer's specifications, the EOs were 99 % pure industrial-grade.

### Chemical characterization of essential oils using CG-EM

The commercial EOs and the ones obtained by hydrodistillation were diluted in chloroform in a 1:10 v/v. Then, 1 µL of the dissolution was injected in a gas chromatograph (GC) SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, USA) adapted to an EVOQ mass triple quadrupole detector and a PAL-COMBI xt automatic sample injector (Bruker Daltonics, Inc.). The mass spectrometer (EM) was set to a 50 to 500 mass-charge<sup>-1</sup> range using the MS Workstation version 8.2 software (Bruker Daltonics, Inc.).

The GC-EM was equipped with a BR-1ms capillary column 30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 µm thick (Bruker Daltonics, Inc.). The injector and detector temperature was

gravimetría. Adicionalmente, se adquirieron AEs de limón a la empresa Hersol (Edo. México, México), el de epazote se obtuvo de la empresa Aceites y Esencias (Edo. México, México) y el de corteza de canela de la empresa dōTERRA (México DF, México). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, los AEs fueron grado industrial con 99 % de pureza.

### Caracterización química de los aceites esenciales por CG-EM

Los AEs comerciales y los que se obtuvieron por hidrodestilación, se disolvieron en cloroformo en una proporción 1:10 v/v. Posteriormente, 1  $\mu\text{L}$  de la disolución se inyectó en un cromatógrafo de gases (CG) SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, USA) acoplado a un detector de masas EVOQ triple cuadrupolo y con inyector automático PAL-COMBI xt (Bruker Daltonics, Inc.). El espectrómetro de masas (EM) se operó en un rango de 50 a 500 masa carga<sup>-1</sup> mediante el uso del software MS Workstation versión 8.2 (Bruker Daltonics, Inc.).

El CG-EM se equipó con una columna capilar BR-1ms FS de 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  espesor (Bruker Daltonics, Inc.). Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C y 280 °C, respectivamente. El gas acarreador fue Helio (He) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura inicial del horno fue de 55 °C durante 1 min, posteriormente, se aumentó a 155 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C min<sup>-1</sup> y se mantuvo por 2 min, posteriormente se aumentó a 255 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> con un tiempo total de análisis de 20.14 min por muestra.

Los compuestos que se detectaron se identificaron mediante la comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con los datos procedentes de estándares contenidos en la biblioteca del

220 °C and 280 °C, respectively. Helium (He) was used as carrier gas at a 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate. The initial oven temperature was 55 °C for 1 min and then increased to 155 °C at heat speed rate of 20 °C min<sup>-1</sup>; this rate was maintained for 2 min and then increased to 255 °C at heat speed rate of 10 °C min<sup>-1</sup> and a total analysis period of 20.14 min per sample.

The detected compounds were identified by comparing their retention time and mass spectrum with data from standards included in NIST (National Institute of Standards and Technology, MD) team's library.

### Fungus isolate and crop conditions

The *A. alternata* isolate was obtained from the fungi collection of the Laboratory of Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas (Ceprobi, Morelos, Mexico). The species that had already been morphologically and molecularly identified was grown in potato-dextrose-agar culture (PDA, Bioxon, Mexico) for 14 days at 28 °C.

### Inhibition test of mycelial growth

The EOs inhibitory effect was determined using the agar-dilution method reported by Chen *et al.* (2014) which involves mixing essential oil concentrations (0.25, 0.5, 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) with 0.1 % (v/v) Tween 20 (Hycel, Mexico City, Mexico) in 150 mL of PDA medium. Then, Petri dishes 90 mm in diameter were filled with 25 ml of the mixture (6 replications per treatment) and left to cool at room temperature (25 $\pm$ 2 °C). PDA and PDA-Tween were used as controls.

A PDA disk 100 mm in diameter containing *A. alternata* was grown in the center of a Petri dish and incubated at 28 $\pm$ 2 °C. Mycelial growth was measured daily using a vernier caliper in order to evaluate the diameter reached by the mycelium

equipo, NIST (National Institute of Standards and Technology, MD, USA).

### Actividad antifúngica

#### Cepa del hongo y condiciones de cultivo

La cepa de *A. alternata* se obtuvo de la colección de hongos del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas (Ceprobi, Morelos, México). La especie ya identificada morfológica y molecularmente se cultivó en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Bioxon, México) por 14 días a 28 °C.

#### Ensayo de inhibición del crecimiento micelial

El efecto inhibitorio de los AEs se determinó por el método de dilución en agar reportado por Chen *et al.* (2014) el cual consistió en mezclar las concentraciones (0.25, 0.5, 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) del aceite esencial con 0.1 % (v/v) de Tween 20 (Hycel, México DF, México) en 150 mL de medio PDA. Posteriormente, se vaciaron 25 mL de la mezcla en cajas Petri de 90 mm de diámetro (6 repeticiones por tratamiento) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25±2 °C). Adicionalmente, se utilizaron los tratamientos de PDA y PDA-Tween, como controles.

Posteriormente, en el centro de la caja se sembró un disco PDA de *A. alternata* de 10 mm de diámetro. Las cajas se sellaron e incubaron a 28±2°C. El crecimiento micelial se midió diariamente evaluando el diámetro que alcanzó el micelio a través del tiempo con la ayuda de un vernier. El ensayo se detuvo cuando en el tratamiento control (sólo PDA), el micelio cubrió por completo la caja Petri. Los resultados se reportaron como índice de inhibición del crecimiento micelial (*IM*) de acuerdo a la ecuación (1), donde  $C_c$  representa el crecimiento en el control y  $C_T$  el crecimiento en el tratamiento.

over time. The test ended when the mycelium completely covered the Petri dish containing the control treatment. The results were reported as mycelial growth inhibition index (*IM*), according to the following equation (1), where  $C_c$  denotes the control's growth, and  $C_T$  the growth in the treatment.

$$IM = \left( \frac{C_c - C_T}{C_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

Treatments reaching 100 % inhibition were re-grown in PDA culture but without adding essential oil to evaluate the fungistatic or fungicide effect of the EOs used.

#### Inhibition test for conidial germination

The effect of EOs on conidial germination was evaluated using the technique described by Bautista-Baños *et al.* (2008). A conidial solution ( $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) of a 14-day old monosporic culture of *A. alternata* was prepared and added to six disks containing PDA (25  $\mu\text{L disk}^{-1}$ ) which then were placed on glass slides. Later, 10  $\mu\text{L}$  of EOs were added to each disk (0.25, 0.5, 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) incubated at 28±2 °C within sealed Petri dishes. Germination was carried out after 2, 4, 6 and 8 h. A conidium was considered germinated when a germ tube was observed regardless of its length (Costa *et al.*, 2015).

After the incubation period, a drop of lactophenol blue solution was added to each disk and 100 conidia per disk were observed under an optical microscope 40x objective (Nikon alphaphot-2 YS2-H, Japan). The percentage germination was calculated ( $G_{\%}$ ) using the following equation (2), where  $E_G$  denotes the number of germinated conidia, and  $T_E$  the total conidia.



$$IM - \left( \frac{C_c - C_T}{C_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

Los tratamientos que presentaron inhibición del 100 % se sembraron en medio PDA sin la adición de aceite esencial para evaluar el efecto fungistático o fungicida de los AEs empleados.

### Ensayo de inhibición de la germinación de conidios

El efecto de los AEs sobre la germinación de conidios se evaluó siguiendo la técnica descrita por Bautista-Baños *et al.* (2008). De un cultivo monospórico de *A. alternata* de 14 días de edad ( $10^5$  conidios mL<sup>-1</sup>) se obtuvo una solución de conidios que se agregó a seis discos de PDA (25 µL disco<sup>-1</sup>), los cuales se colocaron en portaobjetos. Posteriormente, a cada disco se añadieron 10 µL de AEs (0.25, 0.5, 1.0 µL mL<sup>-1</sup>) y se incubaron a 28±2 °C, dentro de cajas Petri selladas. La evaluación de la germinación se realizó a las 2, 4, 6 y 8 h. Se consideró que un conidio había germinado cuando se observó la presencia de su tubo germinativo, sin importar su longitud (Costa *et al.*, 2015)

Después del período de incubación, se colocó una gota de azul de lactofenol en cada disco y se evaluaron 100 conidios por disco en un microscopio óptico objetivo 40x (Nikon alphaphot-2 YS2-H, Japón). Se determinó el porcentaje de germinación ( $G_{(%)}$ ) mediante la ecuación (2), donde  $E_G$  representa el número de conidios germinados y  $T_E$  el total de conidios.

$$G_{(%) = \left( \frac{E_G}{T_E} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$G_{(%) = \left( \frac{E_G}{T_E} \right) \times 100 \quad (2)$$

### Adjusting experimental data to mathematical models

Experimental data of *A. alternata* mycelial growth in PDA culture in terms of time, with and without EOs, were adjusted to the model of Baranyi and Roberts (1994) to estimate the maximum growth rate and apparent lag phase time using the following equation (3).

$$D_{(t)} = D_0 + \mu_{\max} \left[ t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \cdot \ln \left\{ e^{(-\mu_{\max} t)} + e^{(-\mu_{\max} \lambda)} - e^{(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)} \right\} \right] \quad (3)$$

Where  $D_{(t)}$  denotes the diameter of the mycelium (cm) at any time  $t$  (días);  $D_0$ , the diameter at  $t=0$ ,  $\mu_{\max}$  (cm day<sup>-1</sup>), the maximum growth rate; and  $\lambda$  (days), the apparent lag phase time.

The model was developed using DMFit version 3.5 (Microsoft Excel add-in) (Institute of Food Research, Norwich, UK). To evaluate the model, it was estimated the Mean Square Root Error (MSRE) and the determination coefficient ( $R^2$ ). Models with MSRE values near to zero and  $R^2$  near to one were considered to be the best (Tremarin *et al.*, 2015). Growth data (experimental and predicted by the model) were used to plot surface graphs using SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

The conidial percentage germination was adjusted to the logistic model (Equation 4) to

### Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos

Los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. alternata* en medio PDA con y sin AEs en función del tiempo se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994) para estimar la tasa máxima de crecimiento y tiempo de fase lag aparente, con la ecuación (3).

$$D_{(t)} = D_0 + \mu_{\max} \left[ t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \cdot \ln \left\{ e^{(-\mu_{\max} t)} + e^{(-\mu_{\max} \lambda)} - e^{(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)} \right\} \right] \quad (3)$$

Donde  $D_{(t)}$  es el diámetro del micelio (cm) a cualquier tiempo  $t$  (días),  $D_0$  es el diámetro a  $t=0$ ,  $\mu_{\max}$  (cm día<sup>-1</sup>) es la tasa máxima de crecimiento y  $\lambda$  (días) es el tiempo de fase lag aparente.

El modelo se desarrolló con el software DMFit versión 3.5 (Microsoft Excel add-in) (Institute of Food Research, Norwich, UK). Para la evaluación del modelo se estimaron la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), modelos con valores de RMSE cercanos a cero y  $R^2$  cercano a uno se consideraron los mejores (Tremarin *et al.*, 2015). Con los datos del crecimiento (experimentales y predichos por el modelo) se elaboraron gráficos de superficie con el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

El porcentaje de germinación de conidios se ajustó al modelo logístico (Ecuación 4) para estimar los parámetros, tasa de incremento en el porcentaje de germinación y tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación. Las unidades experimentales que contenían los AEs que no permitieron la germinación del hongo se omitieron en el análisis. Para esto se utilizó el paquete estadístico InfoStat

estimate the parameters, the increase in the percentage germination and the time required to reach 50 % germination. Experimental units containing EOs that not allowed fungal germination were omitted in the analysis. For this purpose, we used the statistical software InfoStat version 2016 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

$$P = \frac{P_{\max}}{(1 + e^{k(r-t)})} \quad (4)$$

Where  $P$  denotes the germination percentage;  $P_{\max}$ , the maximum percentage germination (100 %);  $k$ (h<sup>-1</sup>), the increase in the rate of percentage germination;  $r$  (h), the time required to reach 50 % germination; and  $t$  (h), the time (Dantigny *et al.*, 2007).

### Statistical analysis

Data of the volatile compounds of the six different EOs identified through GC-EM were analyzed using principal component analysis (PCA) to obtain the variability of the studied systems with the software package InfoStat version 2016; mycelial growth and conidial germination at the end of the growth period were analyzed using a completely randomized design in a factorial arrangement with 6 replications. The factors used were 1) type of essential oil (lime, epazote and cinnamon); 2) source (hydrodistilled or commercial); and 3) concentration (0.25, 0.5 and 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) to compare the medians, and the InfoStat version 2016 software for data analysis was used. The experiment was performed in duplicate.

versión 2016 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

$$P = \frac{P_{\max}}{(1 + e^{k(r-t)})} \quad (4)$$

Donde  $P$  es porcentaje de germinación,  $P_{\max}$  es el porcentaje máximo de germinación (100 %),  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la tasa de incremento en el porcentaje de germinación,  $r$  (h) es el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación y  $t$  (h) es el tiempo (Dantigny *et al.*, 2007).

### Análisis estadístico

Los datos de los compuestos volátiles identificados por CG-EM de los seis diferentes AEs se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) con la finalidad de obtener la variabilidad de los sistemas estudiados empleando el paquete estadístico InfoStat versión 2016, mientras que, el crecimiento micelial y la germinación de conidios al final del período de crecimiento, se analizaron a través de un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 6 repeticiones. Los factores fueron: 1) tipo de aceite esencial (limón, epazote y canela), 2) procedencia (hidrodestiado o comercial) y 3) concentración (0.25, 0.5 y 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de medias y el software InfoStat versión 2016, para el análisis de datos. El experimento se realizó por duplicado.

## RESULTADOS

### Composición química de los aceites esenciales

Los resultados muestran que hubo diferencias en la composición de los AEs que se evaluaron,

## RESULTS

### Chemical composition of essential oils

Results show differences in the composition of the EOs evaluated regarding the vegetal material and the method used to extract them (by hydrodistillation or commercial). Cinnamon, lime and epazote EOs obtained by hydrodistillation yielded 0.49, 0.33 and 0.015 %, respectively.

Considering the type of vegetal material from which the EOs were extracted, it was observed that lime and epazote oils contained terpenes mainly (D-Limonene,  $\rho$ -Cymene and Ascaridole), while the predominant compounds in cinnamon oil were aldehydes (cis-Cinnamaldehyde) (Table 1). However, considering the method used, differences in the content of the detected compounds were noted.

As for D-Limonene, it was observed 7.26 % more content in the lime AE obtained by hydrodistillation compared with the commercial AE. In epazote AE, two main components were identified:  $\rho$ -Cymene in non-commercial oil (22.40 %) and Ascaridole in commercial oil (27.30 %). Finally, the content of cis-Cinnamaldehyde in commercial cinnamon oil was 4.20 % higher than that obtained by hydrodistillation; this compound was the highest in both EOs.

### Principal component analysis (PCA)

For PCA, compounds representing an area greater than 1 % were used in the chromatographic analysis. According to Terrádez (2002) there is no definite rule regarding the number of principal components (PC) to be used, but it is important to keep in mind that one of the objectives of the analysis was to reduce the number of variables. In this regard, we selected the PCs that contributed at least 5 % of the total variance and whose proportion

en función del material vegetal y de su método de obtención (hidrodestilación o comercial). Los AEs que se obtuvieron por hidrodestilación tuvieron rendimientos de 0.49, 0.33 y 0.015 % para canela, limón y epazote, respectivamente.

Considerando el tipo de material vegetal del que provienen los Aes, se observó que los aceites de limón y epazote se constituyeron principalmente de terpenos como el D-Limoneno,  $\rho$ -Cimeno y Ascaridol, mientras que, en el aceite de canela predominaron aldehídos como el cis-Cinamaldehído (Cuadro 1). Sin embargo, al considerar el método de obtención, se apreciaron diferencias en el contenido de los compuestos que se detectaron.

En el caso del D-Limoneno, se observó un 7.26 % más de contenido en el aceite esencial de limón que se obtuvo por hidrodestilación en comparación con el comercial. Mientras que, en epazote se identificaron dos componentes principales, el  $\rho$ -Cimeno en el aceite no comercial (22.40 %) y el Ascaridol

of accumulated variance explained at least 70 % of the same (Mora-Aguilera and Campbell, 1997). The results were grouped in five PCs that explain 100 % of the variability in the chemical composition of the EOs used (Table 2). However, given that PC1 and PC2 explained 74.0 % of the variability, the results were described in PC1 and PC2 terms.

Figure 1A, shows the three groups formed considering the type of vegetal material. The first group corresponds to lime oil obtained by hydrodistillation; the second group, to cinnamon oils (commercial and non-commercial); and the third group, to lime (commercial) and epazote (commercial and non-commercial) oils. In PC1 we observed that essential cinnamon oil was different from epazote and lime oils. In PC2, differences were found among epazote (commercial and non-commercial) and lime (commercial) oils, and cinnamon (commercial and non-commercial) lime oils obtained by hydrodistillation.

**Cuadro 1. Resumen de los principales compuestos orgánicos volátiles de tres aceites esenciales detectados por CG-EM.**  
**Table 1. Summary of the main volatile organic compounds of three essential oils detected by CG-EM.**

| AE hidrodestilado | Compuesto                    | AR (%) | TR (min) | AE comercial | Compuesto                    | AR (%) | TR (min) | GF |
|-------------------|------------------------------|--------|----------|--------------|------------------------------|--------|----------|----|
| Limón             | D-Limoneno                   | 32.44  | 5.10     | Limón        | D-Limoneno                   | 25.18  | 5.10     | T  |
|                   | L- $\beta$ -Pinenol          | 14.93  | 4.63     |              | L- $\beta$ -Pinenol          | 2.49   | 4.63     | T  |
|                   | $\gamma$ -Terpineno          | 8.95   | 6.21     |              | $\gamma$ -Terpineno          | 5.49   | 6.21     | T  |
|                   | Citral                       | 5.82   | 6.80     |              |                              |        |          | T  |
|                   | Otros                        | 37.86  |          |              | Otros                        | 66.84  |          |    |
| Epazote           | $\rho$ -Cimeno               | 22.40  | 4.98     | Epazote      | Ascaridol                    | 27.29  | 6.65     | T  |
|                   | trans-Ascaridol glicol       | 10.07  | 6.92     |              | trans-Ascaridol glicol       | 1.15   | 6.92     | T  |
|                   | Isoascaridol                 | 6.33   | 7.24     |              | Isoascaridol                 | 19.40  | 7.24     | T  |
|                   | Otros                        | 61.20  |          |              | Otros                        | 52.16  |          |    |
| Canela            | cis-Cinamaldehído            | 42.20  | 6.85     | Canela       | cis-Cinamaldehído            | 46.40  | 6.85     | A  |
|                   | Ácido acético, cinamil ester | 8.59   | 8.63     |              | Ácido acético, cinamil ester | 10.90  | 8.63     | E  |
|                   | Linalool                     | 5.27   | 5.49     |              | Linalool                     | 2.80   | 5.49     | T  |
|                   | $\alpha$ -Felandreno         | 1.72   | 4.81     |              |                              |        |          | T  |
|                   | Benzoato de Benzilo          | 1.13   | 12.42    |              |                              |        |          | E  |
|                   | Otros                        | 41.10  |          |              | Otros                        | 39.89  |          |    |

AE-aceite esencial, AR-área relativa, TR-tiempo de retención, GF-grupo funcional, A-aldehído, E-éster, T-terpeno  
AE-essential oil; AR-relative area; TR-retention time; GF-functional group; A-aldehyde, E-ester, T-terpene

en el comercial (27.30 %). Finalmente, el contenido de cis-Cinamaldehído fue superior en el aceite comercial de canela en un 4.20 % con respecto al que se obtuvo por hidrodestilación, siendo este el compuesto mayoritario en ambos AEs.

### Análisis de componentes principales

Para el ACP se utilizaron los compuestos que representan un área superior al 1 % en el análisis cromatográfico. De acuerdo con Terrádez (2002) no hay una regla definida sobre el número de componentes principales (CP) que se deban utilizar, pero es importante considerar que uno de los objetivos de este análisis era reducir el número de variables. En este sentido, se seleccionaron los CP que aportaron al menos un 5 % de la varianza total y que la proporción de varianza acumulada explicara al menos el 70 % de la misma (Mora-Aguilera y Campbell, 1997). Los resultados se agruparon en cinco CP que explican el 100 % de la variabilidad en la composición química de los AEs utilizados (Cuadro 2), no obstante, debido a que los CP1 y CP2 explicaron el 74.0 % de la variabilidad, los resultados se describieron en términos de estos.

En la Figura 1A se puede apreciar la formación de tres grupos, considerando el tipo de material vegetal. En el primer grupo se encuentra el aceite de limón que se obtuvo por hidrodestilación, en el segundo grupo los aceites de canela (comercial y no comercial) y en el tercero los aceites de limón (comercial) y epazote (comercial y no comercial). En el CP1 se observó que el aceite esencial de canela fue diferente a los aceites de epazote y limón. Mientras que, con el CP2 se apreciaron diferencias entre los aceites de epazote (comercial y no comercial) y limón (comercial) y los aceites de canela (comercial y no comercial) y limón que se obtuvo por hidrodestilación.

Por otra parte, se encontraron valores significativos en el CP1 por la presencia de compuestos

**Cuadro 2. Análisis de componentes principales (eigenvalores) entre los compuestos de tres diferentes aceites esenciales**

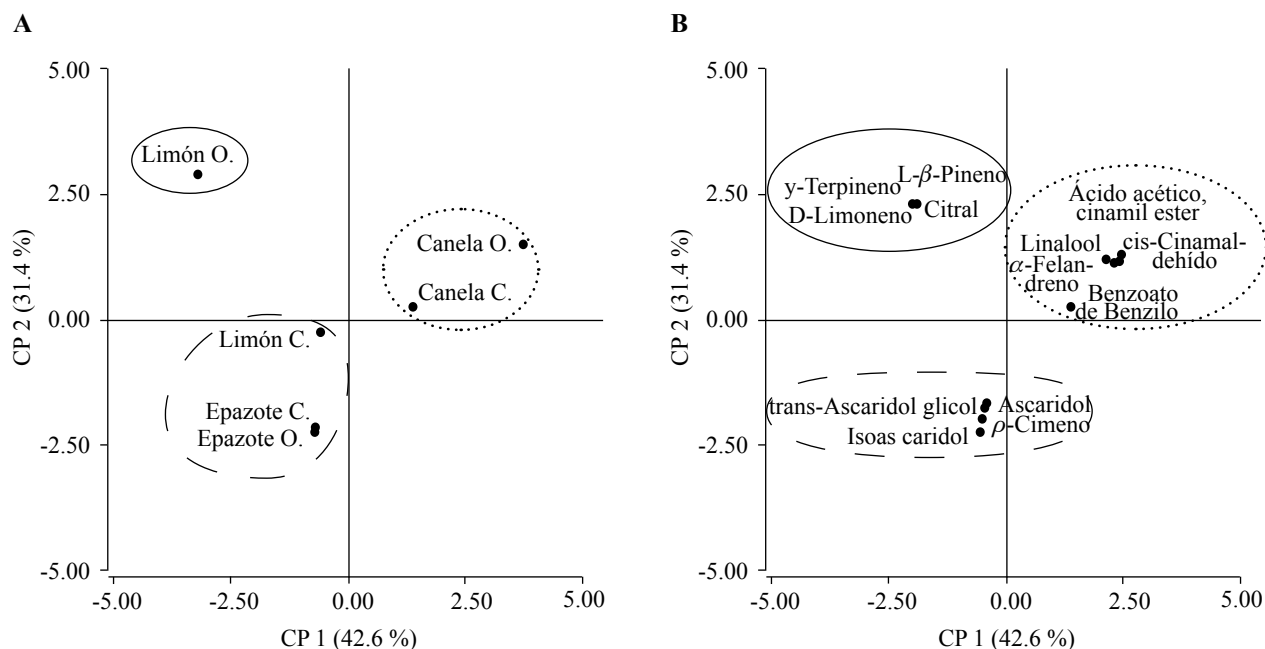
**Table 2. Principal Component Analysis (eigenvalues) among the compounds of three different essential oils.**

| Componentes principales | Eigenvalor | Varianza total (%) | Varianza acumulada (%) |
|-------------------------|------------|--------------------|------------------------|
| 1                       | 5.53       | 42.6               | 42.6                   |
| 2                       | 4.08       | 31.4               | 74.0                   |
| 3                       | 1.98       | 15.2               | 89.2                   |
| 4                       | 1.02       | 7.9                | 97.1                   |
| 5                       | 0.39       | 2.9                | 100.0                  |

On the other hand, significant values were observed in PC1 due to the presence of monoterpene compounds, while PC2 was positively correlated with aldehydes and esters (data not shown). This is clearly appreciated in Figure 1B with three groups formed: a) the first group included D-Limonene and L- $\beta$ - Pinene, which correspond to lime oil composition; b) in the second group we observed aldehydes, esters and non-cyclic monoterpenes such as cis-Cinnamaldehyde, compounds that are present in cinnamon oil; and c) the third group, showed oxygenated monoterpenes as Ascaridole, compounds that are present in epazote oil.

### Mycelial growth inhibition

Statistically significant differences were observed ( $p < 0.0001$ ) in *A. alternata* *in vitro* mycelial growth (at day 9-time when the control treatment reached its maximum growth) by the effect of the essential oil type, source and concentration (Table 3). Results showed that *A. alternata* did not grow on the PDA medium to which cinnamon essential oil (commercial and non-commercial) was added at concentrations of 0.5 and 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , and which had a fungicidal effect on the fungus. In contrast, commercial lime essential oil at 0.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  concentration



**Figura 1. Distribución de los aceites esenciales (A) y compuestos que se identificaron (B) de acuerdo a los eigenectores del análisis de componente principal calculados para el CP1 y CP2 (74% varianza).**  
**Figure 1. Distribution of essential oils (A) and compounds identified (B) according to eigenectors from principal component analysis calculated for PC1 and PC2 (74 % variance).**

monoterpenicos. Mientras que, el CP2 correlaciona positivamente con aldehídos y ésteres (datos no mostrados). Esto se aprecia con claridad en la figura 1B con la formación de tres grupos, a) el primer grupo incluyó el D-Limoneno y L-β-Pineno, los cuales correspondieron a la composición del aceite de limón, b) en el segundo grupo estuvieron presentes aldehídos, ésteres y monoterpenos no ciclicos como el cis-Cinamaldehído, compuestos constituyentes del aceite de canela y c) el tercer grupo los monoterpenos oxigenados como el Ascaridol, compuestos presentes en el aceite de epazote.

### Inhibición del crecimiento micelial

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) en el crecimiento micelial *in vitro* de *A. alternata* (al día 9-tiempo en el que el tratamiento control alcanzó su máximo

did not inhibit *A. alternata* growth, while, at the same concentration, comercial lime and epazote oils showed limited inhibition (4.06 and 3.42 %, respectively). A similar effect was observed with comercial lime oil at a concentration of  $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$  (3.18 % inhibition).

### Inhibition of conidial germination

The percentage germination of *A. alternata* conidia to which EOs were directly applied showed statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ), as a result of the treatments, when they were evaluated after 8 h (data not shown). No germination was observed in treatments containing cinnamon essential oil ( $0.25, 0.5$  and  $1.0 \text{ mL}^{-1}$ ), non-commercial lime and epazote oils ( $0.5$  and  $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) and comercial lime and epazote oils ( $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ).

crecimiento) por efecto del tipo de aceite esencial, su procedencia y la concentración (Cuadro 3). Los resultados indicaron que *A. alternata* no creció en el medio PDA adicionado con aceite esencial de canela (comercial y no comercial) en concentraciones de 0.5 y 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , mismos que tuvieron un efecto fungicida sobre el hongo. Por el contrario, el aceite comercial de limón en concentración de 0.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  no inhibió el crecimiento de *A. alternata*, mientras que a la misma concentración, los aceites no comerciales de limón y epazote presentaron una inhibición limitada (4.06 y 3.42 %, respectivamente). Efecto similar se observó con el aceite comercial de limón en concentración de 0.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (3.18 % de inhibición).

Treatments showing the highest germination inhibition percentage were non-commercial lime (92.50 %) and epazote oils (93.33 %) at a concentration of 0.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , while at a concentration of 0.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  it was the commercial lime and epazote oils (91.0 % and 94.17 %, respectively) that showed the highest percentage germination inhibition; this suggests that the results depend on the oil concentration used.

### Mycelial growth model

Experimental data of *A. alternata* mycelial growth on PDA at different concentrations of EOs, in terms of time were adjusted to the model of

**Cuadro 3. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *A. alternata* incubado por 9 días en medio PDA, adicionado con AEs.**

**Table 3. Mycelial growth and percentage inhibition of *A. alternata* incubated for 9 days in PDA medium to which AEs were added.**

| Aceite esencial | Procedencia    | Dosis ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) | CM $\pm$ DE (cm)      | Inhibición (%) |
|-----------------|----------------|---------------------------------|-----------------------|----------------|
| Control         |                |                                 | 8.50 $\pm$ 0 g        | 0.0            |
| Tween® 20       |                |                                 | 7.92 $\pm$ 0.14 e f g | 7.8            |
| Limón           | Hidrodestilado | 0.25                            | 8.20 $\pm$ 0.34 f g   | 4.1            |
| Limón           | Hidrodestilado | 0.50                            | 7.49 $\pm$ 0.17 e f   | 13.5           |
| Limón           | Hidrodestilado | 1.00                            | 6.15 $\pm$ 0.17 d     | 31.4           |
| Epazote         | Hidrodestilado | 0.25                            | 8.25 $\pm$ 0.20 f g   | 3.4            |
| Epazote         | Hidrodestilado | 0.50                            | 7.41 $\pm$ 0.17 e f   | 14.6           |
| Epazote         | Hidrodestilado | 1.00                            | 7.17 $\pm$ 0.22 e     | 17.7           |
| Canela          | Hidrodestilado | 0.25                            | 2.48 $\pm$ 0.89 b     | 80.3           |
| Canela          | Hidrodestilado | 0.50                            | 1 a                   | 100.0          |
| Canela          | Hidrodestilado | 1.00                            | 1 a                   | 100.0          |
| Limón           | Comercial      | 0.25                            | 8.50 $\pm$ 0 g        | 0.0            |
| Limón           | Comercial      | 0.50                            | 8.26 $\pm$ 0.14 f g   | 3.2            |
| Limón           | Comercial      | 1.00                            | 7.43 $\pm$ 0.14 e f   | 14.3           |
| Epazote         | Comercial      | 0.25                            | 7.04 $\pm$ 0.15 d e   | 19.5           |
| Epazote         | Comercial      | 0.50                            | 5.06 $\pm$ 0.11 c     | 45.9           |
| Epazote         | Comercial      | 1.00                            | 2.76 $\pm$ 0.30 b     | 76.6           |
| Canela          | Comercial      | 0.25                            | 3.17 $\pm$ 2.15 b     | 71.1           |
| Canela          | Comercial      | 0.50                            | 1 a                   | 100.0          |
| Canela          | Comercial      | 1.00                            | 1 a                   | 100.0          |

CM-Crecimiento micelial; DE-desviación estándar; medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

CM-Mycelial growth; DE-standard deviation; medians with the same letter are significantly different ( $p > 0.05$ ) by Tukey's test.

### Inhibición de la germinación de conidios

El porcentaje de germinación de conidios de *A. alternata* a los que se aplicó directamente los AEs, presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) por efecto de los tratamientos, al ser evaluados después de 8 h (datos no mostrados). En los tratamientos que contenían aceites esencial de canela (0.25, 0.5 y 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), los aceites de limón y epazote no comerciales (0.5 y 1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) y los aceites de limón y epazote comerciales (1.0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) no se observó germinación.

Los tratamientos que presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la germinación fueron los aceites no comerciales de limón (92.50 %) y epazote (93.33 %) en concentración de 0.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Mientras que, en concentración de 0.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  fueron los aceites comerciales de limón y epazote (91.0 % y 94.17 %, respectivamente), evidenciándose un efecto de dependencia con la concentración del aceite utilizado.

### Modelo de crecimiento micelial

Los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. alternata* en PDA con diferentes concentraciones de AEs en función del tiempo se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts. Se observó una tendencia de disminución en el crecimiento micelial con un incremento en la concentración de AEs en el medio de cultivo (Figura 2).

Con los datos de crecimiento de los tratamientos evaluados se desarrollaron 14 modelos (Cuadro 4). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) promedio fue 0.97, mientras que la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) fue 0.15. En los modelos que se desarrollaron, a mayor concentración de aceite esencial se observó una disminución de la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente ( $\lambda$ ).

Baranyi and Roberts. Mycelial growth tended to decrease as the concentration of EOs in the culture medium increased (Figure 2).

Based on data of the evaluated treatments, we developed 14 models (Table 4). The average determination coefficient ( $R^2$ ) was 0.97, while the root-mean-square error (RMSE) was 0.15. In the models developed, we observed that as the concentration of essential oil increased, the maximum growth rate decreased ( $\mu_{max}$ ) and the time of the apparent lag phase increased ( $\lambda$ ).

### Conidial germination model

Experiment data of conidial germination were adjusted to the Logistic model. Using the evaluated treatments 5 models were developed (Table 5). The average RMSE was 1.98. The increase in EOs concentration affected germination, and as the concentration of essential oil increased, there was a lower rate of germination increase  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) and more time was required to reach 50 % germination  $r$ (h).

## DISCUSSION

Yields of EOs obtained by hydrodistillation were lower than those reported in the literature. For essential epazote oil, Jaramillo *et al.* (2012) reported yields of 0.4 %. For cinnamon oil, Golmohammad *et al.* (2012) reported yields of 3.6 %, and Saleem *et al.* (2015) and Unlu *et al.* (2010) reported yields of 0.93 %. Differences in yields of the EOs evaluated, compared with yields reported in literature, may be attributed to factors such as the methodology used during essential oil extraction, as well as its effectiveness (Schmidt, 2009; Golmakani and Moayyedi, 2015).

For example, Hamdani and Allem (2015), and Sharma and Vashist (2015), extracted lime essential



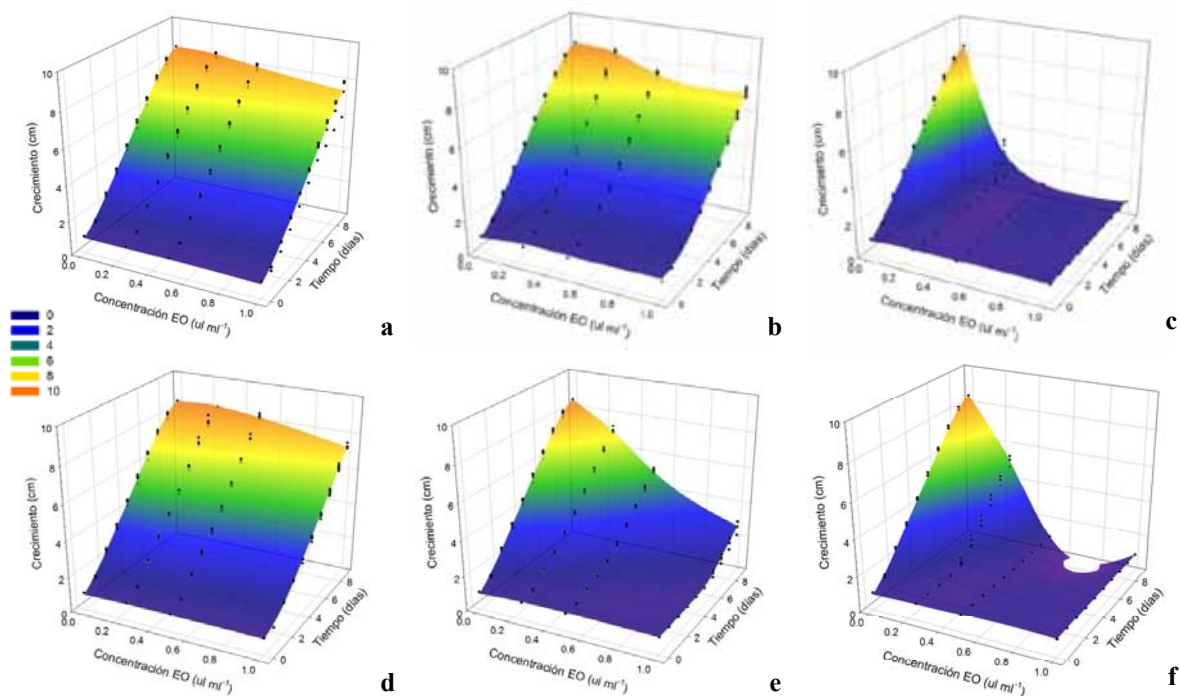


Figura 2. Gráfico de superficie del efecto de diferentes concentraciones de aceites esenciales sobre el crecimiento micelial de *A. alternata*. Aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación. a. limón. b. epazote. c. canela. Aceites esenciales comerciales. d. limón. e. epazote. f. canela. Datos experimentales (◆), datos predichos por el modelo (■).

Figure 2. Surface graph of the effect of different concentrations of essential oils on *A. alternata* mycelial growth. Essential oils obtained by hydrodistillation. a. lime. b. epazote. c. cinnamon. Commercial essential oils. d. lime. e. epazote. f. cinnamon. Experimental data (◆), data predicted by the model (■).

### Modelo de germinación de conidios

Los datos experimentales de germinación de conidios se ajustaron al modelo Logístico. Con los tratamientos evaluados se desarrollaron 5 modelos (Cuadro 5). El RMSE promedio fue 1.98. El incremento en la concentración de AEs afectó la germinación, observándose que a mayor concentración de aceite esencial hubo una menor tasa de incremento en el porcentaje de germinación  $k$  ( $h^{-1}$ ) y un mayor tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación  $r$  (h).

oil by hydrodistillation using a Clevenger-type distiller and obtained yields of 1.0-1.5 %, which were 3 to 5 times higher than the yield obtained in this research using an Italian-type distiller. Similarly, the condition of the plant material (fresh or dry) and the variety, influence yield and their fungicidal/fungistatic effect, which can explain the variation cited in literature (Schmidt, 2009).

Although there are several reports associated with AE composition, the effect of a commercial product has not been compared to that of regional species, such as the ones used in this research. Using

**Cuadro 4. Parámetros obtenidos por el ajuste de los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. Alternata*, incubado en PDA y AEs al modelo de Baranyi y Roberts.**

**Table 4. Parameters obtained by adjusting experimental data of mycelial growth of *A. alternata* incubated in PDA and AEs to the model of Baranyi and Roberts.**

| Tratamiento    | $\mu_{max}$ real<br>(cm día <sup>-1</sup> ) | $\mu_{max} \pm SE$<br>(cm día <sup>-1</sup> ) | $\lambda \pm SE$<br>(días) | R <sup>2</sup> | RMSE |
|----------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|----------------|------|
| Control        | 0.98                                        | 0.99±0.01                                     | 0.48±0.11                  | 0.99           | 0.12 |
| Limón O-0.25   | 1.00                                        | 1.00±0.02                                     | 1.73±0.15                  | 0.99           | 0.23 |
| Limón O-0.5    | 0.99                                        | 0.99±0.01                                     | 2.50±0.08                  | 0.99           | 0.13 |
| Limón O-1.0    | 0.91                                        | 0.91±0.01                                     | 3.36±0.07                  | 0.99           | 0.11 |
| Epazote O-0.25 | 0.98                                        | 0.98±0.01                                     | 1.81±0.11                  | 0.99           | 0.16 |
| Epazote O-0.5  | 0.88                                        | 0.88±0.01                                     | 1.88±0.11                  | 0.99           | 0.14 |
| Epazote O-1.0  | 0.89                                        | 0.89±0.01                                     | 2.28±0.11                  | 0.99           | 0.16 |
| Canela O-0.25  | 0.81                                        | 0.82±0.18                                     | 7.16±0.33                  | 0.69           | 0.31 |
| Limón C-0.25   | 0.95                                        | 0.96±0.01                                     | 0.60±0.11                  | 0.99           | 0.12 |
| Limón C-0.5    | 0.89                                        | 0.89±0.01                                     | 0.87±0.08                  | 0.99           | 0.10 |
| Limón C-1.0    | 0.84                                        | 0.84±0.01                                     | 1.35±0.12                  | 0.99           | 0.14 |
| Epazote C-0.25 | 0.79                                        | 0.79±0.01                                     | 1.48±0.08                  | 0.99           | 0.09 |
| Epazote C-0.5  | 0.64                                        | 0.64±0.01                                     | 2.77±0.08                  | 0.99           | 0.08 |
| Epazote C-1.0  | 0.47                                        | 0.47±0.03                                     | 5.31±0.19                  | 0.94           | 0.14 |
| Canela C-0.25  | 0.78                                        | 0.78±0.03                                     | 3.65±0.21                  | 0.98           | 0.20 |

O-AE obtenido;C-AE comercial; $\mu_{max}$ -tasa máxima de crecimiento;  $\lambda$ -tiempo de fase lag aparente; SE-error estándar; R<sup>2</sup>-coeficiente de determinación; RMSE-raíz del cuadrado medio del error

O-AE obtained;C-AE commercial; $\mu_{max}$ -maximum growth rate;  $\lambda$ - apparent lag phase time; SE-standard error; R<sup>2</sup>-determination coefficient; RMSE- square root mean error

**Cuadro 5. Parámetros obtenidos por el ajuste de los datos experimentales de la germinación de conidios de *A. Alternata*, incubado en contacto directo en AEs al modelo logístico.**

**Table 5. Parameters obtained by adjusting experimental data of conidial germination of *A. alternata* incubated in direct contact with AEs to the logistic model.**

| Tratamiento       | Germinación<br>(%) | k (h <sup>-1</sup> ) | SE    | r (h) | SE    | RMSE |
|-------------------|--------------------|----------------------|-------|-------|-------|------|
| Control           | 98.33              | 0.51                 | 0.08  | 7.66  | 1.95  | 5.28 |
| Limón O. - 0.25   | 7.50               | 4.59                 | >100  | 6.15  | 55.35 | 1.16 |
| Epazote O. - 0.25 | 6.67               | 2.22                 | 20.91 | 7.00  | 15.29 | 0.42 |
| Limón C. - 0.25   | 29.17              | 5.39                 | >100  | 5.98  | 6.05  | 2.54 |
| Limón C. - 0.5    | 9.00               | 4.85                 | >100  | 7.77  | >100  | 1.12 |
| Epazote C. - 0.25 | 11.50              | 5.51                 | >100  | 5.92  | 22.03 | 2.26 |
| Epazote C. - 0.5  | 5.83               | 5.55                 | >100  | 7.34  | >100  | 1.14 |

O-AE obtenido;C-AE comercial; k-tasa de incremento en el porcentaje de germinación; r-tiempo requerido para alcanzar el 50% de germinación; SE-error estándar; RMSE-raíz del cuadrado medio del error

O-AE obtained;C-AE commercial; k-rate of increase in percentage germination; r-time required to reach 50 % germination; SE-standard error; RMSE-square root mean error

## DISCUSIÓN

Los rendimientos que se obtuvieron debido al proceso de hidrodestilación de los AEs fueron inferiores a lo reportado en la literatura. En el caso del aceite esencial de epazote, Jaramillo *et al.* (2012) reportaron un rendimiento de 0.4 %. Mientras que, en el aceite de canela, Golmohammad *et al.* (2012) reportaron un 3.6 % y Saleem *et al.* (2015) y Unlu *et al.* (2010) 0.93 %. Las diferencias en los rendimientos de los AEs evaluados, respecto a lo reportado en la literatura, pueden ser atribuidos a factores como la metodología que se utilizó durante la extracción del aceite esencial y su eficiencia (Schmidt, 2009; Golmakani y Moayyedi, 2015).

Por ejemplo, Hamdani y Allem (2015) y Sharma y Vashist (2015) obtuvieron aceite esencial de limón por el método de hidrodestilación utilizando un destilador tipo Clevenger y alcanzaron un rendimiento de 1.0- 1.5 %, que fue de 3 a 5 veces superior al que se obtuvo en la presente investigación, empleando un destilador tipo italiano. De igual manera el estado del material vegetal (fresco o seco) y la variedad tiene influencia en el rendimiento y su efecto fungicida/fungistático; explicándose con ello la variación citada en la literatura (Schmidt, 2009).

A pesar de que existen diversos reportes asociados con la composición de los AEs, no se había contrastado el efecto de un producto comercial y aquel procedente de especies regionales como las que se emplearon en esta investigación. En este sentido, su empleo en la extracción de AEs y en el control de *A. alternata* es una alternativa viable para el aprovechamiento integral del mismo.

Por otra parte, la reducida capacidad del aceite esencial de limón para inhibir el crecimiento de *A. alternata*, puede ser debido a que contiene D-Limoneno como el componente más abundante; el cual posee una actividad insecticida, pero no

these species to obtain EOs, and evaluate their control on *A. alternata* can be a viable alternative for effectively using them.

On the other hand, the limited capacity of essential lime oil to inhibit *A. alternata* growth may be attributed to its high concentration of D-Limonene, the most abundant component, which has insecticidal but not antimicrobial activity, as reported by Guo *et al.* (2016).

Regarding essential epazote oil, there are no studies about their application to control *A. alternata*. However, its effect has already been evaluated on other microorganisms. Lombardo *et al.* (2016) found limited growth inhibition *in vitro* of *P. citricarpa* at a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>, and Jardim *et al.* (2008) reported total inhibition, among others, of *A. niger*, *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*, at 0.3 % concentration. The effectiveness of epazote oil to control phytopathogenic fungi is attributed to the presence of Ascaridole (Jardim *et al.* 2010). However, in this study, we did not identify this compound in epazote oil obtained by hydrodistillation, but we identified it in commercial oil (27.29 %). This result could explain the higher antifungal activity of the commercial oil (76.6 % inhibition at a concentration of 1.0 µL mL<sup>-1</sup>).

As for essential cinnamon oil, it completely inhibited *in vitro* growth of *A. alternata*; a similar effect was reported by Lu *et al.* (2013) at a concentration of 240 mg mL<sup>-1</sup>. Its effect has also been evaluated in other fungi. Nasir *et al.* (2015) reported growth inhibition of *A. niger* (100 %) at a concentration of 0.08 µL mL<sup>-1</sup>, while Saleem *et al.* (2015) reported 50 % more inhibition in *A. niger* and *A. flavus* at 2 mg mL<sup>-1</sup>. In all reports, Cynamaldehyde was found to be the main compound and responsible for the antifungal activity (Schwab *et al.*, 2008).

Regarding inhibition of the conidial germination, we observed an effect depending

antimicrobiana de acuerdo con lo reportado por Guo *et al.* (2016).

Respecto al aceite esencial de epazote, no existen estudios de su aplicación en el control de *A. alternata*. Sin embargo, ya se ha evaluado su efecto en el crecimiento de otros microorganismos. Lombardo *et al.* (2016) encontraron limitada inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. citricarpa* en concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> y Jardim *et al.* (2008) reportaron una inhibición total en *A. niger*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, entre otros, a una concentración de 0.3 %. La efectividad en el control de hongos fitopatógenos del aceite de epazote se atribuye a la presencia del Ascaridol (Jardim *et al.* 2010). No obstante, en el presente trabajo no se identificó este compuesto en el aceite esencial de epazote que se obtuvo por hidrodestilación, pero sí en el aceite comercial (27.29%), esto podría explicar la mayor actividad antifúngica del aceite comercial (76.6 % de inhibición en concentración de 1.0 µL mL<sup>-1</sup>).

En relación al aceite esencial de canela, este inhibió completamente el crecimiento *in vitro* de *A. alternata* y un efecto similar fue reportado por Lu *et al.* (2013) a una concentración de 240 mg mL<sup>-1</sup>. También se ha evaluado su efecto en otros hongos. Nasir *et al.* (2015) reportaron una inhibición del crecimiento de *A. niger* (100 %) con una concentración de 0.08 µL mL<sup>-1</sup> mientras que, Saleem *et al.* (2015) encontraron una inhibición superior al 50 % en *A. niger* y *A. flavus* a 2 mg mL<sup>-1</sup>. En todos los reportes, el cinamaldehído es el compuesto principal y el responsable de la actividad antifúngica (Schwab *et al.*, 2008).

Respecto a la inhibición de la germinación de conidios se observó un efecto dependiente de la concentración del aceite; es decir, a mayor cantidad de aceite esencial aplicado se observó un menor el porcentaje de germinación. Este fenómeno puede deberse a que los AEs retrasaron el desarrollo del tubo germinativo o causaron la ruptura de la membrana plasmática de los conidios produciendo una

on oil concentration. This means that as more essential oil was applied, germination decreased. This phenomenon may have been produced by EOs by delaying the development of the germ tube or causing rupture of conidia cell membrane, which in turn caused disorganization of the conidia cytoplasm and destroyed organelles (Perina *et al.*, 2014). Lu *et al.* (2013) reported the same effect, with an increased concentration of essential cinnamon oil (20 to 80 µg·mL<sup>-1</sup>), increased *A. alternata* the inhibition of conidial germination from 30 to 100 %.

In this study PCAs facilitated the analysis and grouping of the evaluated EOs according to their chemical composition and source (hydrodistillation or commercial), and allowed to explain their effect on *A. alternata* growth. It was confirmed that essential cinnamon oil (commercial and non-commercial) had different composition compared with the remaining oils. Similarly, Petretto *et al.* (2016) used PCAs based on data of the composition of essential *Myrtus communis* oil and classified different specimens and wild varieties, finding the more representative compounds of each variety. Furthermore, in a study conducted by Méndez-Tovar *et al.* (2016) PCA allowed to analyze the influence of the harvest year on the chemical composition of EOs from *Thymus mastichina*, *Salvia lavandulifolia* and *Lavandula latifolia* populations.

Given the extent of the study and data obtained about mycelial growth and conidial germination, the use of mathematical tools is useful to appreciate the combined effect of different doses and essential oils during time. The use of mathematical modeling in *A. alternata* is innovative, so it can allow us to reduce analysis time, estimate its behavior considering diverse factors and optimize processes associated with fungal control.

There are already reports on the use of mathematical models based on Baranyi and Roberts

desorganización del citoplasma y destrucción de organelos (Perina *et al.*, 2014). En el trabajo de Lu *et al.* (2013) se presentó el mismo efecto, con un aumento en la concentración de aceite esencial de canela (20 a 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en el cual se incrementó la inhibición de germinación de conidios de *A. alternata* de 30 a 100 %.

La aplicación del ACP en este trabajo, facilitó el análisis y agrupación de los AEs evaluados de acuerdo a su composición química y su procedencia (hidrodestilación o comercial) y con ello fue posible explicar su efecto sobre el crecimiento *A. alternata*. Se confirmó que el aceite de canela (comercial y no-comercial) fue diferente en composición en comparación con el resto de los aceites. De manera similar, Petretto *et al.* (2016) realizaron un ACP con los datos de composición del aceite esencial de *Myrtus communis* y lograron clasificar diferentes especímenes de variedades cultivadas y silvestres, encontrando los compuestos más representativos para cada una de las variedades. Asimismo, en el trabajo de Méndez-Tovar *et al.* (2016) el ACP permitió analizar la influencia del año de cosecha sobre la composición química de los AEs de poblaciones de *Thymus mastichina*, *Salvia lavandulifolia* y *Lavandula latifolia*.

Debido a la magnitud del estudio y datos generados sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios, el empleo de herramientas matemáticas permite apreciar el efecto combinado de diferentes dosis y aceites, a través del tiempo. El empleo del modelamiento matemático en el hongo *A. alternata*, es algo novedoso, lo cual permitirá reducir tiempos de análisis de datos, estimar comportamientos considerando diversos factores y optimizar procesos asociados con el control del hongo.

Ya se ha reportado el uso de modelos matemáticos basados en la función de Baranyi y Roberts

function to model *P. expansum* data of mycelial growth on PDA, adding betel leaf oil (*Piper betle*). Results from this experiment showed that higher concentrations of essential oil in the medium culture decreased the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) and increased the apparent lag phase time ( $\lambda$ ) (Basak and Guha, 2015). Similarly, Marín *et al.* (2008) and Tremarin *et al.* (2015) used fungal growth models based on Baranyi and Roberts equation but without a restrictive agent (essential oil) in the culture medium. Instead, they modified the parameters of the culture medium (temperature and pH). The study showed an effect of the modification to the parameters of the culture, on the parameters of the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) and apparent lag phase time ( $\lambda$ ). Dantigny *et al.* (2007) and Basak and Guha (2015) also used mathematical modeling (logistics model) in spore germination of phytopathogens such as *P. expansum* and *P. verrucosum*.

## CONCLUSIONS

Mycelial growth and conidial germination of *A. alternata* was affected by the use of cinnamon oil at concentrations of 0.5 and 1  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  regardless of its source (commercial and non-commercial). On the other hand, data analysis using principal components resulted to be an appropriate methodology to group the EOs, that were evaluated according to their chemical composition, and thereby explaining their fungicidal or fungistatic effect. Finally, by using mathematical modeling it was established that as the concentrations of essential oil increased in the culture medium, the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) decreased and the apparent lag phase time ( $\lambda$ ) increased.

para modelar los datos de crecimiento micelial de *P. expansum* cultivado en PDA con aceite esencial de la hoja de betel (*Piper betle*), observándose que a mayor concentración de aceite esencial en el medio de cultivo, se presentó una disminución en la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente ( $\lambda$ ) (Basak y Guha, 2015). De igual manera, Marín *et al.* (2008) y Tremarin *et al.* (2015) presentaron modelos de crecimiento de hongos basados en la ecuación de Baranyi y Roberts pero sin un agente restrictivo (aceite esencial) en el medio de cultivo, sino modificando de los parámetros de cultivo como temperatura y pH. En el estudio se observó un efecto de la modificación de parámetros de cultivo sobre los parámetros la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y tiempo de fase lag aparente ( $\lambda$ ). Adicionalmente Dantigny *et al.* (2007) y Basak y Guha (2015) emplearon el modelamiento matemático (modelo logístico) en la germinación de esporas de fitopatógenos como *P. expansum* y *P. verrucosum*.

## CONCLUSIONES

El crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*, se afectó por el uso de aceite de canela en concentraciones de 0.5 y 1  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , independientemente de su procedencia (comercial y no comercial). Por otra parte, el análisis de datos a través de componentes principales resultó ser una metodología apropiada para agrupar los AEs que se evaluaron en función de su composición química y con ello explicar el efecto fungicida o fungistático de los mismos. Finalmente, a través del modelamiento matemático se estableció que, a mayor concentración de aceite esencial en el medio de cultivo, se presenta una disminución en la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente ( $\lambda$ ).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank M.S. Gabriel Flores Franco, curator at UAEM's Herbarium for his support to identify the vegetal species used in this study, and to Dra. Mayra Beatriz Gómez Patiño from IPN's Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías for her support to analyze the chemical composition of the EOs used.

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

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M. en C. Gabriel Flores Franco, curador del Herbario de la UAEM por su apoyo en la identificación de las especies vegetales y a la Dra. Mayra Beatriz Gómez Patiño del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN por su apoyo en el análisis de la composición química de los AEs.

## LITERATURA CITADA

- Badawy M and Abdelgaleil S. 2014. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products* 52:776-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>
- Baranyi J and Roberts T. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277-294. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90157-0
- Basak S and Guha P. 2015. Modelling the effect of essential oil of betel leaf (*Piper betle* L.) on germination, growth, and apparent lag time of *Penicillium expansum* on semi-synthetic media. *International Journal of Food Microbiology* 215:171-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.019>
- Baser K and Buchbauer G. eds. 2009. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press. NW-USA, 975p. [https://ttnmai.files.wordpress.com/2012/09/handbookof\\_essentialoil.pdf](https://ttnmai.files.wordpress.com/2012/09/handbookof_essentialoil.pdf)
- Bautista-Baños S, Barrera-Necha L, Hernandez-Lauzardo A, Velázquez-Del Valle M, Alia-Tejagal I y Guillén-Sánchez

- D. 2008. Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium* spp. Revista UDO Agrícola 8:42-51. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08006>
- Chen Q, Xu S, Wu T, Guo J, Sha S, Zheng X and Yu T. 2014. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. Journal of the Science of Food and Agriculture 94:2441-2447. DOI: 10.1002/jsfa.6576
- Costa L, Pinto J, Bertolucci S, Costa J, Alves P and Niculau E. 2015. antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. Revista Ciência Agronômica 46:428-435. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>
- Dantigny P, Marin S, Beyer M and Magan N. 2007. Mould germination: data treatment and modelling. International Journal of Food Microbiology 114:17-24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.002
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M y Robledo C. 2008. InfoStat manual de usuario. Grupo InfoStat, FCA. 333p.
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz M, de la Cruz-Marcial J, Sánchez-Alonso M y López-Morales V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Revista Fitotecnica Mexicana 36:405-411. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029714006>
- Dima C and Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. Current Opinion in Food Science 5:29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Dimić G, Kocić-Tanackov S, Mojović L and Pejin J. 2014. Antifungal activity of lemon essential oil, coriander and cinnamon extracts on foodborne molds in direct contact and the vapor phase. Journal of Food Processing and Preservation 1-10. DOI:10.1111/jfpp.12410
- García D, Ramos A, Sanchis V and Marín S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: a review. Food Microbiology 26:757-769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.014>
- García D, Ramos A, Sanchis V and Marín S. 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. Food Microbiology 27:909-917. DOI:10.1016/j.fm.2010.05.015
- Golmakani M and Moayyedi M. 2015. Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel. Food Science & Nutrition 3:506-518. DOI: 10.1002/fsn3.240
- Golmohammad F, Eikani M and Maymandi H. 2012. Cinnamon bark volatile oils separation and determination using solid-phase extraction and gas chromatography. Procedia Engineering 42:247-260. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.416
- Guo S, Zhang W, Liang J, You C, Geng Z, Wang C and Du S. 2016. Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. Molecules 21:504. DOI: 10.3390/molecules21040504
- Hamdani F and Allem R. 2015. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. Phytothérapie 1-4. DOI: 10.1007/s10298-015-0978-3
- Jaramillo B, Duarte E y Delgado W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17:54-64. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v17n1/pla06112.pdf>
- Jardim C, Jham G, Dhingra O and Freire M. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Chemical Ecology 34:1213-1218. DOI: 10.1007/s10886-008-9526-z
- Jardim C, Jham G, Dhingra O and Freire M. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of the Brazilian Chemical Society 21:1814-1818. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010001000004>
- Krisch J, Rentsenkhand T and Vágölygi C. 2011. Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. Formatex research center. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances Microbiology 1135-1142.
- Lombardo P, Guimaraens A, Franco J, Dellacassa E and Faggiani E. 2016. Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 121:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.002>
- Longhi D, Dalcanton F, Fálcao G, Mattar B and Borges J. 2013. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. Journal of Theoretical Biology 335:88-96. DOI: 10.1016/j.jtbi.2013.06.030
- Lu M, Han Z, Xu Y and Yao L. 2013. Effects of essential oils from Chinese indigenous aromatic plants on mycelial growth and morphogenesis of three phytopathogens. Flavour and Fragrance Journal 28:84-92. DOI: 10.1002/ffj.3132
- Mamgain A, Roychowdhury R and Tah J. 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. Research Journal of Biology 1:1-9. [https://www.researchgate.net/publication/26665233\\_1\\_REVIEW\\_Alternaria\\_pathogenicity\\_and\\_its\\_strategic\\_controls](https://www.researchgate.net/publication/26665233_1_REVIEW_Alternaria_pathogenicity_and_its_strategic_controls)
- Manganyi M, Regnier T and Olivier E. 2015. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. South African Journal of Botany 99:115-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.192>
- Marín S, Cuevas D, Ramos A and Sanchis V. 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. International Journal of Food Microbiology 121:139-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.030>
- McCarroll N, Protzel A, Ioannou Y, Stack F, Jackson M, Waters M and Dearfield K. 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. Review. Mutation Research 512:1-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00026-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00026-1)
- Méndez-Tovar I, Novak J, Sponza S, Herrero B and Asensio-S-Manzanera M. 2016. Variability in essential oil composition of wild populations of Labiatae species collected in Spain. Industrial Crops and Products 79:18-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.009>

- Mora-Aguilera G and Campbell C. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. In Franc L and Neher D. eds. Exercises in plant disease epidemiology. APS Press 51-58
- Nasir M, Tafess K and Abate D. 2015. Antimicrobial potential of the ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. BMC Complementary and Alternative Medicine 15:1. DOI: 10.1186/s12906-015-0784-3
- Perina F, Amaral D, Fernandes R, Labory C, Teixeira G and Alves E. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. Pest Management Science 71:1371-1378 DOI: 10.1002/ps.3933
- Petretto G, Maldini M, Addis R, Chessa M, Foddai M, Rourke J and Pintore G. 2016. Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. *Leucocarpa* DC and var. *Melanocarpa* DC. Food Chemistry 197:124-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.056>
- Raut J and Karuppaiyil S. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products 62:250-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Saleem M, Bhatti H, Jilani M and Hanif M. 2015. Bioanalytical evaluation of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. Natural Product Research 29:1857-1859. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.1002088>
- Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A and Cháfer M. 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. Food Engineering Reviews 3:1-16. DOI 10.1007/s12393-010-9031-3
- Schmidt E. 2009. Production of essential oils. In Baser K and Buchbauer G. eds. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press 83-119. DOI: 10.1201/b19393-6
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R and Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. The Plant Journal 54:712-732. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x
- Sharma D and Vashist H. 2015. Hydrodistillation and comparative report of percentage yield on leaves and fruit peels from different citrus plants of rutaceae family. Journal of Plant Sciences 10:75-78. DOI: 10.3923/jps.2015.75.78
- Sivakumar D and Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Review. Crop Protection 64:27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Terrádez M. 2002. Análisis de componentes principales. Proyecto e-Math. Universitat Oberta de Catalunya. [www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes\\_principales.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf) (consulta, febrero 2017)
- Tremarin A, Longhi D, Martins B and Falcão G. 2015. Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. International Journal of Food Microbiology 193:23-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.006>
- Troncoso-Rojas R and Tiznado-Hernández M. 2014. *Alternaria alternata* (black rot, black spot). In Bautista-Baños S. ed. Postharvest decay: control strategies. Elsevier 87-147. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Unlu M, Ergene E, Unlu G, Zeytinoglu H and Vural N. 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and Chemical Toxicology 48:3274-3280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.001>



# Effects of climatological factors on fluctuation of spores in mango trees cv. Ataulfo, in Guerrero, México

## Efecto de factores climatológicos sobre la fluctuación de esporas en árboles de mango cv. Ataulfo en Guerrero, México

**David Heriberto Noriega-Cantú**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Iguala, Carretera Iguala-Tuxpan km. 2.5 Iguala, Guerrero. CP 40000, **Juan Pereyda-Hernández**, Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Carretera Iguala-Teloloapan, Iguala, Guerrero. CP 40040, **Eduardo Raymundo Garrido-Ramírez\***, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Centro de Chiapas, Km 3.0 carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla, Chiapas. CP 29140. \*Autor para correspondencia: egarrido\_ramirez@hotmail.com.

**Recibido:** 26 de Octubre, 2016.

**Aceptado:** 9 de Febrero, 2017.

Noriega-Cantú DH, Pereyda-Hernández J, Garrido-Ramírez ER. 2017. Effects of climatological factors on fluctuation of spores at mango trees cv. Ataulfo, Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 227-241. **DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1610-1

Primera publicación DOI: 28 de Marzo, 2017.

First DOI publication: March 28, 2017.

**Resumen.** Se determinó la fluctuación estacional de esporas de los principales hongos patógenos del mango en San Jerónimo, Guerrero, México. Durante el período de octubre 2011 a diciembre 2012 se cuantificaron las esporas totales de *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Lasiodiplodia* sp. a nivel de copa de los árboles de mango. Las esporas totales capturadas se presentaron durante todo el periodo de estudio, con variación mensual; detectando picos poblacionales en septiembre y octubre, durante la etapa de prefloración, con 1,844 esporas

**Abstract.** The seasonal fluctuation of spores of the principal pathogens of mango was determined in San Jerónimo, Guerrero, Mexico. During the period October 2011 to December 2012 quantifications of total spores of *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. and *Lasiodiplodia* sp., were made at tree canopy level. Captured total spores occurred throughout the study period, with monthly variation; detecting peaks in September and October during the pre-flowering stage, with 1,844 total spores/week. Other peaks are in the second week of November, the third week of January and April, flowering and fruit growth, with 531, 648 and 1,139 total spores/week respectively. Low populations occur in May, June, July and August, during vegetative growth. The largest populations of *Cladosporium* sp., spores (1,533 spores/week), were in October coinciding with *Colletotrichum* sp., (160 spores/week). To *Lasiodiplodia* sp. the highest concentration was in September with 92 spores/week. The relative humidity was correlated with populations of

totales/semana. Otros picos fueron en la segunda semana de noviembre, la tercera semana de enero y abril, en floración y crecimiento de frutos, con 531, 648 y 1,139 esporas totales/semana respectivamente. Las bajas poblaciones ocurrieron en mayo, junio, julio y agosto, durante el crecimiento vegetativo. La mayor población de esporas de *Cladosporium* sp. (1,533 esporas/semana) y *Colletotrichum* sp. (160 esporas/semana) fue en octubre, mientras que para *Lasiodiplodia* sp. fue en septiembre (92 esporas/semana). La humedad relativa fue correlacionada con poblaciones de *Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.011$ ), *Lasiodiplodia* sp. ( $\alpha < 0.009$ ) y esporas totales ( $\alpha < 0.035$ ). El Punto de rocío fue correlacionado con *Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.008$ ) y esporas totales ( $\alpha < 0.059$ ). La tasa de lluvia mostró una correlación positiva con *Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.002$ ) y *Lasiodiplodia* sp. ( $\alpha < 0.031$ ). Utilizando esta información se proponen modificaciones al manejo convencional de enfermedades como antracnosis, atizonamiento y pudrición del pedicelo.

**Palabras clave:** *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia*, clima.

México es el quinto país productor de mango en el mundo y el segundo como exportador con 19.6 % (232,643 ton), después de la India con 24 % (286,775 ton) (FAO, 2016). A nivel nacional el estado de Guerrero aporta el 20 % (356,291 ton) de la producción nacional, lo que lo ubica como primer productor de mango, seguido de Sinaloa (302,091 ton), Nayarit (252,394 ton), Chiapas (215,008 ton), Michoacán (155,360 ton), Oaxaca (146,029 ton) y Veracruz (118,544 ton). La substancial colaboración en la producción nacional, implica que el cultivo del mango tiene una importancia económico-social para Guerrero, ya que de esta actividad dependen directamente productores

*Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.011$ ), *Lasiodiplodia* sp. ( $\alpha < 0.009$ ) and total spores ( $\alpha < 0.035$ ). The dew point was correlated with *Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.008$ ) and total spores ( $\alpha < 0.059$ ). The rain rate was positively correlated with *Colletotrichum* sp. ( $\alpha < 0.002$ ) and *Lasiodiplodia* sp. ( $\alpha < 0.031$ ). Using this information, modifications are proposed to the conventional management of diseases such as anthracnose and peduncle blight and rot.

**Key words:** *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia*, weather.

Mexico is the country with the fifth largest production of mango worldwide, and the second largest exporter, with 19.6 % (232,643 ton), after India with 24 % (286,775 ton) (FAO, 2016). Nationwide, the state of Guerrero provides 20 % (356,291 ton) of the country's production, placing it as the first producer of mango, followed by Sinaloa (302,091 ton), Nayarit (252,394 ton), Chiapas (215,008 ton), Michoacán (155,360 ton), Oaxaca (146,029 ton) and Veracruz (118,544 ton). The substantial collaboration in the national production implies that the production of mango has an economic and social importance for Guerrero, since rural producers depend directly on this activity, and suppliers and people who can use the workforce depend on it indirectly. The region with the highest production and surface planted in the state of Guerrero is the Coast (SAGARPA, 2016); 33 % of its surface is covered with the variety Manila, followed by Ataulfo and Haden, and 30 and 16 %, respectively. The presence of mango diseases caused by pathogenic fungi and their impact on the production and quality of fruits has been widely studied by several authors (Ploetz, 2003; Acosta-Ramos *et al.*, 2003; Guillén-Sánchez *et al.*, 2007; Huerta-Palacios *et al.*, 2009; Noriega-Cantú *et al.*, 1999).

rurales e indirectamente proveedores y personas que pueden emplear su mano de obra. La región de mayor producción y superficie sembrada en el estado de Guerrero es la Costa del estado (SAGARPA, 2016); el 33 % de la superficie está cubierta con variedad Manila, seguidas por Ataulfo y Haden, con 30 y 16 %, respectivamente.

La presencia de enfermedades del mango, causadas por hongos fitopatógenos y su impacto en la producción y calidad de los frutos ha sido ampliamente estudiada por varios autores (Ploetz, 2003; Acosta-Ramos *et al.*, 2003; Guillén-Sánchez *et al.*, 2007; Huerta-Palacios *et al.*, 2009; Noriega-Cantú *et al.*, 1999).

*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., es el agente causal de la antracnosis del mango y causa graves pérdidas económicas a los productores de este y otros cultivos de regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se reporta como un patógeno que afecta hojas, inflorescencias y frutos en las regiones productoras de México, siendo el daño más importante en poscosecha (Ploetz, 2003; Acosta-Ramos *et al.*, 2003). Fitzell y Peak (1984) determinaron que las esporas son la fuente de inóculo más importante en Australia, los cuales se producen sobre ramas terminales, inflorescencias momificadas, brácteas florales y hojas. Bajo condiciones de laboratorio las esporas se producen en un amplio rango de temperatura (10-30 °C) y humedades relativas de 95-97 %. En el Soconusco, Chiapas el daño más fuerte es el atizomamiento de inflorescencias en el cv. Ataulfo, que se presenta durante los meses de noviembre a febrero, después que termina la época de lluvias (Benítez-Camilo *et al.*, 2003).

*Cladosporium tenuissimum* Cooke se reporta como agente causal de la necrosis en flores, pedicelos y frutos pequeños en las panículas inoculadas de mango cv. Haden, este patógeno se reporta por primera vez a lo largo de la costa de los estados de

*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. is the causal agent of anthracnose in mango, and it causes severe economic losses to farmers of this and other crops in tropical and subtropical regions of the world. It is reported as a pathogen that affects leaves, inflorescences and fruits in the producing regions in Mexico, with the most important damage in postharvest (Ploetz, 2003; Acosta-Ramos *et al.*, 2003). Fitzell and Peak (1984) determined that spores are the most important source of inoculant in Australia, and are produced on terminal branches, mummified inflorescences, flower bracts, and leaves. Under laboratory conditions, spores are produced in a wide range of temperatures (10-30 °C) and relative humidity of 95-97 %. In the Soconusco, Chiapas, the greatest damage was the blighting of inflorescences in the cv. Ataulfo, which takes place between November and February, after the rainy season has ended (Benítez-Camilo *et al.*, 2003).

*Cladosporium tenuissimum* Cooke is reported as the causal agent of necrosis in flowers, peduncles and small fruits in the inoculated panicle of cv. Haden mango. This pathogen was reported for the first time along the coast of the states of Guerrero and Michoacán, Mexico. The organs affected were covered with a gray cotton-like mycelium, and a grayish-olive green sporulation. After its identification, the molecular characteristics represented *C. tenuissimum* (Guillén-Sánchez *et al.*, 2007).

*Lasiodiplodia theobromae* Pat. is reported as the main causal agent of peduncular rotting in Costa Rica, and is considered the second most important disease after anthracnose; the fungus colonizes branch tissues endophytically before the establishment of inflorescences and weeks after flowering, it can reach the fruit's peduncle, despite indications that these infections remain latent until the fruit ripens and the symptoms of the disease begin (González *et al.*, 1999). Acosta-Ramos *et al.* (2003)

Guerrero y Michoacán, México. Los órganos afectados se cubrieron con un micelio algodonoso gris y una esporulación olivácea verde gris. Después de la identificación, las características moleculares representaron a *C. tenuissimum* (Guillén-Sánchez *et al.*, 2007).

*Lasiodiplodia theobromae* Pat. es reportado como el principal agente causal de la pudrición peduncular en Costa Rica y es considerada como la segunda enfermedad más importante después de la antracnosis; el hongo logra colonizar endófitamente el tejido de ramas antes del establecimiento de las inflorescencias y semanas después de la floración puede alcanzar el pedicelo del fruto, no obstante indican que estas infecciones permanecen latentes hasta que la fruta madura e inician los síntomas de la enfermedad (González *et al.*, 1999). Acosta-Ramos *et al.* (2003) lo reportan como el patógeno que causa la pudrición del pedicelo, una de las principales enfermedades de los frutos de mango en postcosecha en México. Así también, Ali *et al.* (2004), lo reportaron como el agente causal de la declinación o muerte descendente de las ramas, acompañado de abundante exudación de goma rojiza en tallos y ramas, con un bronceado de los tejidos vasculares. El conocimiento de la disponibilidad y dispersión de inóculo de los hongos fitopatógenos, así como de los factores ambientales que favorecen la liberación de esporas es fundamental para determinar los períodos de riesgo de infección y para implementar medidas preventivas de control. El objetivo de este trabajo fue estudiar la fluctuación estacional de esporas de los principales hongos fitopatógenos del mango en Guerrero y su relación con las variables climáticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó por un periodo de 14 meses, de la etapa previa a la floración hasta la producción

report it is the pathogen that causes the rotting of the peduncle, one of the main diseases of mango fruit in postharvest in Mexico. Likewise, Ali *et al.* (2004) report it as the causal agent of the declination or descending death of branches, along with an abundant exudation of a reddish sap in stems and branches, with a tanning of vascular tissues. The knowledge of the availability and dispersion of inoculant of pathogenic fungi, as well as of the environmental factors that favor the release of spores is crucial to determine the periods of risk of infection and to implement preventive control measures. The aim of this investigation was to study the seasonal fluctuation of spores of the main pathogenic fungi of mangoes in Guerrero and their relation with weather conditions.

## MATERIALS AND METHODS

The work was carried out in a period of 14 months, from the stage before flowering to the summer production and the beginning of the next flowering cycle (October 2011 to December 2012), in a mango orchard (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo, aged eight years, with distances between trees of 7 x 7 m, in San Jerónimo, in the municipality of Benito Juárez, in the Costa Grande region, in Guerrero, (18° 15' 38.3" North and 99° 28' 53" from West, 30 m above sea level), which presents a warm subhumid climate (Aw1) (García, 1988).

### Management of the orchard

The orchard was managed as follows: fertigation of N, P, and K, with the formula 120-40-80 fractioned in three applications; biofertilizer, *Rhizophagus irregularis* (= *Glomus intraradices*), and *Azospirillum brasilenses*, 1.3 kg ha<sup>-1</sup>; dolomite (Ca 53 % y Mg 44 %) 980 kg ha<sup>-1</sup>; foliar fertilizer,

de verano y el inicio del siguiente ciclo de floración (octubre 2011 a diciembre 2012), en un huerto de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo, de ocho años de edad, con distancias entre árboles de 7x7 m, en la localidad de San Jerónimo, municipio de Benito Juárez, en la Región de la Costa Grande de Guerrero, (18° 15' 38.3" Norte y 99° 28' 53" de Oeste, a 30 m de altitud), que presenta un clima cálido subhúmedo (Aw1) (García, 1988).

### Manejo de la huerta

En la huerta se utilizó el siguiente manejo: aplicación en fertirriego de N, P y K, con la fórmula 120-40-80 fraccionado en tres aplicaciones; biofertilizante, *Rhizophagus irregularis* (= *Glomus intraradices*) y *Azospirillum brasilenses*, 1.3 kg ha<sup>-1</sup>; dolomita (Ca 53 % y Mg 44 %) 980 kg ha<sup>-1</sup>; fertilizante foliar, 2 L ha<sup>-1</sup> de micronutrientos quelatados, con tres aspersiones; manejo periódico de riegos, 6 horas cada tercer día durante noviembre a mayo, por sistema de microaspersión, manteniendo a capacidad de campo el área de goteo del árbol; manejo de plagas y enfermedades con siete aplicaciones de fungicidas e insecticidas químicos.

### Dispersión de esporas

Durante un período de 14 meses de estudio se examinó la abundancia de esporas en el aire, a nivel de la copa de los árboles, en la huerta experimental, utilizando una trampa volumétrica tipo Burckard con un registro de 7 días (Gadoury y MacHardy, 1983). La trampa de esporas se colocó en el centro de la parcela experimental, a 2 m de altura en el primer tercio de la copa del árbol. Las esporas fueron impactadas sobre un tambor cilíndrico, cubierto por una cinta transparente donde fueron depositadas, la cinta fue cortada en secciones de 39.5 mm correspondientes a cada período de 24 horas y montada sobre un portaobjetos. El conteo

2 L ha<sup>-1</sup> of chelated micronutrients, with three applications; periodical irrigation management, 6 hours every three days between November and May, using a micro spraying system, keeping the tree's drip area within field capacity; management of pests and diseases with seven doses of chemical fungicides and insecticides.

### Spreading of spores

In a period of 14 months of study, we examined the abundance of spores in the air, at the treetop level, in the experimental orchard, using a Burckard volumetric trap with a 7-day register (Gadoury and MacHardy, 1983). The spore trap was placed in the center of the experimental field, at a height of 2 m in the first third of the tree canopy. The spores were impacted on a cylindrical drum covered by transparent tape where they were deposited; the tape was cut into 39.5 mm sections that corresponded to each 24-hour period, and placed on a slide. Spores were counted in three transects at a 400x magnification, calculating the average observed per day. At least five spores were observed, another three transects were counted, and the average was calculated to report the concentration of spores accumulated in seven days. The trap was operated on a daily basis during flowering, setting and growth of the fruits.

The weather data were obtained using a Davis Vantage PRO2 weather station, which recorded the variables of temperature, relative humidity, wind speed and dew point. The weather variables were used to calculate the number of hours with relative humidity equal to or higher than 90, 80, 70, and 60 %, cold hours at 20 and 18 °C (HF20 and HF18).

### Isolation of fungi

From November to December 2011 and January 2012, five trees were chosen at random,

de esporas fue realizado en tres transectos a 400x de aumento, calculando el promedio observado por día. Cuando menos de cinco esporas fueron observadas, otros tres transectos fueron contados y se calculó el promedio; para reportar la concentración de esporas acumuladas en siete días. La trampa fue operada diariamente durante la floración, amarre y crecimiento de los frutos.

Los datos meteorológicos fueron obtenidos usando una estación meteorológica Davis Vantage PRO2, registrándose las variables temperatura, humedad relativa, dirección y velocidad del viento y punto de rocío. Con las variables climatológicas se realizaron los cálculos para estimar el número de horas con humedad relativa igual o mayor a 90, 80, 70 y 60 %, horas frío a 20 y 18 °C (HF20 y HF18).

### **Aislamientos de hongos**

De noviembre a diciembre 2011 y enero 2012, se seleccionaron cinco árboles al azar tomando en cuenta el tamaño, edad y apariencia uniforme, en los cuales se seleccionaron cuatro ramas, orientadas en cada punto cardinal, a una altura de 1.0 A 1.8 m, muestreando mensualmente una inflorescencia por rama, con síntomas de atizonamiento, las cuales se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Guerrero, para el aislamiento de hongos presentes en raquis y pétalos de las inflorescencias afectadas. Los aislamientos fueron realizados sobre cajas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar (PDA) y se obtuvieron subcultivos desde los márgenes de las colonias en crecimiento. Se realizaron cultivos monoconidiales por la técnica de rayado en placa de agar. La identificación morfológica de los aislamientos obtenidos se realizó con las claves de Ellis (1971), Barnett y Hunter (1998) y Heuchert *et al.* (2005).

considering size, age, and uniform appearance, from which four branches were chosen, each pointing at a different cardinal point, at a height of 1.0 to 1.8 m, sampling one inflorescence per branch monthly, with symptoms of smutting and which were transferred to the Plant Pathology Lab of the Universidad Autónoma de Guerrero for the isolation of fungi present in rachis and petals of the affected inflorescences. The isolations were carried out over Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) and subcultures were obtained from the edges of the cultures in growth. Monoconidial cultures were carried out using the streak agar plate technique. Morphometric identification of obtained isolates was carried out by using the codes by Ellis (1971), Barnett and Hunter (1998), and Heuchert *et al.* (2005).

### **Statistical analysis**

Descriptive statistics were used to analyze the fluctuation of the weekly spore population. Correlation analyses (Pearson) were carried out between the density of the spores and the environmental variables, using the program SAS version 9.3 for Windows (SAS Institute 2010).

## **RESULTS**

In the trees of the experimental plot there were 6 flowering stages, which appeared in the period between late November and early February. Fruit setting was recorded between December 2012 and February 2013 and the fruit was harvested in March-April.

## Análisis estadístico

Se usaron estadísticas descriptivas para el análisis de fluctuación de las poblaciones de esporas semanales. Se realizaron análisis de correlación (Pearson) entre la densidad de esporas y las variables ambientales, utilizando el programa SAS versión 9.3 para Windows (SAS institute 2010).

## RESULTADOS

En los árboles de la parcela experimental se tuvieron 6 flujos de floración, los cuales se presentaron en el periodo de finales de noviembre hasta principios de febrero. El amarre de frutos se registró desde diciembre 2012 hasta febrero 2013 y la cosecha de la fruta se efectuó en marzo-abril.

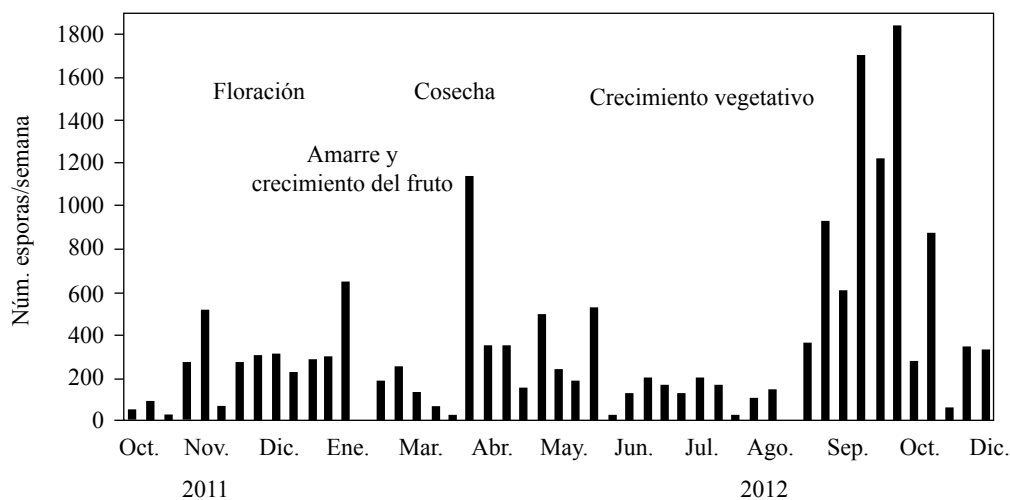
### Dispersión de esporas

La Figura 1 muestra la fluctuación de esporas totales capturadas, donde se observa la presencia de esporas durante casi todo el ciclo, de floración, cosecha y crecimiento vegetativo, con una clara variación mensual. Al final de la etapa de crecimiento vegetativo de verano, en prefloración, se registró la más alta población con 1,844 esporas durante septiembre y octubre. En la etapa de floración y crecimiento de frutos, la mayor captura se presentó en la tercera semana de abril con 1,139 esporas, seguida por la tercera y segunda semana de enero y noviembre con 648 y 531 esporas respectivamente. Las más bajas poblaciones ocurrieron en mayo, junio, julio y agosto, cuando se presenta el crecimiento vegetativo de verano y gran parte del periodo de lluvias.

También se muestra la dispersión de esporas de *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Lasiodiplodia* sp. Las esporas de *Colletotrichum* sp. y

### Dispersion of spores

Figure 1 shows the total fluctuation of spores captured, where we can notice the presence of spores throughout almost all the cycle of flowering, harvest, and vegetative growth, with a clear monthly variation. At the end of the stage of vegetative growth, in preflowering, the highest population was recorded, with 1,844 spores in September and October. In the stage of flowering and fruit growth, the highest capture took place in the third week of April with 1,139 spores, followed by the third and second weeks of January and November with 648 and 531 spores, respectively. The lowest populations were found in May, June, July, and August, when the vegetative growth of summer and most of the rainy season takes place. Also shown are the spore dispersions of *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. The *Colletotrichum* sp. and *Cladosporium* sp. Spores have similar dispersions during the planting cycle, although *Cladosporium* sp. displayed a greater amount of spores caught. The highest peaks of both fungi appeared in September, October, April, and early June; practically since preflowering, the beginning of flowering until the end of the fruit harvest. In the case of *Lasiodiplodia* sp., the greatest spore populations appeared in September, October, and April, in preflowering, at the end of the fruit setting period and in the middle of the period of harvesting. These greater populations of spores from three fungi corresponds to the lowest temperatures in the dew point of 23.7, 23.7, 20.1, 18.2, and 23.1 °C corresponding to September, October, January, April, and June, where the existing water vapor begins to condense upon reaching these temperatures to form dew or fog. These increases also coincide with the humidity values above 75 % (Figure 2), excellent conditions for the formation and the release of spores.



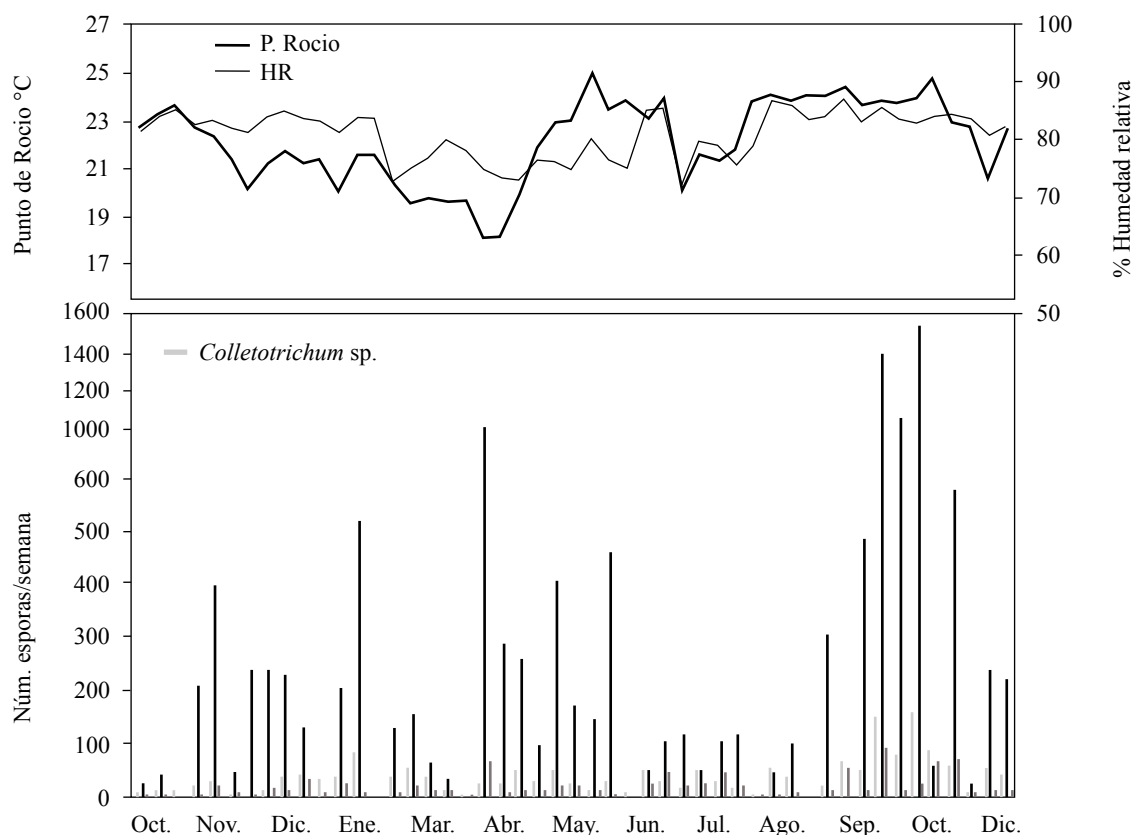
**Figura 1. Captura de esporas totales durante octubre 2011 a diciembre 2012, en la huerta de mango Aaulfo, San Jerónimo, Municipio Benito Juárez, Guerrero, México.**  
**Figure 1. Total capture of spores from October 2011 to December 2012, in the Aaulfo mango orchard, San Jerónimo, Municipality of Benito Juárez, Guerrero, Mexico.**

*Cladosporium* sp., tienen dispersiones similares durante el ciclo del cultivo, no obstante, *Cladosporium* sp. mostró mayores cantidades de esporas atrapadas. Los picos más altos de ambos hongos se presentaron en septiembre, octubre, enero, abril y principios de junio; prácticamente desde prefloración, inicio de la floración hasta finales de la cosecha de fruta. En el caso de *Lasiodiplodia* sp., las mayores poblaciones de esporas se presentaron en septiembre, octubre y abril, en prefloración, al final del periodo de amarre de fruta y a mediados del periodo de cosecha. Estas mayores poblaciones de esporas de los tres hongos, corresponde a las temperaturas más bajas de punto de rocío de 23.7, 23.7, 20.1, 18.2 y 23.1 °C correspondientes a septiembre, octubre, enero, abril y junio, en donde el vapor de agua existente comienza a condensarse al alcanzar estas temperaturas, para la formación de rocío o niebla. Estos incrementos también coinciden con los valores arriba del 75 % de humedad (Figura 2). Condiciones excelentes para la formación y liberación de esporas.

The highest spore populations were found in the genus *Cladosporium* with 1,533 spores/week in October, which coincided with the period for *Colletotrichum* with 160 spores/week. On the other hand, the highest concentration for *Lasiodiplodia* was observed in September, with 92 spores/week. In these months, the phenological state of mango is preflowering.

The correlation analysis was applied considering the quantification of *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia* spores, total spores, and the weather parameters reported on the same evaluation period. The correlation coefficient was significant in three weather variables (Table 1). The weather variables that best explain the fluctuation of spores were relative humidity, the dew point and the rainfall present during the weeks of spore sampling. The weather parameter with a high correlation was relative humidity, for the fungus *Colletotrichum* ( $\alpha \leq 0.011$ ), followed by *Lasiodiplodia* ( $\alpha \leq 0.009$ ), and total spores ( $\alpha \leq 0.035$ ). The dew point was positively correlated with *Colletotrichum*





**Figura 2.** Dispersión de esporas de *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, temperatura de punto de rocío y humedad relativa durante octubre 2011 a diciembre 2012, en la huerta de mango Ataulfo. San Jerónimo Mpio. Benito Juárez, Guerrero, México.

**Figure 2.** Dispersion of *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Lasiodiplodia sp.* spores, temperature of dew point and relative humidity from October 2011 to December 2012, in the Ataulfo mango orchard. San Jerónimo, Municipality of Benito Juárez, Guerrero, Mexico.

Las mayores poblaciones de esporas fueron del género *Cladosporium* con 1,533 esporas/semana en octubre, lo cual coincidió en el mismo periodo con *Colletotrichum* con 160 esporas/semana. En cambio, *Lasiodiplodia* su mayor concentración se presentó en septiembre con 92 esporas/semana. En estas fechas el estado fenológico del mango es en prefloración.

El análisis de correlación fue aplicado tomando en cuenta la cuantificación de esporas de *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia*, esporas totales y los parámetros climatológicos reportados sobre ese mismo periodo de evaluación. El coeficiente

( $\alpha \leq 0.008$ ) and total spores ( $\alpha \leq 0.059$ ). Rainfall took place between May and October 2012 and the rate of rainfall was calculated by measuring the interval of time between each increase in precipitation; this variable showed a positive correlation with the populations of *Colletotrichum* ( $\alpha \leq 0.002$ ) and *Lasiodiplodia* ( $\alpha \leq 0.031$ ).

**Isolation of inflorescences.** The fungi *Colletotrichum sp.* and *Lasiodiplodia sp.* showed the highest frequency of 51 and 19 % in rachis respectively and 58 and 16 % in petals for both fungi. Meanwhile, *Cladosporium sp.* assumed a low

de correlación fue significativo en tres variables climatológicas (Cuadro 1). Las variables de clima que mejor explican la fluctuación de esporas fueron la humedad relativa, el punto de rocío y la tasa de lluvia presente durante las semanas de muestreo de las esporas. El parámetro climatológico con alta correlación fue humedad relativa, para el hongo *Colletotrichum* ( $\alpha \leq 0.011$ ), seguido por *Lasiodiplodia* ( $\alpha \leq 0.009$ ) y esporas totales ( $\alpha \leq 0.035$ ). El punto de rocío fue correlacionado positivamente con *Colletotrichum* ( $\alpha \leq 0.008$ ) y esporas totales ( $\alpha \leq 0.059$ ). Las lluvias se presentaron desde mayo a octubre en 2012 y se calculó la tasa de lluvia, midiendo el intervalo de tiempo entre cada incremento de las precipitaciones, esta variable mostró una correlación positiva con las poblaciones de *Colletotrichum* ( $\alpha \leq 0.002$ ) y *Lasiodiplodia* ( $\alpha \leq 0.031$ ).

frequency of isolation in the rachis of 3 % and was not isolated from the petals. *Colletotrichum* sp. had an average isolation of 54.7 %, *Lasiodiplodia* sp., of 17.2 %, and *Cladosporium* sp., of 1.4 % per inflorescence (Table 2). The isolations were identified morphometrically; the *Colletotrichum* conidia were straight, cylindrical, with an obtuse apex and a truncated base; average size was 13.2 x 4.2  $\mu\text{m}$ , which corresponded to the values indicated by Sutton (1992) for *Colletotrichum gloeosporioides*. In the case of *Lasiodiplodia* conidia, average size was 22.82 x 11.06  $\mu\text{m}$ , located in the range indicated by Punithalingam (1976) for *Lasiodiplodia theobromae*. The measurement of *Cladosporium* conidia was carried out in digital images taken from a scanning electron microscope (Jeol® model 5800 LV), measuring, on average,

**Cuadro 1. Análisis de correlación entre la concentración de esporas y los factores meteorológicos, aplicando la prueba de Pearson. Ciclo 2011-12. San Jerónimo Municipio Benito Juárez, Guerrero, México.**

**Table 1. Analysis of correlation between the concentration of spores and weather factors, applying Pearson's correlation coefficient. Cycle 2011-12. San Jerónimo, Municipality of Benito Juárez, Guerrero, Mexico.**

| Tipo de espora            | Humedad Relativa | Punto de Rocío | Tasa de Lluvia |
|---------------------------|------------------|----------------|----------------|
| <i>Colletotrichum</i> sp. | <b>0.397*</b>    | <b>0.408</b>   | <b>0.458</b>   |
|                           | <b>0.011**</b>   | <b>0.008</b>   | <b>0.002</b>   |
|                           | <b>40***</b>     | <b>40</b>      | <b>40</b>      |
| <i>Cladosporium</i> sp.   | 0.292            | 0.264          | 0.150          |
|                           | 0.066            | 0.099          | 0.353          |
|                           | 40               | 40             | 40             |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp.  | <b>0.406</b>     | 0.280          | <b>0.340</b>   |
|                           | <b>0.009</b>     | 0.079          | <b>0.031</b>   |
|                           | <b>40</b>        | 40             | <b>40</b>      |
| Esporas Totales           | <b>0.333</b>     | <b>0.300</b>   | 0.213          |
|                           | <b>0.035</b>     | <b>0.059</b>   | 0.186          |
|                           | <b>40</b>        | <b>40</b>      | 40             |

\*Coeficiente de correlación; \*\*nivel de significancia; \*\*\*número de observaciones en el análisis de correlación / \*Correlation coefficient; \*\*level of significance; \*\*\*number of observations in the analysis of correlation.

### Aislamientos de inflorescencias

Los hongos *Colletotrichum* sp. y *Lasiodiplodia* sp. mostraron la más alta frecuencia de 51 y 19 % en raquis respectivamente y 58 y 16 % en pétalos para ambos hongos. Mientras que *Cladosporium* sp. asumió una baja frecuencia de aislamiento en los raquis de 3 % y no se aisló de los pétalos. *Colletotrichum* sp. tuvo un promedio de aislamiento de 54.7 %, *Lasiodiplodia* sp. de 17.2 % y *Cladosporium* sp. de 1.4 % por inflorescencia (Cuadro 2). Los aislamientos fueron identificados morfométricamente, los conidios de *Colletotrichum* fueron rectos, cilíndricos, con ápice obtuso y base truncada; el tamaño promedio fue 13.2 x 4.2 µm, que corresponden a los valores indicados por Sutton (1992) para *Colletotrichum gloesporioides*. En el caso de conidios de *Lasiodiplodia* el tamaño promedio fue 22.82 x 11.06 µm, ubicado en el rango indicado por Punithalingam (1976) para *Lasiodiplodia theobromae*. La medición de conidios de *Cladosporium* se realizó en imágenes digitales de microscopio electrónico de barrido (Jeol® modelo 5800 LV), midiendo en promedio 4.8 x 1.78 µm, con variación de 1.5 - 1.6 x 0.28 - 0.62 µm. Estos valores indican una variación reducida, pero son 1.05 y 1.15 µm menos al tamaño de esporas reportado por Guillén-Sánchez *et al.* (2007) para *Cladosporium tenuissimum*, que hicieron mediciones en fotomicroscopio y por tanto con diferente

4.8 x 1.78 µm, with a variation of 1.5 - 1.6 x 0.28 - 0.62 µm. These values indicate a reduced variation, but they are 1.05 and 1.15 µm less than the size of spores reported by Guillén-Sánchez *et al.* (2007) for *Cladosporium tenuissimum*, who carried out measurements in a photomicroscope, and therefore with a different treatment to the study material, which explains the numerical differences recorded.

### DISCUSSION

Mango anthracnose, the causal agents of which are *C. gloesporioides* (Morales and Rodriguez, 2009) and *C. acutatum* (Rivera-Vargas *et al.*, 2006), constitutes one of the most important diseases worldwide, since it affects both vegetative and reproductive organs, and it causes important post-harvest losses by causing rotting in the fruits (Acosta-Ramos *et al.*, 2003; Ploetz, 2003; Benítez-Camilo *et al.*, 2003). In an epidemiological study, Huerta *et al.* 2009 made similar observations with *Colletotrichum gloesporioides*; they reported that the greatest increase in anthracnose took place between December and April, when the minimum temperature at dew point (TminPR) as between 21 and 24 °C, which propitiate the condensation of water on leaves, flowers, and fruits, favoring the infection and dispersion by spore's drag (tearing symptom) and spattering. This study

**Cuadro 2. Frecuencia de hongos en inflorescencias atizonadas de mango Ataulfo de la localidad de San Jerónimo Municipio Benito Juárez, Guerrero, México, Ciclo 2011-12.**

**Table 2. Frequency of fungi in Ataulfo mango smutted inflorescences in San Jerónimo, Municipality of Benito Juárez, Guerrero, Mexico, Cycle 2011-12.**

| Tipo de espora            | Frecuencia (%)<br>aislamientos de Raquis | Frecuencia (%)<br>aislamientos de Pétalos | Frecuencia (%) aislamientos<br>de inflorescencia |
|---------------------------|--|---|--|
| <i>Colletotrichum</i> sp. | 51                                       | 58  | 54.7   |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp.  | 19                                       | 16  | 17.2   |
| <i>Cladosporium</i> sp    | 3  | 0   | 1.4  |

tratamiento al material de estudio, lo cual explica las diferencias numéricas registradas.

## DISCUSIÓN

La antracnosis del mango cuyo agente causal es *C. gloeosporioides* (Morales and Rodriguez, 2009) y *C. acutatum* (Rivera-Vargas *et al.*, 2006), constituye una de las más importantes enfermedades a nivel mundial debido a que afecta tanto órganos vegetativos como reproductivos y ocasiona importantes pérdidas postcosecha al causar pudriciones en los frutos (Acosta-Ramos *et al.*, 2003; Ploetz, 2003; Benítez-Camilo *et al.*, 2003). En un estudio epidemiológico Huerta *et al.* 2009 realizaron observaciones similares, con *Colletotrichum gloeosporioides* quienes reportaron que el mayor incremento de la antracnosis se presentó de diciembre a abril, cuando los valores de temperatura mínima de punto de rocío (TminPR) fue entre 21 a 24 °C, las que propiciaron la condensación de agua sobre hojas, flores y frutos, favoreciendo la infección y dispersión por arrastre de esporas (síntoma de lagrimeo) y salpique. En este estudio se encontró que los valores de temperatura de punto de rocío fueron entre 18.2 y 23.7 °C, correspondientes a los meses de septiembre, octubre, enero, abril y junio; en estas fechas, el estado fenológico es de prefloración, emisión de flores, amarre de frutos hasta la cosecha. Este rango más amplio de temperaturas de punto de rocío observado puede estar relacionado con los requerimientos específicos de temperatura de germinación de esporas y formación de apresorios de *C. gloeosporioides* de mango de diferentes localidades (Dodd *et al.*, 1991; Arauz, 2000).

Recientemente se reportó a *Cladosporium tenuissimum* como patógeno en mango (Guillén-Sánchez *et al.*, 2007), en un estudio en el cv. Haden en el estado de Guerrero y Michoacán, quienes

found that the dew point temperature values were between 18.2 and 23.7 °C, recorded in September, October, January, April, and June; in these months, the phenological state is preflowering, flower blossoming, fruit setting until harvest. This wider dew point temperature range observed can be related to the specific temperature requirements for spore germination and formation of *C. gloeosporioides* appressoria in mango in different locations (Dodd *et al.*, 1991; Arauz, 2000).

*Cladosporium tenuissimum* was recently reported as a mango pathogen (Guillén-Sánchez *et al.*, 2007), in a study on the cv. Haden in the states of Guerrero and Michoacán, showing that *C. tenuissimum* caused necrosis in flowers, peduncle and small fruits in the inoculated panicles. They also reported that the affected organs are covered with a cottony grey mycelium and a grayish-olive green sporulation. The organs were susceptible from flowering until fruition. This report indicates the presence of the same causal agent in mango cv. Ataulfo, causing similar damages to those recorded in cv. Haden. Until recently, *Cladosporium* sp. was only pointed out to be an opportunistic and endophytic fungus, and an important contaminant of environments and cultivation media (Morales *et al.*, 2009). However, there are reports on the fluctuation of spores and their relation with the environment, up to this paper, where a similar dispersal was found between *Cladosporium* sp. and *Colletotrichum* sp.; their spore populations increase when the dew point temperature was between 18.2 and 23.7 °C, causing the saturation of humidity in the air, forming dew and/or fog on the surface of the tree, favoring the infection and dispersal of spores from both fungi in the preflowering and flowering stages, up to the harvest of the fruit.

The results of the isolations in smutted inflorescences (rachis and petals) indicate the presence of well-known mango pathogenic fungi

demonstraron que *C. tenuissimum* causó necrosis en las flores, pedicelos y frutos pequeños en las panículas inoculadas. También reportaron que los órganos afectados se cubren con un micelio algodonoso gris y una esporulación olivácea verde gris. Los órganos fueron susceptibles desde la floración hasta la fructificación. Este reporte indica la presencia del mismo agente causal en mango cv. Ataulfo, causando daños semejantes con los registrados en el cv. Haden. Anteriormente solo se indicaba a *Cladosporium* sp. como un hongo oportunista, endófito y un importante contaminante de ambientes y medios de cultivo (Morales *et al.*, 2009). No obstante, no se tienen reportes sobre la fluctuación de esporas y su relación con el medio ambiente, hasta lo reportado en este trabajo, donde se encontró una dispersión similar entre *Cladosporium* sp. y *Colletotrichum* sp., sus poblaciones de esporas se incrementan cuando la temperatura de punto de rocío fue entre 18.2 y 23.7 °C lo que provoca la saturación de humedad en el aire, formando el rocío y/o neblina sobre la superficie del árbol y se favorece la infección y dispersión de las esporas de ambos hongos, durante la etapa de prefloración, floración hasta la cosecha de la fruta.

Los resultados de los aislamientos en inflorescencias atizonadas (raquis y pétalos) indican la presencia de reconocidos hongos fitopatógenos del mango: *C. gloesporioides*, y *L. theobromae* (Fitzell y Peak 1984; Arauz, 2000; Ploetz, 2003; González *et al.*, 1999). En cambio, la baja frecuencia de aislamientos de *C. tenuissimum* podría indicar que no hubo colonización en pétalos y/o una distribución heterogénea del hongo en el tejido, pero también puede ser efecto residual de las aplicaciones de fungicidas y la posible presencia de otros microorganismos que interfieran sobre los aislamientos. En este trabajo se confirma la colonización de *C. gloesporioides*, y *L. theobromae* como una importante fuente para el desarrollo del atizonamiento de

*C. gloesporioides* and *L. theobromae* (Fitzell and Peak 1984; Arauz, 2000; Ploetz, 2003; González *et al.*, 1999). On the other hand, the low frequency of *C. tenuissimum* isolations may indicate that there was no colonization in petals and/or a heterogenous distribution of the fungus in the tissue, but it may also be a residual effect of the applications of fungicides and the possible presence of other microorganisms that interfere with the isolations. This work confirms the colonization of *C. gloesporioides* and *L. theobromae* as an important source for the development of the smut of the inflorescence and scarce fruit setting per inflorescence.

Anthraxnose heavily damages the mango value chain in Mexico, reducing its productivity up to 90 %, and consequently, important economic losses for farmers (Espinosa *et al.*, 2004). In addition, for its control, excessive contact and systemic fungicides are used. One proposal is of an integrated management with eight applications, starting with two applications in vegetative growth and the rest, during flowering and fruit growth (Acosta-Ramos *et al.*, 2003). Another proposal is a program called “INIFAP”, in which they propose the use of 4 to 6 fungicide applications, from the beginning of flowering up to the first stages of fruit development (Espinosa *et al.*, 2004). Knowing the stages of greater vulnerability to fungal attacks on mango trees will help adjust fungicide applications, reducing the negative impacts on the field workers, consumers and the environment.

## CONCLUSIONS

Spore dispersal in the Ataulfo mango orchard had two important increases in the months corresponding to the final stage of vegetative growth and preflowering. The other increase in spores took place in flowering, fruit setting and

la inflorescencia y escaso amarre de frutos por inflorescencia.

La antracnosis provoca fuertes daños a la cadena de valor de mango en México, disminuyendo su productividad hasta 90 % y por consecuencia fuertes pérdidas económicas de los productores (Espinosa *et al.*, 2004). Adicionalmente para su control se usan excesivas aplicaciones de fungicidas de contacto y sistémicos. Una propuesta de un manejo integrado con ocho aplicaciones, iniciando dos aplicaciones en crecimiento vegetativo y el resto durante la floración y crecimiento de la fruta (Acosta-Ramos *et al.*, 2003). Otra propuesta es un programa denominado "INIFAP", donde proponen usar de 4 a 6 aspersiones de fungicidas, desde el inicio de la floración, hasta los primeros estados de desarrollo de frutos (Espinosa *et al.*, 2004). El conocimiento de las etapas de mayor vulnerabilidad al ataque de hongos en árboles de mango, permitirá un ajuste de las aplicaciones de fungicidas, disminuyendo los impactos negativos en los trabajadores de campo, de los consumidores y el medio ambiente.

## CONCLUSIONES

La dispersión de esporas en la huerta de mango Ataulfo tuvo dos importantes incrementos en los meses que corresponde a la etapa final de crecimiento vegetativo y prefloración. El otro incremento de esporas se presentó en floración, amarre y crecimiento de frutos, traslapado con el periodo de cosecha.

Las esporas de *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Lasiodiplodia* sp. tuvieron una alta concentración de septiembre a junio, durante la etapa de prefloración, floración, hasta cosecha de la fruta.

La concentración de esporas de *Colletotrichum* sp., estuvo correlacionada positivamente y significativamente con punto de rocío, humedad relativa

growth, overlapped with the harvesting period.

*Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. spores had a high concentration between September and June, during the stages of preflowering, flowering, and up to fruit harvest.

The concentration of *Colletotrichum* sp. spores was positively and significantly correlated with dew point, relative humidity and rate of rainfall. Total spores were correlated with relative humidity and dew point.

*Colletotrichum* sp. and *Lasiodiplodia* sp. occurred as the main fungi in inflorescences with symptoms of smutting.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the Foundation Produce de Guerrero A.C. for the funding of the projects "Management of anthracnose in mango in the Costa Grande Region" and "Technological validation of the management of anthracnose in mango in the potential regions of the state of Guerrero" in the 2011-13 announcement.

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

y la tasa de lluvia. Esporas totales fueron correlacionadas con humedad relativa y punto de rocío.

*Colletotrichum* sp., y *Lasiodiplodia* sp. ocurrieron como los principales hongos de inflorescencias con síntomas de atizonamientos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Produce de Guerrero A.C. por el financiamiento de los proyectos "Manejo de la antracnosis en mango en la región de la Costa Grande" y "Validación tecnológica del manejo de la antracnosis en mango en las regiones potenciales del estado de Guerrero" en la Convocatoria 2011-13.

## LITERATURA CITADA

- Arauz, L.F. 2000. Mango Anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84: 600-611. DOI D-2000-0328-01F
- Acosta-Ramos M., Noriega-Cantú D.H., Nieto-Angel D., Téliz-Ortiz D. 2003. Efecto del manejo integrado del mango (*Mangifera indica* L.) en la incidencia de enfermedades y en la calidad de frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 46-55. Disponible en línea <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221107>
- Ali K.M., Mubeen L.A. and Shahzad S. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. *Pakistan Journal Botanical* 36: 181-189. Disponible en línea [https://www.researchgate.net/profile/Saleem\\_Shahzad/publication/266069789\\_Pathogenicity\\_of\\_Lasiodiplodia\\_theobromae\\_and\\_Fusarium\\_solani\\_on\\_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Saleem_Shahzad/publication/266069789_Pathogenicity_of_Lasiodiplodia_theobromae_and_Fusarium_solani_on_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf)
- Benítez-Camilo, F.A., Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., y Toledo-Arreola, J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de frutos de mango cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:223-227. Disponible en línea <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221218>
- Dodd, J.C.; Estrada, A.B.; Matcham, J.; Jeffries, P.; Jeger, M.J. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology* 40: 568-575. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02421.x
- Espinosa, A. J., Arias S. J. F., Rico P. H. R., Miranda S. M. y Chávez C. X. 2004. Dinámica de daño y control de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) en mango en Michoacán. Folleto Técnico No. 2. INIFAP. CIRPAC. Campo Experimental Apatzingán, Apatzingán Michoacán, México. 21 p. Disponible en línea [http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1258/Dinamica\\_da%c3%b1o\\_1258.pdf?sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1258/Dinamica_da%c3%b1o_1258.pdf?sequence=1)
- FAO 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT [www.faostat3.org](http://www.faostat3.org), (consulta, marzo 2016)
- Fitzell R.D. and Peak C.M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104: 53-59. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1984.tb05586
- Gadoury, D. M., and MacHardy, W. E. 1983. A 7-day recording volumetric spore trap. *Phytopathology* 73:1526-1531. Disponible en línea [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Abstracts/Phyto73\\_1526.htm](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Abstracts/Phyto73_1526.htm)
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. México. Offset Larios, 217 p.
- González E., Umaña G., Arauz L.F. 1999. Fluctuación poblacional de *Botryodiplodia theobromae* Pat. en mango. *Agronomía Costarricense* 23: 21-29. Disponible en línea [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v23n01\\_021.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v23n01_021.pdf)
- Guillén-Sánchez D., Yañez-Morales Ma. de J., Téliz-Ortiz D., Siebe-Grabach C. Bautista-Baños S. 2007. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on mango tree panicles: symptoms, pathogenicity and severity of the fungus. *Fruits* 62: 361-368. doi: 10.1051/fruits:2007032
- Huerta-Palacios G., Holguín-Meléndez F., Benítez-Camilo F.A., Toledo-Arreola J. 2009. Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 93-105. Disponible en línea <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195002>
- Morales G. J.L., Rodríguez G. M. del P., Azpiroz R.H.S. y Pedraza S.M.E. 2009. Temperatura base *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz aislado de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en Michoacán, México. *Revista Científica UDO Agrícola* 9: 414-420. Disponible en línea <http://udoagricola.udo.edu.ve/V9N2UDOAg/V9N2TabladeContenido.pdf>
- Morales R. V. y Rodríguez G. M. 2009. Micobiota endofítica asociada al cultivo del mango 'Haden' (*Mangifera indica* L.) en el oriente de Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 9: 393-402. Disponible en línea <http://udoagricola.udo.edu.ve/V9N2UDOAg/V9N2TabladeContenido.pdf>
- Noriega-Cantú, D.H., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G., Rodríguez-Alcazar, J., Zavaleta-Mejía, E., Otero-Colinas, G., and Campbell, C.L. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico, with traditional and integrated management. *Plant Disease* 83:223-228. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.223>
- Ploetz, R.C. 2003. Diseases of Mango. Pp. 327-363. In: Ploetz R.C. (ed.) *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. 544 p. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993904.0327>
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria. No. 519. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. doi:10.1007/BF01795180
- Rivera-Vargas, L.I, Lugo-Noel, Y., McGovern, R.J., Seiji, T., and Davis, M.J. 2006. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathology Journal* 5:191-198 <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2006.191.198>
- SAGARPA 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.infosiap.siap.gob.mx](http://www.infosiap.siap.gob.mx) (consulta, marzo 2016)
- SAS Institute 2010. User's Guide: Statistics, version 9.3, SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Sutton, B.C. 1992. The Genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. Pp. 1-26. In: Bailey, J.A & M.J. Jeger (eds). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, UK, 389 p.

# Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico

## Hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* y trips en cultivos de cebolla de Morelos y Michoacán, México

Norma Ávila-Alistac\*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C. P. 56230; Sergio Ramírez-Rojas, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. Col. Centro Zacatepec, Morelos, C. P. 62780; Héctor Lozoya-Saldaña, Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230; Ángel Rebollar-Alviter, Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Morelia (CRUCO), Perif. Paseo de la República 1000, Lomas del Valle, Morelia, Michoacán, C. P. 58170; Remigio Anastacio Guzmán-Plazola, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C. P. 56230. \*Autor para correspondencia: alixtac@gmail.com.

Recibido: 17 de Enero, 2017.

Aceptado: 19 de Marzo, 2017.

Ávila-Alistac N, Ramírez-Rojas S, Lozoya-Saldaña H, Rebollar-Alviter A, Guzmán-Plazola RA. 2017. Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 242-262.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-1

Primera publicación DOI: 12 de Abril, 2017.

First DOI publication: April 12, 2017.

**Resumen.** El objetivo de la investigación fue identificar hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* (IYSV) y establecer el rango de hospedantes del putativo vector(es) en regiones productoras de cebolla (*Allium cepa*) de Morelos y Michoacán, México. En 10 localidades de ambos estados se muestrearon cultivos de cebolla y arvenses, en presencia y ausencia del cultivo. Las plantas de cebolla se analizaron por RT-PCR y las arvenses

**Abstract.** The main goal of this research was to identify alternate hosts of *Iris yellow spot virus* (IYSV) and to establish the range of hosts of the putative vector(s) in onion (*Allium cepa*) producing regions of Morelos and Michoacan, Mexico. In 10 localities of both states, onion crops and weeds were sampled in the presence and absence of the crop. Onion plants were analyzed by RT-PCR and the weeds by DAS-ELISA. The weeds were identified at species level, the thrips collected from weeds were established colony for identification by PCR, with specific primers that amplify a segment of the cytochrome oxidase I (COI) gene. A total of 295 weeds grouped in 56 species (23 families) were analyzed and identified. All the weeds were negative for IYSV. Thrips were detected on 75 weeds grouped in 17 species. Thirty-three thrips populations were analyzed (22 from Morelos and 11 from Michoacan). Sequencing indicated identity with *Thrips tabaci* with a homology greater than



por DAS-ELISA. Las arvenses se identificaron a nivel especie, los trips colectados de las mismas se establecieron colonias para su identificación por PCR, con iniciadores específicos que amplifican un segmento del gen de citocromo oxidasa I (COI). Se analizaron e identificaron 295 arvenses agrupadas en 56 especies (23 familias), todas resultaron negativas para IYSV. Se detectaron trips en 75 arvenses agrupadas en 17 especies. Se analizaron 33 poblaciones de trips (22 de Morelos y 11 de Michoacán). La secuenciación indicó identidad con *Thrips tabaci* con una homología superior a 97 %. Las arvenses *Ricinus communis* y *Acalypha ostryifolia* registraron el mayor número de *T. tabaci*. En cebolla se confirmó la presencia de IYSV con RT-PCR en las 10 parcelas muestreadas. Este es el primer reporte de la presencia de IYSV en el estado de Michoacán.

**Palabras clave:** IYSV, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, PCR COI, *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*.

La cebolla es un cultivo de importancia económica en el país y es afectada por varias enfermedades, entre ellas las causadas por virus que ocasionan pérdidas considerables y son de difícil manejo. *Iris yellow spot virus* (IYSV) del género *Tospovirus*, agente causal de la enfermedad conocida como mancha blanca en cebolla, es uno de los virus de importancia en plantas del género *Allium* (Brewster, 2008), por su amplia distribución geográfica y un gran rango de hospedantes (Ghotbi *et al.*, 2005; Sampangi y Mohan, 2007; Smith *et al.*, 2011). En México se ha reportado su presencia en los estados de Zacatecas (Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011) y Morelos en el cultivo de cebolla (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016) y en Guanajuato en el cultivo de ajo (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). La especie *Thrips tabaci* es el principal vector de

97 %. Weeds *Ricinus communis* and *Acalypha ostryifolia* were found with high number of *T. tabaci*. In onion, the presence of IYSV was confirmed with RT-PCR in the ten field plots sampled. This is the first report of IYSV in Michoacan state.

**Key words.** IYSV, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, COI PCR, *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*.

Onion is a highly economically important crop in Mexico, and it can be affected by several diseases, including those caused by a virus that cause considerable losses and are difficult to handle. The *Iris yellow spot virus* (IYSV) of the *Tospovirus* genus, causal agent of the disease known as white spot in onion, is one of the most important viruses in plants of the genus *Allium* (Brewster, 2008), due to its wide geographical distribution and range of hosts (Ghotbi *et al.*, 2005; Sampangi and Mohan, 2007; Smith *et al.*, 2011). In Mexico its presence has been reported in the states of Zacatecas (Velásquez-Valle and Reveles-Hernández, 2011) and Morelos in onion plantations (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016), and in Guanajuato, in garlic plantations (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). The species *Thrips tabaci* is the main vector of IYSV. On the other hand, alternate hosts of the virus and its vector play a crucial role in the epidemiology of the disease caused by IYSV, particularly if these insects complete their biological cycle in these plants (Hsu *et al.*, 2011). This highlights the importance of performing studies related to the vector, alternate hosts, the virus, and interactions amongst them, in order to provide knowledge to help design better disease management strategies, since this type of interactions could influence the appearance of new types of viruses (Rodríguez *et al.*, 2007). Likewise, the ability of trip vectors to grow on non-cultivated plants and permanently subsist in the field may be

IYSV. Por otra parte, los hospedantes alternos del virus y su vector toman un papel fundamental en la epidemiología de la enfermedad causada por el IYSV, sobre todo si estos insectos completan su ciclo biológico en dichas plantas (Hsu *et al.*, 2011). Esto resalta la importancia de realizar estudios relacionados con el vector, hospedantes alternos, el virus y las interacciones entre ellos, a fin de generar mayor conocimiento que permitan diseñar mejores estrategias de manejo de la enfermedad, ya que este tipo de interacciones puede influir en la aparición de nuevas variantes del virus (Rodríguez *et al.*, 2007). Así mismo, la capacidad que tienen los trips vectores para desarrollarse en plantas no cultivadas y subsistir de forma permanente en campo puede ser de significancia epidemiológica, sobre todo en la dispersión secundaria del virus (Chatzivassiliou *et al.*, 2007; Syller, 2012). En Morelos, el IYSV es importante debido a la alta incidencia (100 %) y severidad (superior al 90 %) con que se presenta en las zonas productoras de la entidad (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). Por otro lado, en Michoacán, el IYSV ha pasado prácticamente inadvertido por los productores de cebolla a pesar de estar presente en el cultivo. Este contraste en intensidad de la enfermedad en ambos estados puede deberse a diferentes factores relacionados con el ambiente, al hospedante principal y alternos (arvenses), el virus, vectores, entre otros. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar hospedantes alternos de *Iris yellow spot virus* (IYSV) y establecer el rango de hospedantes del putativo vector(es), en regiones productoras de cebolla de Morelos y Michoacán, México, y generar información que contribuya a explicar estas diferencias de intensidad epidémica en ambas entidades.

epidemiologically significant, particularly in the secondary spreading of the virus (Chatzivassiliou *et al.*, 2007; Syller, 2012). In Morelos, IYSV is important due to its high incidence (100 %) and severity (above 90 %) with which it appears in the production areas of the entity (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). On the other hand, in Michoacan, IYSV has practically gone unnoticed by onion farmers despite its presence in the crop. This contrast in the intensity of the disease in both states could be due to different environment-related factors, the main and alternate hosts (weeds), the virus, vectors, and others. Based on this, the aim of this investigation was to identify alternate *Iris yellow spot virus* (IYSV) hosts and establish the range of hosts of the putative vector(s) in onion-producing regions of Morelos and Michoacan, Mexico, and generate information that contributes to explain these differences in epidemic intensity in both entities.

## MATERIALS AND METHODS

### Collecting and identifying weeds

Weeds were collected from 10 fields used for the planting of onion in the municipalities of Puente de Ixtla (one field), Ayala (two fields), Axochiapan (one field) and Emiliano Zapata (one field) in Morelos, as well as in Vista Hermosa (two fields) and Tanhuato (three fields) in Michoacán. The samples were taken in December 2014 (Morelos), January (Morelos and Michoacan), July (Morelos), October 2015 (Morelos and Michoacán) and January 2016 (Morelos and Michoacan) in the presence and absence of the crop. The collection of samples was

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta e identificación de arvenses

Se colectaron arvenses en 10 parcelas destinadas al cultivo de cebolla en los municipios de Puente de Ixtla (una parcela), Ayala (dos parcelas), Axochiapan (una parcela) y Emiliano Zapata (una parcela) en Morelos, así como en Vista Hermosa (dos parcelas) y Tanhuato (tres parcelas) en Michoacán. Los muestreos se realizaron en los meses de diciembre 2014 (Morelos), enero (Morelos y Michoacán), julio (Morelos), octubre de 2015 (Morelos y Michoacán) y enero de 2016 (Morelos y Michoacán) en presencia y ausencia del cultivo. El muestreo fue dirigido en base a cuatro criterios: a arvenses previamente reportados como hospedantes de IYSV (Sampangi *et al.*, 2007; Weilner y Bedlan 2013; Schwartz *et al.*, 2014), plantas con síntomas putativos a virosis (mosaicos, clorosis, deformaciones foliares y manchas blancas), plantas cercanas a plantas de cebolla que presentaban síntomas de virus, y las arvenses más abundantes en el momento del muestreo. Se seleccionaron de preferencia plantas en etapa fenológica avanzada. Estas se colocaron en bolsas de plástico con papel húmedo y se transportaron al laboratorio donde fueron identificadas con claves taxonómicas (Espinosa y Sarukhán, 1997; Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2004; Vibrans y Tenorio, 2012) hasta nivel de especie.

### Detección de IYSV en cebolla

Con la finalidad de confirmar la presencia del virus se tomaron muestras de plantas de cebolla en las mismas parcelas donde se realizó la colecta de arvenses. El muestreo fue dirigido a plantas (cinco plantas) que presentaron síntomas típicos del IYSV, considerando la presencia de lesiones cloróticas o

based on four criteria: weeds previously reported as IYSV hosts (Sampangi *et al.*, 2007; Weilner and Bedlan 2013; Schwartz *et al.*, 2014), plants with putative symptoms to virosis (mosaics, chlorosis, foliar deformities, and white stains), plants near onion plants with viral symptoms, and the most abundant weeds at the time of collecting samples. Plants in advanced phenological stages were preferred. These were places in plastic bags with moist paper and transported to the laboratory, where they were identified with taxonomical codes (Espinosa and Sarukhán, 1997; Rzedowski *et al.*, 2001; Rzedowski *et al.*, 2004; Vibrans and Tenorio, 2012) up to the level of species.

### Detecting IYSV in onion

To confirm the presence of the virus, onion plant samples were taken from the same fields from which weeds were taken. The collection of samples was aimed at plants (five plants) with typical IYSV symptoms, considering the presence of chlorotic or long white wounds with or without a green islet in the center (Gent *et al.*, 2006; Weilner and Bedlan, 2013). RNA was extracted from symptomatic plants using the method by TRIzol<sup>®</sup> Reagent, following manufacturer instructions (life technologies<sup>™</sup>). Later, the pathogen was identified using the reverse-transcription technique of the polymerase chain reaction (RT-PCR), with specific primers that amplify a strip of 750 pb of the gene, which codifies for the protein of the nucleocapsid of the virus: IYSV-For (TGG YGG AGA TGY RGA TGT GGT) and IYSV-Rev (ATT YTT GGG TTT AGA AGA CTC ACC) (du Toit *et al.*, 2007). The reaction mixture for PCR has a final volume of 25 µL: 2.5 µL of buffer PCR 5X, 1.25 µL of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µL dNTP's (10 mM), 0.5 µL for each primer (10 mM), 0.5 µL de Taq polymerase (5U/µL) and 2 µL of cDNA. The conditions for the

blancas alargadas y con presencia o ausencia de una isla verde en el centro (Gent *et al.*, 2006; Weilner y Bedlan, 2013). De plantas sintomáticas se realizó la extracción de ARN total con el método de TRIzol® Reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies™). Posteriormente, la identificación del patógeno se realizó mediante la técnica de reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), con iniciadores específicos que amplifican una banda de 750 pb del gen, que codifica para la proteína de la nucleocápside del virus: IYSV-For (TGG YGG AGA TGY RGA TGT GGT) e IYSV-Rev (ATT YTT GGG TTT AGA AGA CTC ACC) (du Toit *et al.*, 2007). La mezcla de reacción para la PCR fue de un volumen final de 25 µL: 2.5 µL de buffer PCR 5X, 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µL dNTP's (10 mM), 0.5 µL por cada iniciador (10 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa (5U/µL) y 2 µL de cDNA. Las condiciones para la PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguidos por 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 30 s y 68 °C por 1 min y una extensión final de 68 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en un fotodocumentador mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido previamente con bromuro de etidio. De los productos amplificados, se purificaron cuatro muestras (dos de Michoacán y dos de Morelos) con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se mandaron a secuenciar a la compañía de Macrogen Inc. en Corea del Sur, y las secuencias se compararon en la base de datos del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Solo un aislamiento de IYSV obtenido de Michoacán se inoculó en plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana* (Kritzman *et al.*, 2001), esto con la finalidad de tener un respaldo del aislamiento para su posterior uso. Para verificar

PCR were an initial denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 51 °C for 30 s and 68 °C for 1 min and a final extension of 68 °C for 7 min. The products of PCR were viewed in a photodocumentor by electrophoresis in a 1 % agarose gel, previously dyed with ethidium bromide. From the products amplified, four samples (two from Michoacán and two from Morelos) were purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System and sent for sequencing to the company Macrogen Inc. in South Korea, and the sequences were compared in the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) data bank. Only one IYSV isolate, obtained in Michoacán, was inoculated in plants indicating *Nicotiana benthamiana* (Kritzman *et al.*, 2001), in order to have a backup of the isolate for later use. To verify the presence of the virus in inoculated plants, RNA was extracted from inoculated tissue and RT-PCR.

#### Detecting IYSV in weeds

Due to the number of weeds collected, the serological test DAS-ELISA was used, with the specific antibody for IYSV following indications by the manufacturer (Agdia®). Samples of each weed collected, consisting of leaves of the lower, middle, and lower sections, were analyzed in duplicate. For weeds with symptoms, a sample composed of diseased and healthy tissues, was taken. The positive control was used for the virus, and the negative control (healthy onion tissue) was acquired from Agdia®. The samples were measured in an ELISA plate reader at a wavelength of 405 nm ( $A_{405}$ ). The reaction was considered positive if the absorbance value was three times greater to the average of the negative control (Sutula *et al.*, 1986).

la presencia del virus en las plantas inoculadas se realizó extracción de ARN del tejido inoculado y RT-PCR.

### DetECCIÓN DE IYSV EN ARVENSES

Por el número de arvenses colectadas, se utilizó la prueba serológica DAS-ELISA con el anticuerpo específico para el IYSV siguiendo las indicaciones del fabricante (Agdia®). Se analizaron por duplicado muestras compuestas de cada arvense colectada, consistentes en hojas de la parte baja, media y alta. En el caso de arvenses con síntomas se realizó una muestra compuesta de tejido enfermo y tejido sano. Se utilizó el control positivo para el virus y control negativo (tejido de cebolla sano) adquiridos de Agdia®. Las muestras se midieron en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 405 nm ( $A_{405}$ ). La reacción se consideró positiva si el valor de absorbancia fue tres veces mayor a la media del control negativo (Sutula *et al.*, 1986).

### Presencia de trips

El haz y envés de las hojas de plantas arvenses colectadas se revisaron para verificar la presencia de trips. En las plantas donde se detectó la presencia de los insectos, con un pincel de punta fina se colectaron adultos o inmaduros (según fuera el caso) para establecer colonias, estos fueron depositados de forma individual en frascos de plástico con aberturas cubiertas con tela organza para permitir la entrada de aire y dentro de ellos se colocaron ejotes frescos (*Phaseolus vulgaris*) para su alimentación. Los ejotes deshidratados se sustituyeron por frescos dos veces por semana. Los frascos con los trips se mantuvieron en condiciones de laboratorio con un fotoperiodo de 12 h, temperatura promedio de  $24 \pm 1$  °C y 42 % de humedad relativa hasta que se observó el incremento de individuos para su identificación por PCR.

### Presence of thrips

Both sides of the weed leaves collected were checked for thrips. In plants in which these insects were found, using a fine-tip brush, adult or immature insects (depending on each case) were collected to form colonies, and were deposited individually in plastic jars with holes covered in cloth to let air in, and inside them, green beans (*Phaseolus vulgaris*) for them to feed on. The dehydrated green beans were replaced with fresh ones twice a week. The jars with thrips were kept under laboratory conditions with a photoperiod of 12 h, an average temperature of  $24 \pm 1$  °C and a relative humidity of 42 % until an increase of individuals was observed for their identification using PCR.

### DNA extraction and PCR in thrips

From the colonies established, total DNA was taken using CTAB from 15 adults, and its quality and concentration was determined using a spectrophotometer. The PCR was carried out with primer that amplify a fragment of 710 pb of the gene cytochrome oxidase I (COI): LCO1490 (5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G3') and HCO2198 (5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3') (Folmer *et al.*, 1994). The PCR was carried out in a volume of 25  $\mu$ L consisting of: 1.25  $\mu$ L of  $MgCl_2$  (25 mM), 0.5  $\mu$ L of dNTP's (10 mM), 0.5  $\mu$ L of each primer (10 mM), 0.5  $\mu$ L of Taq polymerase, 2.5  $\mu$ L 10X PCR buffer, 4  $\mu$ L of DNA (10-50 ng/ $\mu$ L) and water. The PCR was carried out under the following conditions: 94 °C for 4 min for the initial denaturalization, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified products were viewed in electrophoresis in agarose gel at 1 % containing ethidium bromide. The products of the PCR were

## Extracción de ADN y PCR en trips

De las colonias establecidas, se extrajo ADN total con CTAB a partir de 15 adultos y se determinó su calidad y concentración en el espectrofotómetro. La PCR se realizó con iniciadores que amplifican un fragmento de 710 pb del gen citocromo oxidasa I (COI): LCO1490 (5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G3') y HCO2198 (5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3') (Folmer *et al.*, 1994). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL consistente en: 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM), 0.5 µL de cada iniciador (10 mM), 0.5 µL de Taq polimerasa, 2.5 µL buffer de PCR 10X, 4 µL de DNA (10-50 ng/µL) y agua. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 4 min para la desnaturalización inicial, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa a 1 % que contenía bromuro de etidio. Los productos de PCR se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias se analizaron con el programa Chromas LITE versión 2.1.1, posteriormente se crearon secuencias consenso de cada muestra con el programa Vector NTI 8 y se compararon con las depositadas del banco de datos de secuencias genéticas (GenBank).

## RESULTADOS

### Colecta e identificación de arvenses

Se colectaron 212 arvenses en el estado de Morelos (33 arvenses en 2014, 150 arvenses en 2015 y 29 arvenses en 2016) y 83 en Michoacán (67 arvenses en 2015 y 16 arvenses en 2016), que en

purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System and were sequenced in both directions. The sequences were analyzed using the program Chromas LITE version 2.1.1, and afterwards, consensus sequences were created from each sample using the program Vector NTI 8 and they were compared with those deposited in the genetic sequences data bank (GenBank).

## RESULTS

### Collection and identification of weeds

A total of 212 weeds were collected in the state of Morelos (33 weeds in 2014, 150 in 2015 and 29 in 2016) and 83 in Michoacan (67 weeds in 2015 and 16 weeds in 2016), for a total of 56 species belonging to 23 families (Table 1). Out of these, 41 species were identified as belonging to 18 families for Morelos and 26 species from 14 families in Michoacan. *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*, *Parthenium hysterophorus* and *Tithonia tubiformis* were the most abundant in the state of Morelos, whereas *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*, *Sonchus oleraceus* and *Chenopodium murale* were the most frequent in Michoacan.

### Detecting IYSV in onion

Using the RT-PCR technique, we identified IYSV in the 10 onion fields; the plants presented well-developed bulbs. The virus was not found in young plants (before the bulb was formed). The presence of the pathogen was confirmed in both the state of Morelos and Michoacan. The symptoms were pale white, elongated wounds, and some plants presented green islets in the middle of them; these symptoms were most frequent in the

conjunto comprendieron un total de 56 especies pertenecientes a 23 familias (Cuadro 1). De estos se identificaron 41 especies pertenecientes a 18 familias para Morelos y 26 especies dentro de 14 familias en Michoacán. *Ricinus communis*, *Acalypha ostryifolia*, *Parthenium hysterophorus* y *Tithonia tubiformis* fueron más abundantes en el estado de Morelos, mientras que *Amaranthus hybridus*, *Parthenium hysterophorus*, *Sonchus oleraceus* y *Chepodium murale* lo fueron en Michoacán.

### Detección de IYSV en cebolla

Mediante la técnica de RT-PCR se identificó al IYSV en las 10 parcelas con cultivo de cebolla establecido, las plantas presentaron un bulbo desarrollado. En plantaciones jóvenes (antes de la formación del bulbo) no se detectó al virus. Se confirmó la presencia del patógeno tanto en el estado de Morelos como en Michoacán. Los síntomas fueron lesiones de color blanco pajizo, alargadas y en algunas plantas se detectaron islas verdes en el centro de las mismas, estos síntomas se presentaron con mayor frecuencia en el estado de Michoacán (Figura 1). Las cuatro muestras secuenciadas (dos de Morelos y dos de Michoacán) mostraron un 99 % de identidad con el gen de la nucleocápside para IYSV. Las plantas inoculadas en *N. benthamiana* con el aislamiento de Michoacán, presentaron síntomas de manchas cloróticas en las hojas inoculadas y no inoculadas, así como necrosis. La presencia de IYSV fue confirmada en el tejido de *N. benthamiana* por RT-PCR al ser inoculadas por el virus (Figura 2).

### Detección de IYSV en arvenses

Se analizaron 295 plantas procedentes de ambas entidades en diferentes tiempos de colecta (212 de Morelos y 83 de Michoacán) y ninguna de ellas

state of Michoacan (Figure 1). The four samples sequenced (two from Morelos and two from Michoacan) displayed an identity of 99 % with the gene of the nucleocapsid for IYSV. The plants inoculated in *N. benthamiana* with the isolate from Michoacan presented symptoms of chlorotic stains in inoculated and non-inoculated leaves, as well as necrosis. The presence of IYSV was confirmed in *N. benthamiana* tissue by RT-PCR, since it was inoculated by the virus (Figure 2).

### Detecting IYSV in weeds

An analysis was carried out on 295 plants from both states in different collection times (212 from Morelos and 83 from Michoacan) and none of them were positive for *Iris yellow spot virus* for DAS-ELISA, except for the positive control. Only 102 weeds (34 %) showed putative symptoms for virosis such as mosaics, yellowing, foliar deformity, and chlorotic spots; however, no symptoms were caused by IYSV. The greatest number of weeds with symptoms was collected in Morelos. The remaining plants were asymptomatic (Figure 3).

### Presence of thrips

Out of the 295 different weeds observed, 75 (25.4 %) presented thrips, out of which 61 came from the state of Morelos and 14 from Michoacan. These insects were observed in 17 species of weeds belonging to the families *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Malvaceae*, and *Acanthaceae*. The thrips were mostly found in *R. communis* (30 of 31 plants analyzed); 27 plants were from the state of Morelos and three from Michoacan, followed by *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* and *Parthenium hysterophorus*, although in less frequency. On the other hand, out of these

**Cuadro 1. Especies de arvenses colectadas y analizadas para IYSV por DAS-ELISA, y presencia de trips en arvenses en las regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán, México.**  
**Table 1. Table 1. Species of weeds gathered and analyzed for IYSV by DAS-ELISA, and presence of thrips in weeds in the onion-producing regions of the states of Morelos and Michoacan, Mexico.**

| Familia/especie                   | Municipios de Morelos*Michoacán | Época de colecta de arvenses orelos*Michoacán | Municipios donde se encontraron plantas con trips | Plantas con trips/<br>Plantas revisadas | Plantas analizadas ELISA/Plantas negativas para IYSV |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Acanthaceae</b>                |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Dicliptera peduncularis</i>    | Ay/ Ez                          | IVO                                           | Ay                                                | 2/4                                     | 4/4 (-)                                              |
| <b>Amaranthaceae</b>              |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Amaranthus hybridus</i>        | Ay/Ax/Ez *Vh/Ta                 | IVO *IO                                       | Ay *Vh                                            | 7/27                                    | 27/27 (-)                                            |
| <i>Amaranthus spinosus</i>        | Ax/Ay                           | O                                             | Np                                                | 0/4                                     | 4/4 (-)                                              |
| <b>Asteraceae</b>                 |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Parthenium hysterophorus</i>   | Ay/Ax/Pi/Za/Ez/Xo*<br>Vh/Ta     | IVO*OI                                        | Ay/Ax/Ez*Vh/Ta                                    | 6/34                                    | 34/34 (-)                                            |
| <i>Bidens pilosa</i>              | Ay/Za                           | IVO                                           | Np                                                | 0/5                                     | 5/5 (-)                                              |
| <i>Tithonia tubiformis</i>        | Ax/Pi/Ay/Xo*Vh                  | IVO*O                                         | Pi/Ez/Ax                                          | 4/17                                    | 17/17 (-)                                            |
| <i>Tithonia diversifolia</i>      | Vh                              | OI                                            | Np                                                | 0/5                                     | 5/5 (-)                                              |
| <i>Lactuca serriola</i>           | Vh                              | I                                             | Vh                                                | 1/1                                     | 1/1 (-)                                              |
| <i>Verbesina crocata</i>          | Ax/Pi/Ay                        | IO                                            | Np                                                | 0/4                                     | 4/4 (-)                                              |
| <i>Conyza spp.</i>                | Ay * Ta                         | I * I                                         | Np                                                | 0/3                                     | 3/3 (-)                                              |
| <i>Flaveria trinervia</i>         | Xo/Ay * Vh                      | IV * O                                        | Np                                                | 0/5                                     | 5/5 (-)                                              |
| <i>Sanvitalia procumbens</i>      | Ay/Pi/Xo                        | IVO                                           | Np                                                | 0/4                                     | 4/4 (-)                                              |
| <i>Sonchus oleraceus</i>          | Ay * Vh/Tan                     | I * IO                                        | Vh                                                | 1/10                                    | 10/10 (-)                                            |
| <b>Chenopodiaceae</b>             |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Chenopodium murale</i>         | Ta/Vh                           | IO                                            | Np                                                | 0/6                                     | 6/6 (-)                                              |
| <i>Chenopodium album</i>          | Ta                              | O                                             | Np                                                | 0/1                                     | 1/1 (-)                                              |
| <b>Convolvulaceae</b>             |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Ipomoea purpurea</i>           | Ay/Ez/Xo/Pi * Ta                | IVO * I                                       | Ez/Ay                                             | 2/7                                     | 7/7 (-)                                              |
| <b>Cruciferae</b>                 |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Lepidium virginicum</i>        | Ay/Ax*Vh/Ta                     | I *I                                          | Ta                                                | 1/5                                     | 5/5 (-)                                              |
| <b>Euphorbiaceae</b>              |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Acalypha ostryifolia</i>       | Ay/Xo/Pi/Ez/Ax*Ta               | IVO*O                                         | Ez/Ay/Ax                                          | 10/27                                   | 27/27 (-)                                            |
| <i>Ricinus comunis</i>            | Ax/Pi/Ez/Ay*Vh                  | IVO*OI                                        | Ax/Pi/Ez/Ay*Vh                                    | 30/31                                   | 31/31 (-)                                            |
| <i>Acalypha arvensis</i>          | Pi/Ez/Xo                        | IVO                                           | Pi                                                | 1/11                                    | 11/11 (-)                                            |
| <i>Euphorbia heterophylla</i>     | Ay/Ax                           | IO                                            | Np                                                | 0/3                                     | 3/3 (-)                                              |
| <b>Lamiaceae</b>                  |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Salvia tiliifolia</i>          | Vh/Ta                           | O                                             | Np                                                | 0/2                                     | 2/2 (-)                                              |
| <b>Malvaceae</b>                  |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Malva parviflora</i>           | Ta/Vh                           | IO                                            | Ta/Vh                                             | 2/6                                     | 6/6 (-)                                              |
| <i>Anoda cristata</i>             | Pi/Ay/Ax                        | IVO                                           | Pi/Ax                                             | 3/5                                     | 5/5 (-)                                              |
| <i>Malvastrum coromandelianum</i> | Pi/Ay/Ax                        | OVI                                           | Pi/Ax                                             | 2/9                                     | 9/9 (-)                                              |
| <b>Portulacaceae</b>              |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Portulaca oleracea</i>         | Ay/Ax/Pi/Ez*Vh/Ta               | IVO*O                                         | Np                                                | 1/12                                    | 12/12 (-)                                            |
| <b>Solanaceae</b>                 |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Solanum rostratum</i>          | Ay/Ax/Pi                        | IV                                            | Np                                                | 0/3                                     | 3/3 (-)                                              |
| <i>Capsicum sp.</i>               | Pi                              | V                                             | Np                                                | 0/2                                     | 2/2 (-)                                              |
| <i>Physalis ixocarpa</i>          | Vh                              | O                                             | Np                                                | 0/2                                     | 2/2 (-)                                              |
| <b>Zygophyllaceae</b>             |                                 |                                               |                                                   |                                         |                                                      |
| <i>Kallstroemia rosei</i>         | Ay/Xo/Pi/Ax                     | IVO                                           | Np                                                | 0/7                                     | 7/7 (-)                                              |

Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Xo: Xochitepec, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich.; I: invierno (diciembre 2014 y/o enero 2015 y/o enero 2016); V: verano (julio 2015); O: Otoño (octubre 2015); Np: No presente / Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Xo: Xochitepec, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich.; I: winter (December 2014 and/or January 2015 and/or January 2016); V: summer (July 2015); O: Autumn (October 2015); Np: Not present.





Figura 1. Síntomas ocasionados por el *Iris yellow spot virus* en hojas de cebolla: a) lesiones iniciales y avanzadas colectadas en el estado de Morelos y b) lesiones iniciales y avanzadas con presencia de una isla verde en el centro de la lesión colectadas en el estado de Michoacán.

Figure 1. Symptoms caused by the *Iris yellow spot virus* in onion leaves: a) initial and advanced wounds collected in the state of Morelos, and b) initial and advanced wounds with the presence of a green islet in the middle, collected in the state of Michoacan.

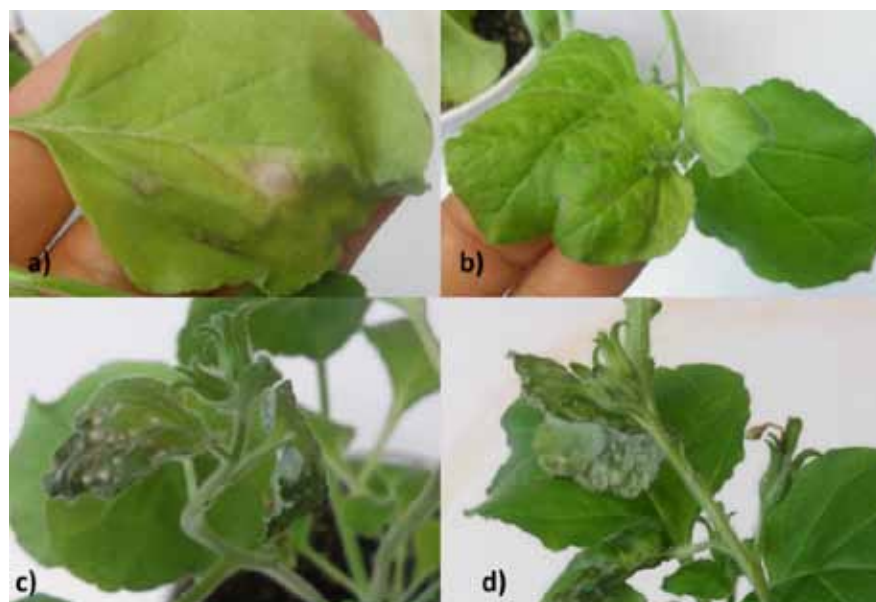


Figura 2. Síntomas de *Iris yellow spot virus* de Michoacán en *N. benthamiana*: a) Lesiones locales de IYSV en hoja inoculada de forma mecánica; b) Lesiones iniciales en hojas no inoculadas; c y d) Lesiones avanzadas en hojas no inoculadas con presencia de manchas cloróticas y necrosis en la hoja.

Figure 2. Symptoms of the *Iris yellow spot virus* from Michoacan in *N. benthamiana*: a) Local IYSV in mechanically inoculated leaf; b) Initial wounds in non-inoculated leaves; c and d) Advances wounds in non-inoculated leaves with chlorotic stains and necrosis in leaves.

fue positiva para *Iris yellow spot virus* por DAS-ELISA, excepto el control positivo. Solo 102 arvenses (34%) mostraron síntomas putativos de virosis como mosaicos, amarillamiento, deformación foliar y manchas cloróticas; no obstante, ningún síntoma fue causado por IYSV. El mayor número de arvenses con síntomas se colectó en Morelos. El resto de las plantas fueron asintomáticas (Figura 3).

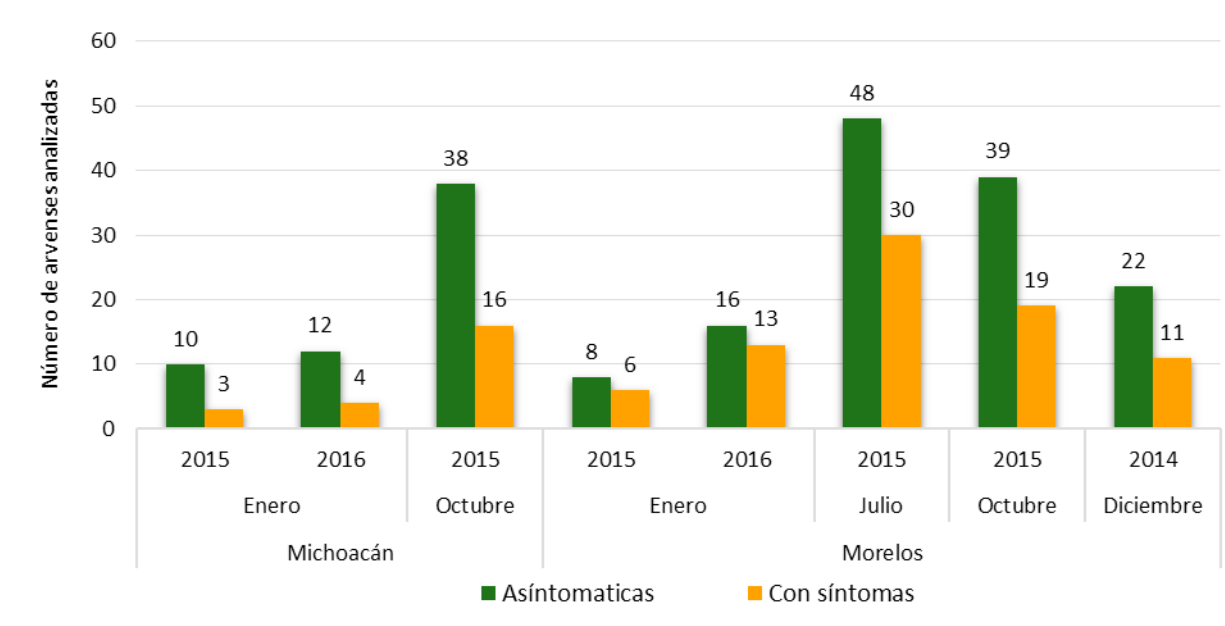
### Presencia de trips

De las 295 plantas observadas de diferentes arvenses, en 75 (25.4 %) se encontraron trips, de las cuales 61 pertenecieron al estado de Morelos y 14 de Michoacán. Estos insectos se observaron en 17 especies de arvenses pertenecientes a las familias *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Cruciferae*, *Convolvulaceae*, *Malvaceae* y *Acanthaceae*. Los trips se encontraron en su mayoría en *R. communis* (30 de 31 plantas analizadas), 27

75 weeds, in the state of Morelos, 19 weeds were gathered when the onion plantation was established, and 42 in the absence of the crop. In the case of Michoacan, 11 weeds with thrips were collected in the absence of the crop and only three in its presence (Figure 4). It is worth highlighting that an increase was observed in the thrips populations in fields with onion crops, mainly in advanced phenological stages (formation of the bulb).

### DNA extraction and PCR

Seventy-five colonies of thrips from the same number of plants collected in Morelos and Michoacan, were established. Out of the total number of colonies, only 33 increased their populations (25 from Morelos and eight from Michoacan). In all cases, the expected amplicon of 710 pb was obtained, and showed an identity of 97 to 100 % for *Thrips tabaci* (Table 2).



**Figura 3.** Arvenses colectadas con síntomas sospechosos de virosis y plantas asintomáticas para el análisis de *Iris yellow spot virus* por DAS-ELISA, en los estados de Michoacán y Morelos, México.

**Figure 3.** Weeds collected with possible virosis symptoms and asymptomatic plants for the analysis of *Iris yellow spot virus* for DAS-ELISA in the state of Michoacan and Morelos, Mexico.

plantas correspondieron al estado de Morelos y tres a Michoacán, seguido por *Acalypha ostryifolia*, *Amaranthus hybridus* y *Parthenium hysterophorus* pero en menor frecuencia. Por otro lado, de estas 75 arvenses, en el estado de Morelos se colectaron 19 arvenses cuando el cultivo de cebolla estaba establecida y 42 arvenses en ausencia del cultivo. En el caso de Michoacán, 11 arvenses con trips se colectaron en ausencia del cultivo y solo tres en presencia del cultivo (Figura 4). Cabe resaltar que se observó un incremento de las poblaciones de trips en las parcelas con presencia del cultivo de cebolla, principalmente en etapas fenológicas avanzadas (formación del bulbo).

### Extracción de ADN y PCR

Se establecieron 75 colonias de trips procedentes del mismo número de plantas colectadas

## DISCUSSION

The *Iris yellow spot virus* is an agriculturally important virus worldwide due to the damage it causes to species of the genus *Allium* (Bag *et al.*, 2009). To this day there have been numerous hosts infected naturally by this virus (Cosmi *et al.*, 2003; Sampagni *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2009b; Evans *et al.*, 2009a; Hsu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Weilner and Bedlan, 2013; Schwartz *et al.*, 2014; Szostek and Schwartz, 2015; Karavina and Gubba, 2017), some of which were found in this study in the municipalities visited. In the state of Michoacan, samples were taken of *S. oleraceus*, *S. nigrum*, *C. album*, *L. serriola*, *Amaranthus sp.* and *P. oleracea*, along with *R. communis*, *Amaranthus sp.* and *P. oleracea* in Morelos, which have been reported as IYSV hosts naturally when analyzed by DAS-ELISA (Schwartz *et al.*, 2014; Karavina

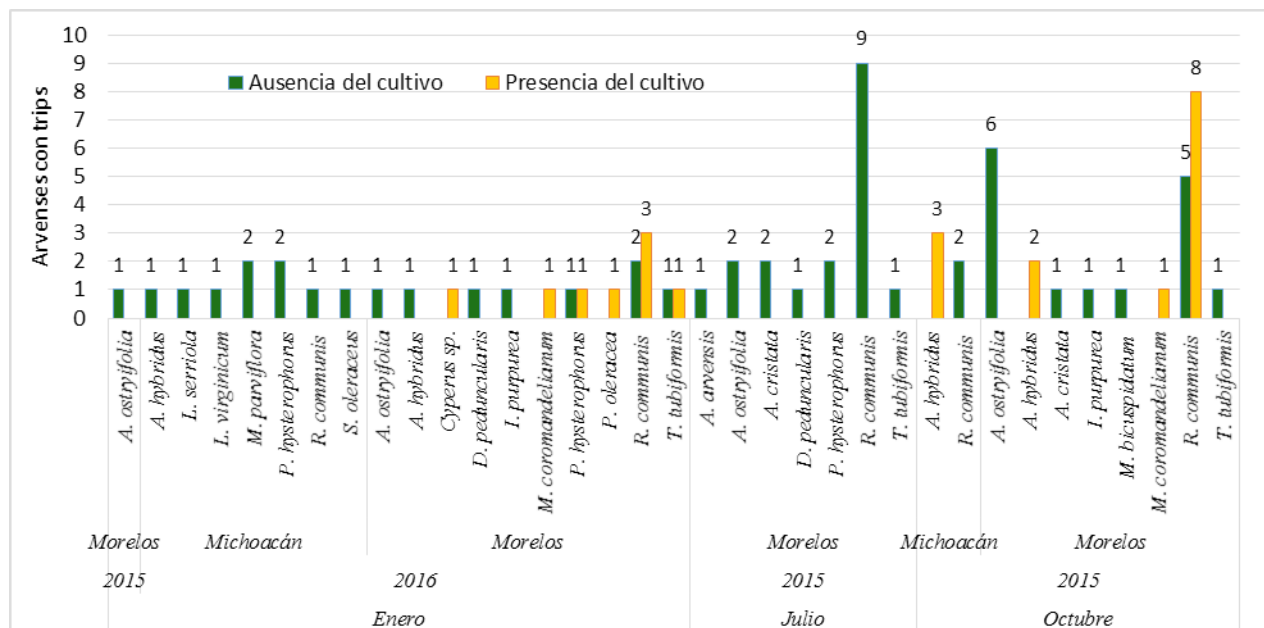


Figura 4. Arvenses con presencia de trips (adultos y/o inmaduros) en diferentes tiempos de muestreo, en presencia y ausencia del cultivo de la cebolla en los estados de Morelos y Michoacán, México.

Figure 4. Weeds with thrips (adult and/or immature) in different sampling times, in the presence and absence of onion crops in the state of Morelos and Michoacán, Mexico.

en Morelos y Michoacán. Del total de colonias establecidas, solo 33 lograron incrementar su población (25 de Morelos y ocho de Michoacán). En todos los casos se obtuvo el amplicón esperado de 710 pb y sus secuencias presentaron una identidad de 97 al 100 % para *Thrips tabaci* (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

*Iris yellow spot virus* es un virus de importancia agrícola en el mundo por los daños que ocasiona a especies del género *Allium* (Bag *et al.*, 2009). A la fecha se han reportado numerosos hospedantes infectados de forma natural por este virus (Cosmi *et al.*, 2003; Sampagni *et al.*, 2007; Evans *et al.*,

and Gubba, 2017). The greatest diversity and frequency of weeds was observed in Morelos, unlike Michoacan, since most of the fields sampled in Michoacan had plastic mulch, controlling the weeds in the fields, along with the farmers weeding and/or spraying herbicides more frequently than in Morelos (data not shown).

Despite the information reported internationally of alternate hosts with the presence of the virus, the range of hosts in Mexico is still unknown. Up to now, the presence of IYSV by DAS-ELISA has only been reported in *Amaranthus* spp., *Bidens odorata*, *Brassica campestris*, *Chenopodium* spp., *Eruca sativa*, *Malva parviflora*, *Medicago sativa*, *Sisimbrio* spp. and *S. oleraceus* in the onion-producing areas of Zacatecas; however, the authors

**Cuadro 2. Colonias de trips colectadas en diferentes especies de arvenses e identificadas por PCR COI, en las regiones productoras de cebolla de los estados de Morelos y Michoacán.**  
**Table 2. Thrips colonies collected from different weed species and identified by PCR COI in onion-producing regions of the states of Morelos and Michoacan.**

| Arvense colectada con presencia de trips | Municipios de Morelos*Michoacán | Época de colecta de trips | No. secuencias con identidad a <i>T. tabaci</i> | Porcentaje de identidad en GenBank |
|------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Ricinus communis</i>                  | Pi/Ax/Ay/Ez*Vh                  | VOI*I                     | 10                                              | 97-100 %                           |
| <i>Amaranthus hybridus</i>               | Ay*Vh                           | OI*I                      | 4                                               | 99-100 %                           |
| <i>Tithonia tubiformis</i>               | Ax/Ez/Pi                        | OI                        | 3                                               | 99-100 %                           |
| <i>Parthenium hysterophorus</i>          | Ez*Ta/Vh                        | I                         | 3                                               | 97-100 %                           |
| <i>Acalypha ostryifolia</i>              | Ax/Ez                           | OI                        | 2                                               | 99-100 %                           |
| <i>Acalypha arvensis</i>                 | Pi                              | V                         | 1                                               | 99 %                               |
| <i>Anoda cristata</i>                    | Ax                              | O                         | 1                                               | 100 %                              |
| <i>Ipomoea purpurea</i>                  | Ay                              | I                         | 1                                               | 99 %                               |
| <i>Dicliptera peduncularis</i>           | Ay                              | I                         | 1                                               | 100 %                              |
| <i>Portulaca oleracea</i>                | Ax                              | I                         | 1                                               | 100 %                              |
| <i>Malvastrum coromandelianum</i>        | Ax                              | I                         | 1                                               | 99 %                               |
| <i>Cyperus</i> sp.                       | Ax                              | I                         | 1                                               | 100 %                              |
| <i>Lepidium virginicum</i>               | Ta                              | I                         | 1                                               | 99 %                               |
| <i>Malva parviflora</i>                  | Vh                              | I                         | 1                                               | 97 %                               |
| <i>Sonchus oleraceus</i>                 | Vh                              | I                         | 1                                               | 99 %                               |
| <i>Lactuca serriola</i>                  | Vh                              | I                         | 1                                               | 99 %                               |

Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich; I: invierno (enero 2016); V: verano (julio 2015); O: Otoño (octubre 2015) / Ay: Ayala, Mor.; Pi: Puente de Ixtla, Mor.; Ez: Emiliano Zapata, Mor. Ax: Axochiapan, Mor.; Vh: Vista Hermosa, Mich.; Ta: Tanhuato, Mich; I: winter (January 2016); V: summer (July 2015); O: autumn (October 2015).

2009b; Evans *et al.*, 2009a; Hsu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Weilner y Bedlan, 2013; Schwartz *et al.*, 2014; Szostek y Schwartz, 2015; Karavina y Gubba, 2017), de las cuales algunas fueron encontradas en el presente estudio en los municipios recorridos. En el estado de Michoacán se colectaron *S. oleraceus*, *S. nigrum*, *C. album*, *L. serriola*, *Amaranthus sp.* y *P. oleracea*; así como, *R. communis*, *Amaranthus sp.* y *P. oleracea* en Morelos, mismas que han sido reportadas como hospedantes de IYSV en forma natural al analizarlas por DAS-ELISA (Schwartz *et al.*, 2014; Karavina y Gubba, 2017). La mayor diversidad y frecuencia de arvenses se observó en Morelos, no así para Michoacán, esto debido a que la mayoría de las parcelas muestreadas en Michoacán tenían acolchado, controlando las arvenses entre el cultivo; además, de que los productores realizan deshierbes y/o aplican herbicidas con mayor frecuencia que en Morelos (datos no mostrados).

A pesar de la información reportada internacionalmente de los hospedantes alternos con presencia del virus, en México aún se desconoce el rango de hospedantes. Hasta el momento solo se ha reportado la presencia de IYSV por DAS-ELISA, en *Amaranthus spp.*, *Bidens odorata*, *Brassica campestris*, *Chenopodium spp.*, *Eruca sativa*, *Malva parviflora*, *Medicago sativa*, *Sisimbrio spp.* y *S. oleraceus* en las zonas productoras de cebolla de Zacatecas; no obstante, los autores no profundizan del número de plantas evaluadas y muestras positivas para el virus (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). En el caso del estado de Morelos Ramírez-Rojas *et al.* (2016) reportaron una incidencia total y una severidad superior al 90 % del virus en todas las zonas productoras de cebolla, pero no evaluaron la presencia del virus en arvenses. Cabe resaltar que aunque en nuestro estudio también se confirmó la presencia del virus en el cultivo de la cebolla, tanto en Morelos y Michoacán durante los ciclos otoño-invierno

do not specify the number of plants evaluated or positive samples for the virus (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). In the case of the state of Morelos Ramírez-Rojas *et al.* (2016) reported a total incidence and a severity of over 90 % of the virus in onion-producing areas, yet they did not evaluate the presence of the virus in weeds. It is worth pointing out that although our study also confirmed the presence of the virus in the onion crop, both in Morelos and Michoacan during the autumn-winter cycles of 2014 and 2015, the analysis was also carried out in the weeds related to the crop and no samples were positive for IYSV.

One of the possible causes to explain why the virus was not found in the weeds analyzed is that it is a localized virus, i.e., it is not systemic, making it more difficult to detect when performing serological tests such as DAS-ELISA (Gent *et al.*, 2006), and even RT-PCR. This has been shown in the case of onion, where its distribution of the virus in the plant is heterogenous, which can give false negatives, leading to an underestimation of its incidence (Hsu *et al.*, 2010). On the other hand, the symptoms caused by the IYSV do not tend to be consistent and clear, therefore, when taking plant tissue samples for their analysis with RT-PCR and/or DAS-ELISA results may be inconsistent (Krauthausen *et al.*, 2012). This expression of symptoms is influenced by the period of incubation, the phenology of the plant at the moment of infection, weather conditions, the level of stress in the plant, as well as in the cultivar (Bag *et al.*, 2012). Likewise, Ochoa *et al.* (1996) point out that obtaining negative samples in weeds does not imply that they are not a reservoir for the virus. It is also possible that during the weed collection dates, the viral content was not detectable with ELISA, since the time of inoculation by thrips was unknown. In addition to this, to date there is no knowledge of the times of acquisition and transmission of IYSV

de 2014 y 2015, también se realizó el análisis en las arvenses asociadas al cultivo y ninguna muestra resultó positiva para IYSV.

Una de las posibles causas del porque el virus no se detectó en las arvenses analizadas, se debe a que es un virus localizado; es decir, no es sistémico, lo que dificulta su detección al momento de hacer pruebas serológicas como DAS-ELISA (Gent *et al.*, 2006) e incluso RT-PCR. Esto se ha demostrado en el caso de la cebolla, donde su distribución del virus en la planta es heterogénea lo que puede dar falsos negativos tendiendo a subestimar su incidencia (Hsu *et al.*, 2010). Por otro lado, los síntomas ocasionados por IYSV no suelen ser consistentes y claros, por lo que al momento de tomar muestras de tejido vegetal para su análisis por RT-PCR y/o DAS-ELISA pueden tenerse resultados inconsistentes (Krauthausen *et al.*, 2012). Dicha expresión de síntomas es influenciado por el período de incubación, la fenología de las plantas al momento de la infección, las condiciones climáticas, nivel de estrés en la planta así como del cultivar (Bag *et al.*, 2012). Así mismo, Ochoa *et al.* (1996) señalan que obtener muestras negativas en arvenses no implica que no sea reservorio del virus. Es posible también que durante las fechas de colecta de las arvenses no se haya tenido la carga viral detectable por ELISA debido a que se desconoce el tiempo de inoculación por los trips. Aunado a ello, a la fecha se desconocen los períodos de adquisición y transmisión de IYSV por *T. tabaci* en las arvenses (Smith *et al.*, 2011). En nuestro estudio también se evaluaron por RT-PCR las arvenses más abundantes, y plantas de chile, jitomate y tomate de cascara (datos no publicados) que fueron sembrados posterior a la cosecha de la cebolla, pero ninguna amplificó la banda para el IYSV. Se debe de considerar que el tejido seleccionado para el análisis quizá no contenía el virus. No obstante, se ha reportado su comportamiento sistémico en *N. benthamiana*, transmitida

by *T. tabaci* in the weeds (Smith *et al.*, 2011). Using RT-PCR, our study also evaluated the most abundant weeds, along with chili pepper, tomato, and tomatillo plants (data not published) that were planted after the harvest of onion, although none amplified the band for IYSV. We must consider that the tissue chosen for the analysis may not have contained the virus. However, its systemic behavior has been reported in *Nicotiana benthamiana*, transmitted mechanically (Kritzman *et al.*, 2001; Bag *et al.*, 2012). These data correspond with our results in the same host, where it showed systemic symptoms after the IYSV inoculation, chlorotic stains in young leaves (non-inoculated area), and necrosis followed by the death of the plant. So far there are no records of IYSV being transmitted through seeds (Kritzman *et al.*, 2001), although its presence has been observed in onion seedbeds (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) in Zacatecas; it is a source of inoculants in these seedbeds and has increased the interest of the study of the ecology of this virus in our entity, since the behavior of the virus in different hosts, vectors, and weeds, can vary.

In regards to thrips, both states showed the greatest presence of insects in weeds in the absence of the crop, and mainly immature states were observed in the vegetative sections of plants, which indicates that these plants can be thrips reservoirs. In fields with onions, few weeds with thrips were gathered, despite the onion plants having large populations of these insects, mainly in advanced phenological stages of the crop. Szostek and Schwartz (2015) recorded the presence of IYSV vector thrips in the absence of the crop in different weeds. This information can back up our data, since larger thrips populations were observed in the absence of the crop. It has been suggested that in the absence of the crop the thrips move to nearby plants and reproduce in them, whether in the vegetative

de forma mecánica (Kritzman *et al.*, 2001; Bag *et al.*, 2012). Estos datos concuerdan con nuestros resultados en el mismo hospedante, donde mostró síntomas sistémicos después de la inoculación del IYSV, manchas cloróticas en hojas jóvenes (zona no inoculada), necrosis y posteriormente la muerte de la planta. Hasta el momento no se tiene registros de IYSV transmitido por semilla (Kritzman *et al.*, 2001), pero si se ha observado su presencia desde almácigos de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) en Zacatecas, siendo una fuente de inóculo en dichos almácigos y aumentando el interés del estudio de su ecología de este virus en nuestra entidad, ya que el comportamiento del virus en diferentes hospedantes, vector y arvenses puede llegar a variar.

Con lo que respecta a los trips, en ambos estados se observó la mayor presencia de los insectos en arvenses en ausencia del cultivo, observándose principalmente estados inmaduros en las partes vegetativas de las plantas, lo cual nos indica que estas plantas pueden ser reservorio de los trips. En las parcelas con presencia del cultivo de cebolla, se colectaron pocas arvenses con presencia de trips, a pesar de que las plantas de cebolla tenían altas poblaciones de estos insectos, principalmente en etapas fenológicas avanzadas del cultivo. Szostek y Schwartz (2015) registraron la presencia de trips vectores de IYSV en ausencia del cultivo en diferentes arvenses. Esta información puede respaldar nuestros datos, al observarse mayores poblaciones de trips en ausencia del cultivo. Se ha sugerido que en ausencia del cultivo, los trips se mueven a plantas aledañas a éste y se reproducen en ellas, ya sea en las partes vegetativas o preferentemente en las inflorescencias (Milne y Walter, 1998). Si bien varias arvenses no se han reportado como hospedantes de IYSV, se sabe que algunas de ellas son hospederas de trips, por lo que resulta importante su consideración en campo como parte de un estudio epidemiológico para el manejo de la enfermedad

sections or preferably in the inflorescences (Milne and Walter, 1998). Although several weeds have not been reported to host IYSV, it is known that some of them are thrips hosts, therefore it is important to consider them in the field as part of an epidemiological study for the management of the disease (Smith *et al.*, 2011). The abundance of weeds with thrips in the state of Morelos (13 weed species), compared to the state of Michoacan (7 weed species), can be an important explanation of the problem caused by this disease in this entity, since weeds host thrips with a possible potential of being viral transmitters. The way in which weeds are eliminated in Michoacan may be the main factor behind the low thrips populations in onion plants (data not published), even under the low records of weeds with thrips populations in Michoacan (14 weeds), in comparison with the state of Morelos (61 weeds).

In *R. communis* and *A. ostryifolia* alone, the greatest presence of thrips in immature and adult stages was observed, mainly in the state of Morelos. In the case of *R. communis*, this result differs from a report by Schwartz *et al.* (2014), who found this species hosts IYSV, but not *T. tabaci*. Although they are different entities, this weed cannot be discarded as a possible reservoir of the virus and the insect, since our data showed it is the main host for *T. tabaci*. Despite the virus not being found in *R. communis*, its study must not be underestimated in these and other weeds, mainly where the insect, the only IYSV vector under field conditions, procreates.

Only *T. tabaci* has been reported as highly transmitting of the virus (Gent *et al.*, 2004; Diaz-Montano *et al.*, 2011). In Mexico it is found in onion plantations (Velásquez-Valle *et al.*, 2011), but only García-Rodríguez *et al.* (2014) confirmed the presence of the virus in *T. tabaci* in garlic plantations. All the thrips collected from

(Smith *et al.*, 2011). La abundancia de arvenses con presencia de trips en el estado de Morelos (13 especies de arvenses) comparado con el estado de Michoacán (7 especies de arvenses), puede ser una explicación importante de la problemática que se tiene de esta enfermedad en esta entidad, al servir las arvenses como hospederos de los trips con posible potencial de ser transmisores del virus. La práctica de eliminación de las arvenses que realizan en el estado de Michoacán, puede ser el factor importante por el cual se tiene inclusive bajas poblaciones de trips en las plantas de cebolla (datos no publicados), inclusive el bajo registro de arvenses con poblaciones de trips en Michoacán (14 arvenses), comparado con el estado de Morelos (61 arvenses).

Solo en *R. communis* y *A. ostryifolia* se observaron mayor presencia de trips en estado inmaduro y adulto, principalmente en el estado de Morelos. En el caso de *R. communis*, este resultado difiere de lo reportado por Schwartz *et al.* (2014), quienes encontraron a esta especie como hospedante de IYSV pero no de *T. tabaci*. Si bien son entidades diferentes, no se debe descartar dicha posibilidad de esta arvense como reservorio del virus y del insecto, ya que nuestros datos mostraron ser el hospedante principal de *T. tabaci*. Pese a que no se detectó el virus en *R. communis*, no se debe de subestimar su estudio en esta y demás arvenses, principalmente donde se reproduce el insecto, que hasta el momento es el único vector de IYSV bajo condiciones de campo.

Se ha reportado solo a *T. tabaci* con alta eficiencia de transmisión del virus (Gent *et al.*, 2004; Díaz-Montano *et al.*, 2011). En México se tiene su presencia en el cultivo de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2011), pero solo García-Rodríguez *et al.* (2014) confirmaron la presencia del virus en *T. tabaci* localizados en el cultivo de ajo. Todos los trips colectados de las diferentes arvenses que se lograron aumentar su población, correspondieron

the different weeds that managed to increase their population corresponded to *T. tabaci*; however, if they were carriers of the virus or not was not determined, although these plants are considered important thrips reservoirs, which can be potential in the spreading of IYSV in onion plantations (Jones, 2005). The transovarian transmission of IYSV has not yet been proven in thrips, therefore the individuals of each generation must acquire the virus to be able to transmit it (Weilner and Bedlan, 2013), increasing the interest in the behavior of the ecology of the virus.

As mentioned earlier, many of these vector insects can reproduce successfully in diverse unplanted species. These data indicate that thrips can remain indefinitely in a particular area, even in the absence of onion plants. An adequate control of weeds before the increase of thrips populations could reduce their migration (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) or their movement to voluntary onion plants (Ghotbi *et al.*, 2005) which can act as an IYSV reservoir outside the crop's cycle, increasing the possibility of early infections in the following cycle (Hsu *et al.*, 2011). Our data are backed up by what we mentioned earlier, concerning the handling of weeds in the state of Michoacan in contrast to the state of Morelos, which may explain the prevalence of high thrips populations of Morelos, since they have more alternate hosts in the absence of onion plants, their main host. In the state of Morelos there is not an adequate management of weeds, and in many of them, the presence of *T. Tabaci* in immature stages was found. We also found large thrips populations in onion plants.

Our data suggest that the difference in the intensity of the disease observed in both states can be due to the diversity and frequency of weeds found in Morelos, with the consequence of higher thrips populations. Also, in the state of Michoacan, a better management of weeds and crops was



a *T. tabaci*; sin embargo, no se determinó si eran portadoras del virus, pero, se considera de importancia estas plantas como reservorios de los trips, mismos que pueden ser potenciales en la dispersión del IYSV en el cultivo de la cebolla (Jones, 2005). Aún no se ha demostrado la transmisión transovárica de IYSV en trips por lo que los individuos de cada generación deben adquirir al virus para poder transmitirlo (Weilner y Bedlan, 2013). Aumentando el dicho interés en su comportamiento de la ecología del virus.

Como ya se mencionó, muchos de estos insectos vectores pueden reproducirse exitosamente en diversas especies no cultivadas. Estos datos indican que los trips pueden permanecer indefinidamente en determinada zona aún en ausencia del cultivo de cebolla. El adecuado control de las arvenses antes del aumento de las poblaciones de trips, podría reducir su migración (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) o su movimiento a plantas voluntarias de cebolla (Ghotbi *et al.*, 2005) que pueden servir de reservorio de IYSV fuera del ciclo del cultivo, aumentando la posibilidad de infecciones tempranas en el siguiente ciclo (Hsu *et al.*, 2011). Nuestros datos son respaldados por lo anteriormente mencionado, que ante el manejo que se tiene de las arvenses en el estado de Michoacán en contraste con el estado de Morelos, puede explicar la prevalencia de las altas poblaciones de trips que existe en Morelos al tener mayor número de hospedantes alternos ante la ausencia del hospedante principal, la cebolla. En el estado de Morelos no se tiene un manejo adecuado de las arvenses y muchas de ellas se detectó la presencia de estados inmaduros de *T. tabaci*. Además de observarse altas poblaciones de trips en el cultivo de la cebolla.

Nuestros datos sugieren que la diferencia en la intensidad de la enfermedad que se tiene en ambos estados, puede deberse a la diversidad y frecuencia

observed, such as rotation, with the consequential reduction in weeds and thrips, as well as low populations of this insect in the crop. Regardless of our study not determining the presence of the virus in the thrips obtained from the weeds, it is known to be the main vector, and considering the wide range of *T. tabaci* hosts in these entities, it can be important in the epidemiology of IYSV.

Our work has confirmed the presence of IYSV in the state of Michoacan, where it has not been reported before. Likewise, the presence of *T. tabaci* in several weeds of both states suggests the importance as hosts of the insect in the absence of the crop, mainly those located on the edges of the fields and the possibility of being IYSV hosts in the future. Taking this into account, having a broad knowledge of these interactions would help obtain better crop management strategies. Likewise, limiting studies to just the species of weeds in which the vector reproduces, or carrying out mechanical transmission tests on these weeds, as well as virus transmission tests on the thrips collected from the weeds, we could obtain concise data to understand the virus epidemic in onion crops in an efficient way.

## CONCLUSIONS

This study did not find the *Iris yellow spot virus* in the species of weeds collected in fields with or without onion crop in Morelos and Michoacan; however *T. tabaci* was identified as the only species in 13 species of weeds collected in Morelos and seven collected in Michoacan as alternate hosts of the IYSV putative vector. These weeds play an important role in the intensity of the disease, since they are *T. tabaci* reservoirs, and are more frequent in Morelos than in Michoacan.

de arvenses que se tiene en la entidad de Morelos, teniendo como consecuencia, mayores poblaciones de trips. Además, en el estado de Michoacán, se observó un mejor manejo de las arvenses y del cultivo, como la rotación, observándose baja diversidad de arvenses y trips, así como bajas poblaciones del insecto en el cultivo. Pese que en nuestro estudio, no se determinó la presencia del virus en los trips obtenidos de las arvenses, se sabe que es el principal vector, y al conocer el amplio rango de hospedantes de *T. tabaci* en estas entidades, puede ser importante en la epidemiología de IYSV.

Este trabajo ha confirmado la presencia de IYSV en el estado de Michoacán, donde no se ha reportado previamente. Así mismo, la presencia de *T. tabaci* en varias arvenses de ambos estados, nos sugiere la importancia como hospederos del insecto en ausencia del cultivo, principalmente las que se encuentran en las orillas de las parcelas y la posibilidad de ser hospederos de IYSV en un futuro. Ante lo mencionado, el tener un amplio conocimiento de dichas interacciones ayudaría a obtener mejores estrategias de manejo del cultivo. Así mismo, confinar los estudios solo a las especies de arvenses donde se reproduce el vector o hacer pruebas de transmisión mecánica en dichas arvenses, así como pruebas de transmisión del virus en los trips recolectados de las arvenses, podríamos obtener datos concisos para entender de forma eficiente la epidemia del virus en el cultivo de cebolla.

## CONCLUSIONES

En este estudio no se detectó la presencia de *Iris yellow spot virus* en las especies de arvenses recolectadas durante los muestreos en parcelas con o sin cultivo de cebolla, en Morelos y Michoacán; sin embargo, se identificó como única especie a *T. tabaci* en 13 especies de arvenses recolectadas en

## ACKNOWLEDGEMENTS

The main author wished to thank CONACyT for the scholarship granted for the completion of his doctoral studies. To the trusteeship Num. 167304 granted for the scientific research and technological development of the Colegio de Postgraduados, as well as the collaboration of M. C. Juan Carlos Delgado Castillo, specialist in weeds of the Plant Health Program, SAGARPA, Guanajuato.

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

Morelos y siete en Michoacán como hospedantes alternos del putativo vector de IYSV. Estas arvenses juegan un papel importante en la intensidad de la enfermedad, al ser reservorios de *T. tabaci*, observándose mayor frecuencia de arvenses en Morelos comparado con Michoacán.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONACyT por la beca otorgada para realizar el doctorado. Al Fideicomiso No. 167304 otorgado por la Investigación científica y desarrollo tecnológico del Colegio de Postgraduados, así mismo la colaboración del M. C. Juan Carlos Delgado Castillo, especialista en arvenses del Programa de Sanidad Vegetal, SAGARPA, Guanajuato.

## LITERATURA CITADA

- Bag S, Schwartz HF and Pappu HR. 2012. Identification and characterization of biologically distinct isolates of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*), a serious pathogen of onion. *European Journal of Plant Pathology* 134: 97-104. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0026-1>
- Bag S, Druffel KL, Salewsky T and Pappu HR. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. *Archives of Virology* 154 (4): 715-718. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-009-0349-1>
- Brewster JL. 2008. Onion and other vegetable allium. 2nd edition. CAB International. London UK 204p.

- Chatzivassiliou EK, Peters D and Katis NI. 2007. The role of weeds in the spread of *Tomato spotted wilt virus* by *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in tobacco crops. *Journal Phytopathology* 155: 699-705. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01302.x>
- Cosmi T, Marchesini E and Martini G. 2003. Presence and spread of *Tospovirus* and thrip vectors in Veneto. *Infomatore Agrario* 59:69-72. Disponible en línea: <http://www.cabi.org/ISC/abstract/20033086912>.
- Diaz-Montano J, Fuchs M, Nault BA, Fail J and Shelton AM. 2011. Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae): A global pest of increasing concern in onion. *Journal of Economic Entomology*. 104 (1): 1-13 <http://dx.doi.org/10.1603/EC10269>
- du Toit LJ, Burger JT, McLeod A, Engelbrecht M and Viljoen A. 2007. *Iris yellow spot virus* in onion seed crops in South Africa. *Diseases notes*. 91(9):1203. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1203A>
- Espinosa FJ y Sarukhán J. 1997. Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 407p.
- Evans CK, Bag S, Frank E, Reeve JR, Ransom C, Drost D and Pappu HR. 2009a. Natural infection of *Iris yellow spot virus* in twoscale saltbush (*Atriplex micrantha*) growing in Utah. *Disease notes*. 93(4):430. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-4-0430C>.
- Evans CK, Bag S, Frank E, Reeve JR, Ransom C, Drost D and Pappu HR. 2009b. Green foxtail (*Setaria viridis*), a naturally infected grass host of *Iris yellow spot virus* in Utah. *Plant Disease* 93 (6): 670 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0670C>.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515>.
- García-Rodríguez OG, Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Salas-Araiza MD, Martínez-Jaime OA, León-Galván MF y Núñez-Palenius HG. 2014. Virus Fitopatogénos en insectos asociados al ajo. *Revista Chapingo serie Horticultura* 20(2):147-156. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.10057>
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: an emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease*. 90 (12): 1468-1480. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1468>
- Gent DH, Schwartz HF and Khosla R. 2004. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. *Plant Disease* 88(5): 446-452. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.446>
- Ghotbi T, Shahraeen N and Winter S. 2005. Occurrence of *Tospoviruses* in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease* 89: 425-429. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0425>.
- Hsu CL, Hoeping CA, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 2010. Temporal dynamics of *Iris yellow spot virus* and its vector, *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae), in seeded and transplanted onion fields. *Environmental entomology* 39(2): 266-277. <http://dx.doi.org/10.1603/EN09165>.
- Hsu CL, Hoeping CA, Fuchs M, Smith EA and Nault BA. 2011. Sources of *Iris yellow spot virus* in New York. *Plant Disease* 95:735-743. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0353>
- Jones DR. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*. 113:119-157. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-2334-1>.
- Karavina C and Gubba A. 2017. *Amaranthus* sp. and *Eleusine indica* are natural host of *Iris yellow spot virus* in Zimbabwe. *Disease notes*. *Plant Disease*. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0652-PDN>
- Krauthausen HJ, Leeinhos ME, Müller J, Radtke PC and Jehle JA. 2012. Identification and incidence of *Iris yellow spot virus* in Allium field crops in Southwest Germany. *European Journal of plant Pathology* 134:345-356. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-9993-5>.
- Kritzman A, Lampel M, Raccach B and Gera A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*. 85:838-842. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.838>
- Milne M and Walter GH. 1998. Host species and plant part specificity of the polyphagous onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), in an Australian cotton-growing area. *Australian Journal of Entomology* 37:115-119. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-6055.1998.000017.x>.
- Ochoa MDL, Zavaleta-Mejía E., Johansen NRM, Herrera GA and Cardenas-Soriano E. 1996. *Tospoviruses*, weeds and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris). *International journal of Pest Management*. 42(3):157-159. <http://dx.doi.org/10.1080/09670879609371988>
- Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Ramírez-Malagón R y Mendoza-Celedón B. 2010. Impacto e Identificación de Virus Fitopatogénos Sobre Rendimiento y Calidad del Ajo (*Allium sativum* L), en el Estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2):97-110. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a3.pdf>
- Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez F de J, Bartolo-Reyes JC y Varela-Loza V. 2016. Detección de *Iris yellow spot virus* en cebolla cultivada en Tepalcingo, Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (3):308-315. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-1>.
- Rodríguez SP, Lindsey G and Fernandes PMB. 2007. Biotechnological approaches to the control of plant viruses. Pp. 126-138. *In* Thangadurai D, Tang W. and Song SQ (Eds.). *Plant stress and biotechnology*. 1st edition. Oxford Book Company. Jaipur, India. 257p.
- Rzedowski GC de y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 975p. Disponible en línea: [http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora\\_del\\_Valle\\_de\\_Mx1.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf)
- Rzedowski GC de y Rzedowski J. 2004. Manual de malezas de la región de Salvatierra, Guanajuato. Flora del Bajío

- y de regiones adyacentes. Fascículo complementario XX. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz. 315 p. Disponible en línea: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/ComplementarioXX.pdf>
- Sampangi RK and Mohan SK. 2007. Identification of new alternative weed hosts for *Iris yellow spot virus* in the Pacific Northwest. *Diseases note*. 91(12):1683. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1683B>.
- Schwartz HF, Gent DH, Fichtner SM, Otto K, Boateng CO, Szostek S, Cranshaw WS and Mahaffey LA. 2014. *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) and *Iris yellow spot virus* associated with onion transplants, onion volunteers, and weeds in Colorado. *Southwestern Entomologist* 39(4):691-704. <http://dx.doi.org/doi:10.1603/EN10246>.
- Smith EA, DiTommaso A, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 2012. Abundance of weed hosts as potential sources of onion and potato viruses in western New York. *Crop Protection*. 37:91-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.007>.
- Smith EA, DiTommaso A, Fuchs M, Shelton AM and Nault BA. 2011. Weed hosts for onion thrips (Thysanoptera: Thripidae) and their potential role in the epidemiology of *Iris yellow spot virus* in an onion ecosystem. *Environmental Entomology*. 40(2): 194-203. <http://dx.doi.org/10.1603/EN10246>.
- Sutula CL, Gillett JM, Morrissey SM and Ramsdell DC. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease*. 70 (8): 722-726. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n08\\_722.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n08_722.pdf).
- Syller J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology*. 13(2): 204-216. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00734.X>.
- Szostek AS and Schwartz HF. 2015. Overwintering sites of *Iris yellow spot virus* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 40(2): 273-290. <http://dx.doi.org/10.3958/059.040.0204>.
- Velásquez-Valle R. y Reveles-Hernández M. 2011. Detección del *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(6):971-978. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263121473013>
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Amador-Ramírez MD. 2013. Hortalizas y virosis en zacatecas: un patosistema complejo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(8):1267-1277. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342013000800012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800012)
- Velásquez VR, Reveles TLR, Salas MS, Mauricio CJA and Pappu HR. 2016. First Confirmed Report of *Iris yellow spot virus* in Onion Nurseries in Zacatecas, México. *Plant Disease* <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-16-0061-pdn>
- Vibrans H and Tenorio LP. 2012. Malezas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (Conabio). [www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm). (Consulta, año 2016).
- Weilner S. and Bedlan G. 2013. Detection of *Iris yellow spot virus* (IYSV) in selected *Allium* species and overwintering host in Austrian onion-producing areas. *Journal für Kulturpflanzen*. 65(2):60-67. <http://dx.doi.org/DOI 10.5073/JfK.2013.02.3>.

# Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*)

## Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*)

**Ana Karina Uc-Arguelles**, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; **Jesús Pérez-Moreno**, Instituto de Edafología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; **Victoria Ayala-Escobar**, **Emma Zavaleta-Mejía\***, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230. \*Autor para correspondencia: zavaleta@colpos.mx.

Recibido: 17 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 03 de Abril, 2017.

Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V, Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonism of *Saccharicola* sp. against phytopathogens of the root of jalapeno pepper (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 263-283.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-6

Primera publicación DOI: 1 de mayo, 2017.

First DOI publication: May 1, 2017.

**Resumen.** Se evaluó la capacidad antagonista de *Saccharicola* sp *in vitro* e invernadero contra *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Mediante confrontaciones duales se evaluó la reducción de crecimiento del fitopatógeno y se registró el número de días en que el antagonista invadió el micelio de los patógenos, se determinó la viabilidad del micelio invadido y la producción de propágulos del fitopatógeno. *Saccharicola* sp causó reducción de 44.8 % y 45.1 % en el crecimiento de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc) y en *R.*

**Abstract.** The antagonist capacity of *Saccharicola* sp against *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was evaluated *in vitro* and under greenhouse conditions. Through dual confrontation tests its impact was evaluated on the pathogen's growth and the number of days when the antagonist invaded the pathogen mycelia, and also the viability of the invaded mycelia, and the production of pathogen propagules was determined. *Saccharicola* sp caused a reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* growth 3 days after confrontation (dac), and 36.2 % in *R. solani* at 2 dac. The microculture technique was used to determine its mycoparasitic potential. At 72 h, the antagonist winded around *P. capsici* mycelia. In *R. solani* starting at 24 h ac, different types of clefts were observed on its walls, at the points where it was in contact with the antagonist. Although *Saccharicola* sp *in vitro* conditions showed a negative effect against phytopathogens and there was evidence of mycoparasitism, under greenhouse conditions disease incidence and severity did not decrease nor promoted plant growth.

*solani* 36.2 % a los 2 dpc. Para determinar su potencial micoparasítico se realizaron microcultivos. A las 72 h se observó el enrollamiento del antagonista alrededor de *P. capsici*. En *R. solani* desde las 24 h se observaron hundimientos en los sitios de contacto con el antagonista. A pesar que en condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp mostró un efecto negativo contra los fitopatógenos y hubo evidencia de micoparasitismo, en invernadero no redujo la incidencia y severidad de la enfermedad, ni promovió el crecimiento de las plantas.

**Palabras clave:** control biológico, micoparásito, marchitez del chile, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

El chile (*Capsicum annuum*) es uno de los cultivos agrícolas importantes de México (Castro-Rocha *et al.*, 2012) y es un componente básico de la dieta de la población (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). De acuerdo al Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) para el 2014 la superficie sembrada fue de 148,968.51 ha con un rendimiento promedio nacional de 19.05 ton/ha constituyendo un valor estimado de más de 17 millones de pesos. Sin embargo, de la superficie sembrada solo se cosecharon 143,465.17 ha; entre los factores que afectan la producción está el ataque por fitopatógenos que afectan la raíz como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Pythium* spp y *Phytophthora capsici*. (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). Este último es considerado un patógeno devastador capaz de infectar tanto las raíces como la parte aérea (Hwang y Kim, 1995; Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999; Lamour *et al.*, 2012), causa la marchitez del chile junto con un complejo fúngico en el que recurrentemente se aíslan *R. solani* y *Fusarium* spp (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). El control se ha dirigido principalmente contra *P. capsici* mediante

**Key words:** biological control, mycoparasitic, chili wilting, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*.

Chili pepper (*Capsicum annuum*) is one of the most important agricultural crops in Mexico (Castro-Rocha *et al.*, 2012), as well as a basic component of the Mexican population diet (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). According to the Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), in 2014 the area grown to chili pepper was 148,968.51 ha with a national average yield of 19.05 ton/ha and estimated value of over 17 million pesos. However, from the area sown to chili pepper only 143,465.17 ha were harvested. One of the factors affecting chili pepper production is phytopathogenic damage to root caused by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp, *Pythium* spp and *Phytophthora capsici*. (Velásquez-Valle *et al.*, 2001). The latter is considered a lethal pathogen able to infect both root and above-ground plant parts (Hwang and Kim, 1995; Erwin and Ribeiro, 1996; Ristaino and Johnston, 1999; Lamour *et al.*, 2012), because it causes plants to wilt along with a fungal complex in which *R. solani* and *Fusarium* spp are repeatedly isolated (Ramos-Sandoval *et al.*, 2010). Fungal control has been focused mainly on *P. capsici* using cultural practices, resistant varieties and chemicals, being chemicals the most commonly used. However, the high cost of production and problems caused by the frequent use of chemicals make it necessary to find alternatives for managing these pathogens.

An alternative for disease management is biological control through the introduction of antagonistic organisms, which combined with other methods, may significantly contribute to the effective management of root diseases (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). The *Saccharicola* sp fungus produces

prácticas culturales, variedades resistentes y aplicación de químicos, siendo estos últimos los más utilizados. Sin embargo, los altos costos de producción y problemas inherentes al uso frecuente de los químicos obligan a buscar alternativas para el manejo de estos patógenos.

Una alternativa de manejo de enfermedades lo constituye el control biológico mediante la introducción de organismos antagonistas, que integrado con otros métodos puede contribuir de manera significativa al manejo efectivo de las enfermedades radicales (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). El hongo *Saccharicola* sp produce metabolitos secundarios denominados “poliquétidos” (Rojas *et al.*, 2011; Chapla *et al.*, 2012), que actúan como antibióticos (eritromicina y tetraciclinas), anticancerígenos (epotilonas), inmunosupresores (rapamicina) y anticolesterémicos (lovastatina) (Kwan y Schulz, 2011; Rojas *et al.*, 2011).

Recientemente (Silva, 2015) se aisló a *Saccharicola* sp a partir de plantas de tule (*Typha domingensis*) y sabiendo de su potencial como productor de metabolitos tóxicos, se realizaron ensayos preliminares *in vitro* para probar sus propiedades antimicrobianas. Con anterioridad Chapla *et al.* (2012) habían reportado el efecto antifúngico de *Saccharicola* sp contra *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* y *Microbotryum violaceum*. El género *Saccharicola* es un endófito que ha sido aislado de diferentes especies de *Saccharum* (Leme *et al.*, 2013) y de plantas acuáticas como *Eichhornia azurea* y *E. crassipes* (Almeida *et al.*, 2015), entre otras especies de plantas. Con base en lo anterior, se consideró relevante investigar qué potencial tiene el hongo *Saccharicola* sp como antagonista de patógenos de la raíz que causan las mayores pérdidas en chile. Así el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antagonista de *Saccharicola* sp contra *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* en condiciones *in vitro* e invernadero.

secondary metabolites known as “polyketides” (Rojas *et al.*, 2011; Chapla *et al.*, 2012) that act as antibiotics (erythromycin and tetracycline), anticancer (epothilones), immunosuppressants (rapamycin) and anticholesteremics (lovastatin) (Kwan and Schulz, 2011; Rojas *et al.*, 2011).

Recently, *Saccharicola* sp was isolated from tule plants (*Typha domingensis*) (Silva, 2015), and knowing its potential as toxic metabolites producer, preliminary *in vitro* tests were performed to prove its antimicrobial properties. Chapla *et al.* (2012) previously reported the antifungal effect of *Saccharicola* sp against *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* and *Microbotryum violaceum*. The *Saccharicola* genus is an endophyte that has been isolated from different *Saccharum* species (Leme *et al.*, 2013) and aquatic plants such as *Eichhornia azurea* and *E. crassipes* (Almeida *et al.*, 2015), among other species. Based on this information, it was considered relevant to investigate the potential of the *Saccharicola* sp fungus as antagonist of the root pathogens responsible for the greatest losses in chili pepper production. Thus, the objective of this study was to evaluate the antagonistic effect of *Saccharicola* sp against *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, under *in vitro* and greenhouse conditions.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in laboratories and greenhouses of Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, located in the municipality of Texcoco, State of Mexico. The isolates used were *Phytophthora capsici* 6143, provided by Dr. Fernández-Pavía, from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; *Saccharicola* sp, *Fusarium oxysporum*

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México. Los aislamientos utilizados fueron: *Phytophthora capsici* 6143 proporcionado por la Dra. Fernández-Pavía, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; *Saccharicola* sp, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* fueron proporcionados en el laboratorio 209 de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

### Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se realizaron confrontaciones duales para evaluar el efecto antagónico de *Saccharicola* sp. Se estableció un ensayo con siete tratamientos: 1) Antagonista-*Phytophthora capsici* (A-Pc), 2) Antagonista-*Fusarium oxysporum* (A-Fo), 3) Antagonista-*Rhizoctonia solani* (A-Rs), 4) Testigo antagonista (A), 5) Testigo *Phytophthora capsici* (Pc), 6) Testigo *Fusarium oxysporum* (Fo) y 7) Testigo *Rhizoctonia solani* (Rs). Cada tratamiento constó de 10 repeticiones. En cada caja Petri de 90 mm de diámetro conteniendo Infusión Papa Azúcar y Agar (IPAA) se colocó, a 1 cm de la periferia, un cilindro de 5 mm de diámetro con micelio del antagonista y se mantuvieron en oscuridad a 27±1 °C. Cuatro días después, se colocó, en el extremo opuesto de la caja, un cilindro de IPAA de 5 mm conteniendo micelio de Pc, Fo o Rs, y en las cajas de los testigos se colocó en cada extremo un cilindro de Pc, Fo o Rs. Las cajas se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas.

and *Rhizoctonia solani* were provided by the laboratory 209 from Physiology Plant-Pathogen Interaction of Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

### Antagonism tests *in vitro*

Dual confrontations were performed in order to evaluate the antagonistic effect of *Saccharicola* sp. A trial with seven treatments was established: 1) Antagonist-*Phytophthora capsici* (A-Pc), 2) Antagonist-*Fusarium oxysporum* (A-Fo), 3) Antagonist-*Rhizoctonia solani* (A-Rs), 4) Antagonist control (A), 5) *Phytophthora capsici* control (Pc), 6) *Fusarium oxysporum* control (Fo) and 7) *Rhizoctonia solani* control (Rs). Each treatment included 10 replications. In each Petri dish 90 mm in diameter filled with Potato-Sugar-Agar Infusion (IPAA), a cylinder 5 mm in diameter containing mycelium of the antagonist was placed 1 cm from the periphery and then kept in darkness at 27±1 °C. Four days later, a cylinder 5 mm in diameter filled with IPAA containing Pc, Fo or Rs mycelium was placed at the opposite end of the dish. A cylinder filled with Pc, Fo or Rs was placed at each end of the control dishes. The dishes were kept under the conditions previously mentioned.

### Evaluated variables

Mycelial growth in the different treatments was measured (in cm) every 24 h and the number of days when hyphae of the confronted isolates came into contact was recorded for each treatment. When the mycelium of both the antagonist and the pathogen came into contact, the growth reduction percentage of the phytopathogen was calculated



### VARIABLES EVALUADAS

Se midió en cm cada 24 h el crecimiento micelial en los diferentes tratamientos y se registró para cada uno el número de días en que entraban en contacto las hifas de los aislamientos confrontados; cuando el micelio de ambos (antagonista y patógeno) estuvieron en contacto se calculó el porcentaje de reducción de crecimiento del fitopatógeno, con la fórmula propuesta por Sid-Ahmed *et al.* (1999). Considerando el promedio de crecimiento en cm de los patógenos en las cajas testigo, así como el promedio de crecimiento en la confrontación dual.

Las cajas se mantuvieron en observación durante 30 días para registrar el número de días en que el antagonista crecía sobre el micelio de los patógenos. También se evaluó la viabilidad del micelio de los patógenos confrontados con el antagonista cuando éste creció sobre la colonia de los patógenos. Una vez que el antagonista creció sobre la colonia de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani* se tomaron, de cinco cajas Petri de cada tratamiento, tres cilindros de medio con crecimiento micelial del fitopatógeno invadido y se sembraron en IPAA para determinar si el micelio de Pc, Fo y Rs permanecía viable. Después de la siembra se realizaron observaciones cada 24 h durante 5 días para determinar si crecía el fitopatógeno.

Con la finalidad de conocer el efecto del antagonista sobre la producción de propágulos (esporas o zoosporas) del fitopatógeno a los 21 dpc para *P. capsici* y a los 30 para *F. oxysporum*. Para el caso de *F. oxysporum*, de cinco cajas de los tratamientos A-Fo y del correspondiente testigo (Fo), se tomaron de cada caja tres cilindros de 5 mm de diámetro con micelio del lado de crecimiento del patógeno y se colocaron en tubos (Sarstedt®) con 5 ml de agua destilada estéril, se agitaron y con una micropipeta se tomaron 200 µl de la suspensión y se realizó el conteo de microconidios con la ayuda de un hematócitosmetro (Marienfeld®).

using the formula proposed by Sid-Ahmed *et al.* (1999). For this calculation we considered the growth average (in cm) of the pathogens in the control dishes, as well as the growth average from the dual confrontation.

The dishes were kept under observation during 30 days to record the number of days when the antagonist developed on the pathogens' mycelium. The viability of the mycelium of the pathogens confronted with the antagonist was also evaluated when it developed on the pathogens colony. When the antagonist developed on *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani* colonies, five Petri dishes were taken and from each dish three cylinders containing medium and showing mycelial growth of the invaded phytopathogen, and sown in IPAA to determine whether Pc, Fo and Rs mycelium was viable. After sowing, observations were made every 24 h during 5 days to determine if the phytopathogen was developing.

To know the antagonist effect on phytopathogen propagule production (zoospores or spores) at 21 dpc for *P. capsici*, and at 30 dpc for *F. oxysporum*, the following procedure was used: for *F. oxysporum*, from five dishes containing A-Fo treatments and their corresponding control (Fo), three cylinders 5 mm in diameter filled with mycelium were taken from the side where the pathogen developed and placed in tubes (Sarstedt®) filled with 5 ml of sterile distilled water; then the cylinders were shaken, and, using a micropipette, 200 µl of suspension were taken to count micronidia using a hemacytometer (Marienfeld®).

For *P. capsici*, from each of the five Petri dishes, three cylinders 1 cm in diameter filled with mycelial growth were taken and placed in dishes 50 mm in diameter filled with sterile distilled water and incubated at 27±1 °C for 48 h under white light to induce sporangia formation. After this period, and to induce zoospore release, the dishes were kept at 4 °C for 20 min, and then at 27±1 °C for

Para *P. capsici*, de cada una de cinco cajas Petri se tomaron tres cilindros de 1 cm de diámetro de medio con crecimiento micelial, se colocaron en cajas de 50 mm de diámetro conteniendo agua destilada estéril y se incubaron a  $27\pm 1$  °C durante 48 h con luz blanca para inducir la formación de esporangios. Transcurrido este tiempo y con la finalidad de inducir la liberación de zoosporas las cajas se mantuvieron a 4 °C durante 20 min y después a  $27\pm 1$  °C durante 1 h. Enseguida se realizaron observaciones bajo el microscopio estereoscópico para registrar la abundancia relativa de zoosporas con respecto al testigo.

#### **Interacción micelial de *Saccharicola* sp-*P. capsici* y *Saccharicola* sp-*R. solani***

Para conocer si el antagonista *Saccharicola* sp parasita el micelio de *P. capsici* y *R. solani*, se realizaron microcultivos de acuerdo a la técnica descrita por Riddell (1950) con algunas modificaciones. El experimento constó de cinco tratamientos y cada 24 h durante 15 días se realizaron observaciones en cuatro repeticiones de cada tratamiento, teniendo un total de 60 cajas Petri para cada tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron: 1) Antagonista-*P. capsici* (A-Pc); 2) Antagonista-*R. solani* (A-Rs); 3) testigo antagonista; 4) testigo Pc; y 5) testigo Rs.

En cajas Petri con IPAA se sembraron a 1 cm de la periferia cilindros de 5 mm con micelio del antagonista. Con una pinza estéril se tomó un cubreobjetos de 18x18 mm previamente esterilizado y se colocó en la parte media de cada caja. Después de 72 y 96 h, en el otro extremo de la caja se colocó un cilindro de 5 mm con micelio de Pc o Rs a 1 cm de distancia. En todos los casos las cajas se mantuvieron en oscuridad a  $27\pm 1$  °C. En los testigos se procedió de la misma manera. Cada 24 h durante 15 días se realizaron observaciones de los cubreobjetos en cuatro repeticiones de cada tratamiento,

1 h. Observations were made under a stereoscopic microscope to record the relative abundance of zoospores in relation to that of the control.

#### **Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici* and *Saccharicola* sp-*R. solani***

To know if the *Saccharicola* sp antagonist infects *P. capsici* and *R. solani* mycelia, microcultures were prepared following the technique described by Riddell (1950) with slight modifications. The experiment consisted of five treatments, and observations were made to four replications every 24 h during 15 days with a total of 60 Petri dishes for each treatment. The evaluated treatments were: 1) Antagonist-*P. capsici* (A-Pc); 2) Antagonist-*R. solani* (A-Rs); 3) antagonist control; 4) Pc control; and 5) Rs control.

Five mm cylinders containing the antagonist mycelium were sown in Petri dishes with IPAA at 1 cm from the periphery. A previously sterilized 18 x 18 mm cover slip was taken with a sterile tweezer and placed in the middle of each dish. After 72 and 96 h, a 5 mm cylinder containing Pc or Rs mycelium was placed at a distance of 1 cm. In all cases, the dishes were kept in darkness at  $27\pm 1$  °C. The same procedure was used for the controls. Every 24 h during 15 days observations were made to cover slips in four replications of each treatment; when mycelium of both microorganisms was found in the middle of the cover slip, it was removed from the culture medium using a sterile razor. A drop of cotton blue was added to the cover slip and observed under a 100 X Olympus® model CX31 compound microscope.

**Scanning electron microscopy (MEB):** The analyzed samples were taken from the interaction areas of confrontation between the antagonist and the pathogen (*P. capsici*) in IPAA medium. The

una vez que los micelios de ambos microorganismos se encontraron en la parte media del cubreobjetos, éste se retiró del medio de cultivo con una navaja estéril, se colocó en un portaobjetos en una gota de azul de algodón y se observó a 100 X en microscopio compuesto Olympus®mod. CX31.

**Microscopía electrónica de barrido (MEB):** Las muestras analizadas se tomaron de la zona de interacción de las confrontaciones entre el antagonista y patógeno (*P. capsici*) en medio IPAA. Las muestras se analizaron en la Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic®, Xalapa, Veracruz, México.

**Pruebas de antagonismo en invernadero:** Se estableció un ensayo en los meses de noviembre de 2015 a enero de 2016 en suelo proveniente de campo colectado de una parcela naturalmente infestada con *P. capsici*. Una parte se esterilizó (SE) en autoclave a 65 °C y 20 lb de presión en dos ocasiones, cada una durante 2 h y se ventiló durante 7 días. Otra parte del suelo permaneció sin esterilizar (SN). Se probaron 11 tratamientos bajo un diseño de bloques al azar con 10 macetas (cada una con una planta de chile jalapeño variedad “M”) cada uno.

Los tratamientos fueron: 1) Testigo (SE-T), 2) SE-*F. oxysporum* (SE-Fo), 3) SE-*P. capsici* (SE-Pc), 4) SE-*R. solani* (SE-Rs), 5) SE-Antagonista (SE-A), 6) SE-Antagonista-*F. oxysporum* (SE-A-Fo), 7) SE-Antagonista-*P. capsici* (SE-A-Pc), 8) SE-Antagonista-*R. solani* (SE-A-Rs), 9) SE-Antagonista-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SE-A-Fo-Pc-Rs), 10) SN-Antagonista-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-A-Fo-Pc-Rs) y 11) SN-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-Fo-Pc-Rs). Como referencia de la patogenicidad de la cepa de *P. capsici* utilizada se establecieron también plantas testigo de chile de la variedad “Yollow wonder”, catalogado como

samples were analyzed at the Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic®, Xalapa, Veracruz, Mexico.

**Antagonism tests in greenhouse:** A trial was established from November 2015 to January 2016 using soil coming from the field and collected in a plot naturally infested with *P. capsici*. One portion of the soil was sterilized (SE) twice (2 h each) in an autoclave at 65 °C and 20 lb pressure, and then ventilated during 7 days. The other portion was not sterilized (SN). Eleven treatments were tested using a random blocks design with 10 pots (a jalapeño pepper plant of the “M” variety in each pot filled with 500 g of soil).

The treatments used were: 1) Control (SE-T), 2) SE-*F. oxysporum* (SE-Fo), 3) SE-*P. capsici* (SE-Pc), 4) SE-*R. solani* (SE-Rs), 5) SE-Antagonist (SE-A), 6) SE-Antagonist-*F. oxysporum* (SE-A-Fo), 7) SE-Antagonist-*P. capsici* (SE-A-Pc), 8) SE-Antagonist-*R. solani* (SE-A-Rs), 9) SE-Antagonist-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SE-A-Fo-Pc-Rs), 10) SN-Antagonist-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-A-Fo-Pc-Rs), and 11) SN-*F. oxysporum-P. capsici-R. solani* (SN-Fo-Pc-Rs). As reference of the pathogenicity of the *P. capsici* isolate used, chili plants of the highly susceptible variety “Yollow wonder” were also inoculated. The trial was repeated one more time.

### Seed germination

Seeds of the jalapeño pepper M variety were disinfected with 2 % commercial sodium hypochlorite for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Seeds from the treatments including the antagonist were introduced in a 1X10<sup>8</sup> colony-forming unit (ufc) of *Saccharicola* sp suspension; the other treatments were kept in

altamente susceptible al oomiceto. El ensayo se realizó en macetas de polietileno conteniendo 500 g de suelo. El ensayo se repitió una vez más.

### Germinación de semillas

Semillas de chile jalapeño variedad "M" se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 2 % por 3 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas de los tratamientos que involucraron al antagonista se introdujeron durante 24 h en una suspensión de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (ufc) de *Saccharicola* sp, las de los demás tratamientos se mantuvieron en agua de la llave estéril. Las semillas se colocaron en sanitas estériles y se pusieron a germinar en oscuridad a  $27 \pm 1$  °C durante 11 días.

Las plántulas se transfirieron a charolas de poliestireno conteniendo una mezcla de Peat Mos y Agrolita (2:1) previamente esterilizada. A las plántulas correspondientes a los tratamientos con el antagonista se les aplicó una suspensión de  $1 \times 10^8$  ufc (10 ml/plántula) inmediatamente después de transferirlas a las charolas. Las charolas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 14 h luz y 10 oscuridad a  $25 \pm 1$  °C hasta que las plántulas desarrollaron el primer par de hojas verdaderas.

### Preparación del inóculo del antagonista y patógenos e inoculación

El inóculo del antagonista y de *R. solani* se preparó en frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo Infusión Papa Azúcar (IPA). Los frascos se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 min. Cinco cilindros de 5 mm de diámetro del antagonista o de *R. solani* se transfirieron asépticamente en los frascos y se mantuvieron por 10 días en una incubadora con agitación Lab-Line® a 110 revoluciones

sterile running water. The seeds were placed in sterile paper towels (sanitas) and left to germinate in darkness at  $27 \pm 1$  °C for 11 days.

Seedlings were transferred to polystyrene trays containing a previously sterilized mixture of Peat Mos and Agrolita (2:1). To the seedlings from the treatments including the antagonist a  $1 \times 10^8$  ufc suspension (10 ml/seedling) was added immediately after being transferred to the trays. The trays were kept in a growth room with photoperiods of 14 h light and 10 h in darkness at  $25 \pm 1$  °C until seedlings developed the first pair of true leaves.

### Preparing antagonist and pathogen inoculum, and inoculation.

Inoculum of the antagonist and of *R. solani* was prepared in 500 ml Erlenmeyer flasks containing potato-sugar infusion (IPA). The flasks were sterilized in autoclave at 120 °C for 15 min. Five cylinders 5 mm in diameter containing the antagonist or *R. solani* were aseptically transferred to the flasks and incubated for 10 days in a Lab-Line® shaking incubator at 110 revolutions per minute (rpm); mycelium was removed from the flasks and grinded in a blender.

From Petri dishes containing *F. oxysporum* or *P. capsici* mycelium, cylinders 5 mm in diameter were taken and sown in IPAA and in V8 juice agar (V<sub>8</sub>A), respectively; then, they were incubated in darkness at  $27 \pm 1$  °C. Seven days later, 10 ml of 0.9 % (Pisa®) sodium chloride isotonic solution were added to the Petri dishes containing *P. capsici*. Later, the solution was removed, and, using a dissection needle, the medium was divided in six fragments. Each fragment was transferred to a Petri dish containing 10 ml of sterile running water.

The dishes were kept under light for 48 h at 26 °C and 48 h in darkness at 28 h °C. After this period, they were placed at 4 °C for 20 min and

por minuto (rpm), se retiró el micelio de los frascos y se molió por separado en una licuadora.

De cajas Petri con micelio de *F. oxysporum* o *P. capsici*, se tomaron cilindros de 5 mm de diámetro y se sembraron en IPAA y en jugo V8 agar (V<sub>8</sub>A), respectivamente, enseguida se incubaron en oscuridad a 27±1 °C. Después de 7 días, sobre las cajas con *P. capsici* se vertieron 10 ml de solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9 % (Pisa®) enseguida se retiró la solución y con una aguja de disección se dividió el medio en seis fragmentos. Cada fragmento se transfirió a una caja Petri conteniendo 10 ml de agua de la llave estéril.

Las cajas se mantuvieron durante 48 h en luz a 26 °C y 48 en oscuridad a 28 h °C. Transcurrido este tiempo, se colocaron a 4 °C durante 20 min y después a 27±1 °C durante 1 h para inducir la liberación de zoosporas. El número de propágulos del antagonista y patógenos se cuantificó en un hematocitómetro y se ajustó la densidad de inóculo a 1X10<sup>8</sup> para el antagonista, 1X10<sup>7</sup> ufc para *F. oxysporum* y *P. capsici*; para *R. solani* se aplicó 1 g de micelio molido previamente. La inoculación del antagonista se realizó a las semillas, al momento de pasar las plántulas a charolas y dos aplicaciones de 10 ml a 3 y 1 día antes de transferir las plantas a las macetas e inmediatamente después de transplantarlas a las macetas. La inoculación de los patógenos se realizó 3 días después de haber inoculado al antagonista. Todas las aplicaciones se realizaron a la base del tallo.

### VARIABLES EVALUADAS

Se registró la incidencia (%) de plantas con síntomas de la enfermedad y la severidad (nivel de daño), la altura de la planta, el diámetro de la base del tallo y el peso seco de raíz y follaje. Diariamente se realizaron observaciones para registrar las dos primeras variables. La severidad de *P. capsici* se

then at 27±1 °C for 1 h to induce zoospore release. The number of antagonist and pathogen propagules was counted in a hemocytometer and adjusted to the inoculum density at 1X10<sup>8</sup> for the antagonist, and at 1X10<sup>7</sup> ufc for *F. oxysporum* and *P. capsici*; for *R. solani*, 1 g of previously grinded mycelium was added. The antagonist inoculation was made in seeds, when the seedlings were transferred to trays, plus two 10 ml applications three days later, one day before transferring the plants to pots, and immediately after transplanting them to pots. The pathogen inoculation was made three days after the antagonist was inoculated. All of them were applied at the base of the stem.

### Evaluated variables

Records were taken of the incidence (%) of plants showing disease symptoms and severity (damage level), plant height, diameter of the base of the stem, as well as root and canopy dry weight. Observations were made every day to record the first two variables. *P. capsici* severity was evaluated using the scale proposed by Morán-Bañuelos *et al.* (2010); *F. oxysporum*, using the scale proposed by Marlatt *et al.* (1996), and *R. solani* severity, using the scale proposed by Navarrete-Maya *et al.* (2009). When the experiment ended (3 months after transplanting), the height of the plants and the diameter of the base of the stem were measured. Roots were cut at the base of the stem. Both canopy and roots were placed in Kraft paper and dried at 60° C on a stove (Felisa®) during 4 days. Five plants from each treatment were randomly taken to record their dry weight.

**Statistical analysis:** Data from the evaluated variables in all the trials were used to perform normal distribution (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov) and variance homogeneity (Bartlett)

evaluó con la escala propuesta por Morán-Bañuelos *et al.* (2010), de *F. oxysporum* con la escala de Marlatt *et al.* (1996) y la severidad de *R. solani* con la escala propuesta por Navarrete-Maya *et al.* (2009). Al final del experimento (3 meses después del transplante), se midió la altura de la planta y el diámetro de la base del tallo. Las raíces se cortaron en la base del tallo. Tanto la parte del follaje como de la raíz se colocaron en bolsas de papel Kraft y secaron a 60 °C en una estufa (Felisa®) durante 4 días. Cinco plantas de cada tratamiento se tomaron al azar para el registro de peso seco.

**Análisis estadístico:** Los datos de las variables evaluadas en todos los ensayos se sometieron a la prueba de distribución normal (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Para los datos obtenidos en el ensayo de invernadero fue necesario llevar a cabo una transformación logarítmica. Con los datos de cada variable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), utilizando el paquete SAS versión 9.0. El análisis se realizó con los datos de los dos experimentos.

## RESULTADOS

**Pruebas de antagonismo *in vitro*:** En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp causó una reducción significativa de 44.8 % y 45.1 % en el crecimiento micelial de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc), mientras que para *R. solani* la reducción fue de 36.2 % a los 2 dpc (Cuadro 1). A los 21 dpc el antagonista creció sobre la colonia de *P. capsici* y a los 30 dpc sobre la colonia de *F. oxysporum*. En *R. solani* el crecimiento de ambos llegó a la parte media de la caja a los 30 dpc y ahí se mantuvo. A pesar de que el antagonista no invadió al patógeno, fue evidente la ausencia de

tests. For data obtained from the greenhouse trial we had to use a logarithmic transformation. Variance analysis (ANOVA) and means comparison (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) were performed using the SAS version 9.0 software. The analysis was performed with data from the two experiments.

## RESULTS

**Antagonism tests *in vitro*:** Under *in vitro* conditions, *Saccharicola* sp showed a significant reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelial growth 3 days after confrontation (dpc); *R. solani* showed a reduction of 36.2 % at 2 dpc (Table 1). At 21 dpc, the antagonist grew on the *P. capsici* colony, and at 30 dpc, on the *F. oxysporum* colony. On *R. solani*, the growth of both reached the middle of the dish at 30 dpc and stayed there. Although the antagonist did not invade the pathogen, the absence of microsclerotia was evident on the *R. solani* colony on the side of the cylinder containing the pathogen, but they developed in both cylinders containing the control (Figure 1).

*Saccharicola* sp reduced the mycelial growth of *F. oxysporum* and *P. capsici* 72 h after confrontation (hpc) compared with their corresponding controls, which showed greater growth; growth reduction of *R. solani* was recorded starting at 24 hpc (Figure 2). Three days after sowing (dds), mycelial growth was observed in the cylinders containing mycelium, which were taken from the side of the pathogens invaded by the antagonist (Table 1) (Figure 3). In the cylinders containing the antagonist-*F. oxysporum* treatment, taken from the side of the pathogen, a lower number of micronidia was observed compared with those of the control (Table 2). In the antagonist-*R. solani* treatment microsclerotia were observed. We observed

**Cuadro 1. Efecto de *Saccharicola* sp (A) sobre el crecimiento micelial de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) y sobre la producción de esporangios y zoosporas en *P. capsici*.****Table 1. Effect of *Saccharicola* sp (A) on *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) mycelial growth, and on *P. capsici* sporangia and zoospore production.**

| Tratamiento | Crecimiento en cm a los 2 <sup>e</sup> y 3 <sup>e</sup> dpc | % de reducción del crecimiento a los 2 <sup>e</sup> y 3 <sup>e</sup> dpc | Formación de esporangios a los 21 ddi  |                                   | Liberación de zoosporas a los 21 ddi | Viabilidad del micelio del patógeno |
|-------------|---|--|--|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
|             |   |  | Cilindro del lado de <i>P. capsici</i> | Cilindro del lado del antagonista |                                      |                                     |
| Pc-Pc       | 2.5(±0.11) <sup>e</sup>                                     |  | +                                      |                                   | +                                    |                                     |
| A-Pc        | 1.4(± 1.37) <sup>e</sup>                                    | 44.8 a   | ++                                     | -                                 | ++                                   | SI                                  |
| Fo-Fo       | 2.6(±0.08) <sup>e</sup>                                     |  |  |                                   |                                      |                                     |
| A-Fo        | 1.4(±1.32) <sup>e</sup>                                     | 45.1 a   |  |                                   |                                      | SI                                  |
| Rs-Rs       | 3.1(±0.42) <sup>e</sup>                                     |  |  |                                   |                                      |                                     |
| A-Rs        | 1.9(±0.77) <sup>e</sup>                                     | 36.2 b   |  |                                   |                                      | SI                                  |

dpc= días posteriores a la confrontación; ddi=días después de la invasión del patógeno por el antagonista; Pc-Pc= Testigo *P. capsici*; A-Pc= *Saccharicola* sp-*P. capsici*; Fo-Fo= Testigo *F. oxysporum*; A-Fo= *Saccharicola* sp-*F. oxysporum*; Rs-Rs= Testigo *R. solani*; A-Rs= *Saccharicola* sp-*R. solani*. (-), (+) y (++) denotan la ausencia y presencia escasa y regular de esporangios y zoosporas, respectivamente. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / dpc= days after confrontation, ddi=days after the pathogen was invaded by the antagonist; Pc-Pc= *P. capsici* control; A-Pc= *Saccharicola* sp-*P. capsici*; Fo-Fo= *F. oxysporum* control; A-Fo= *Saccharicola* sp-*F. oxysporum*; Rs-Rs= *R. solani* control; A-Rs= *Saccharicola* sp-*R. solani*. (-), (+) and (++) denote absence and limited and regular presence of sporangia and zoospores, respectively. Values with the same letter are not significantly different according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

microesclerocios en la colonia de *R. solani* del lado del cilindro del patógeno, mientras que en ambos cilindros del testigo se desarrollaron (Figura 1).

*Saccharicola* sp causó reducción de crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *P. capsici* a las 72 h posteriores a la confrontación (hpc), en comparación con sus respectivos testigos que presentaron mayor crecimiento, mientras que con *R. solani* la reducción de crecimiento se registró desde las 24 hpc (Figura 2). A los 3 días después de sembrar (dds) los cilindros con micelio tomados del lado de los patógenos invadidos por el antagonista, se observó el crecimiento del micelio (Cuadro 1) (Figura 3). En los cilindros del tratamiento antagonista-*F. oxysporum* tomados del lado del patógeno se registró menor cantidad de microconidios en comparación con los del testigo (Cuadro 2). En el tratamiento antagonista-*R. solani* se observaron microesclerocios. Solo en los cilindros tomados del tratamiento antagonista-*P. capsici* se observó el crecimiento del

antagonist growth on *P. capsici* mycelium at 5 dds only in the cylinders taken from the antagonist-*P. capsici* treatment (Figure 3); in the cylinders from the same treatment placed in water, higher zoospore release was observed compared with that of the control cylinders (Table 2).

#### **Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici* and *Saccharicola* sp-*R. solani*.**

Under *in vitro* conditions, interaction between *Saccharicola* sp and *P. capsici* was observed 24 h after mycelia of both microorganisms came into contact, and the attachment phenomenon was observed (Figure 4). At 48 h, formation of *Saccharicola* sp pseudoparenchymal cells was observed on *P. capsici* hyphae, and at 72 h, growth around *P. capsici* hyphae (winding) (Figure 4). At 96 h, formation of *P. capsici* sporangia was observed, but in the controls sporangia appeared

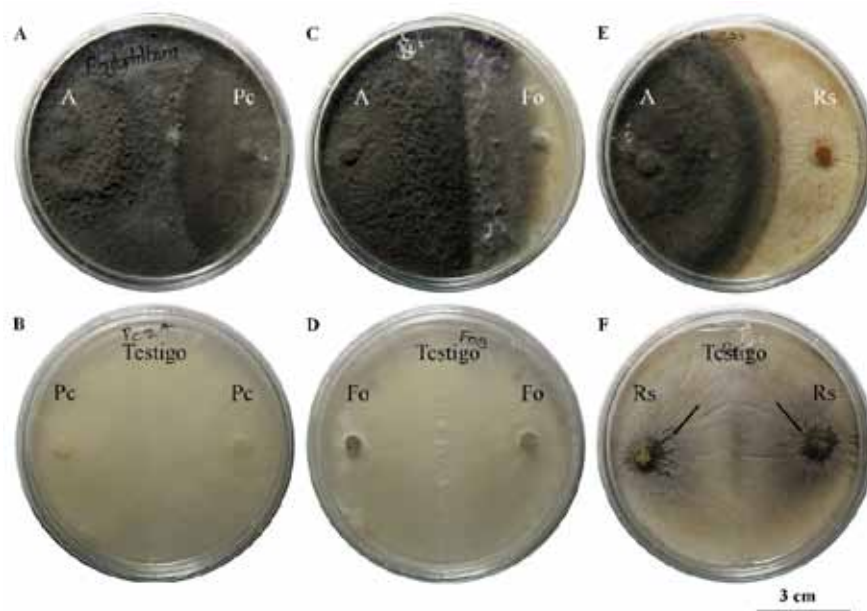


Figura 1. Antagonismo de *Saccharicola sp* (A) contra *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs) a los 21 y 30 días posteriores a la confrontación (dpc). A) A-Pc, B) Testigo Pc a los 21 dpc, C) A-Fo, D) testigo Fo, E) A-Rs y F) testigo Rs a los 30 dpc con desarrollo de microesclerocios.

Figure 1. *Saccharicola sp* (A) antagonism against *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) at 21 and 30 days after confrontation (dpc). A) A-Pc, B) Pc control at 21 dpc, C) A-Fo, D) Fo control, E) A-Rs and F) Rs control at 30 dpc showing microsclerotia development.

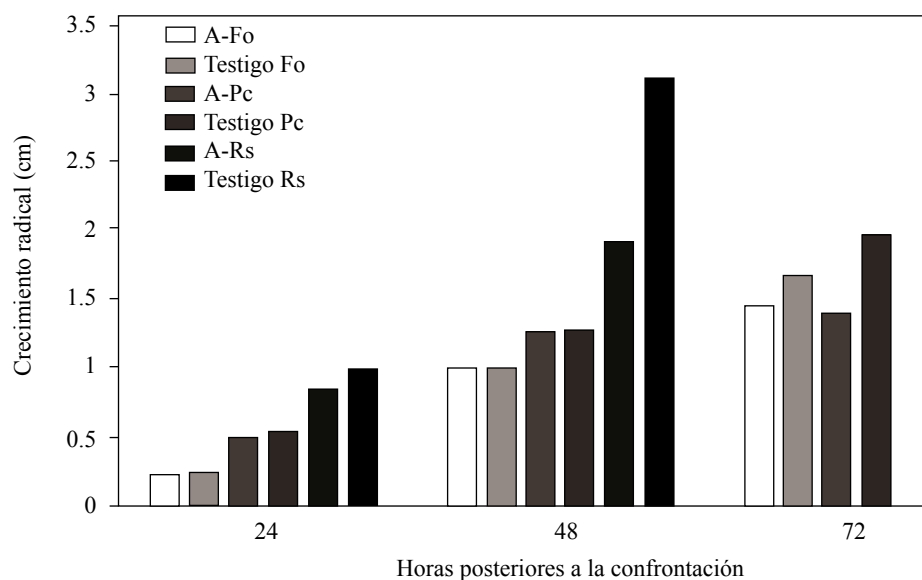


Figura 2. Crecimiento de *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) y *R. solani* (Rs) a las 24, 48 y 72 h posteriores a la confrontación con *Saccharicola sp*.

Figure 2. *F. oxysporum* (Fo), *P. capsici* (Pc) and *R. solani* (Rs) growth at a 24, 48 and 72 h after confrontation with *Saccharicola sp*.





Figura 3. Viabilidad del micelio de *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) y *R. solani* (Rs), a partir de cilindros de micelio del lado del patógeno invadido por el antagonista. A) crecimiento de Pc y antagonista 5 días después de la siembra (dds) del cilindro, B) crecimiento de Fo sin presencia del antagonista y C) crecimiento de Rs con presencia de microesclerocios y sin presencia del antagonista.

Figure 3. Viability of *P. capsici* (Pc), *F. oxysporum* (Fo) and *R. solani* (Rs) from cylinders containing mycelium taken from the side of the pathogen invaded by the antagonist. A) Pc and antagonist growth 5 days after cylinder sowing (dds), B) Fo growth without the antagonist, and C) Rs growth with the presence of microsclerotia and without the presence of the antagonist.

antagonista sobre el micelio de *P. capsici* a los 5 dds (Figura 3) y en los provenientes del mismo tratamiento colocados en agua, se registró una mayor liberación de zoosporas en comparación con los cilindros testigos (Cuadro 2).

until day 5. At day 7, *P. capsici* hyphae showed vacuoles, cytoplasm granulation, deformation, and appeared to be empty (Figure 4).

In *R. solani*, starting 24 h after mycelia of both microorganisms came into contact, sinking

Cuadro 2. Efecto de *Saccharicola* sp (A) sobre la producción de propágulos (esporangios y zoosporas) de *P. capsici*, *F. oxysporum* (microconidios) y *R. solani* (microesclerocios).

Table 2. Effect of *Saccharicola* sp (A) on *P. capsici* propagule production (sporangia and zoospore), *F. oxysporum* (microconidia) and *R. solani* (microsclerotia).

| Tratamiento | Producción de propágulos (esporangios y microesclerocios) | Cantidad de zoosporas liberadas y microconidios/ml a los 21 <sup>e</sup> y 30 <sup>e</sup> dpc |
|-------------|---|--|
| Pc-Pc       | +   | 4,000 <sup>e</sup>   |
| A-Pc        | ++  | 9,000 <sup>e</sup>   |
| Fo-Fo       |   | 1, 730,500 <sup>e</sup>  |
| A-Fo        |   | 472, 750 <sup>e</sup>  |
| Rs-Rs       | ++  |  |
| A-Rs        | -   |  |

dpc= días posteriores a la confrontación; Pc-Pc= Testigo *P. capsici*; A-Pc= antagonista-*P. capsici*; Fo-Fo= Testigo *F. oxysporum*; A-Fo= antagonista-*F. oxysporum*; Rs-Rs= Testigo *R. solani*; A-Rs= antagonista-*R. solani*; abundancia relativa de propágulos (-) nula, (+) baja y (++) regular / dpc= days after confrontation; Pc-Pc= *P. capsici* control; A-Pc= antagonist-*P. capsici*; Fo-Fo= *F. oxysporum* control; A-Fo= antagonist-*F. oxysporum*; Rs-Rs= *R. solani* control; A-Rs= antagonist-*R. solani*; relative abundance of propagules (-) none, (+) scarce and (++) regular.

### Interacción micelial de *Saccharicola* sp-*P. capsici* y *Saccharicola* sp-*R. solani*

En condiciones *in vitro* la interacción de *Saccharicola* sp y *P. capsici* se observó a las 24 h posteriores al momento en que los micelios de ambos microorganismos se encontraron, se presentó el fenómeno de adosamiento (Figura 4). A las 48 h fue evidente la formación de células pseudoparenquimatosas de *Saccharicola* sp sobre las hifas de *P. capsici* y a las 72 h el crecimiento alrededor de las hifas de *P. capsici* (enrollamiento) (Figura 4). A las 96 h se observó la formación de esporangios de *P. capsici*, mientras que en el testigo éstos se evidenciaron hasta el 5° día. Al 7° día las hifas de *P. capsici* mostraron vacuolas, granulaciones en el citoplasma, deformación y con apariencia de estar vacías (Figura 4).

was observed in *R. solani* hyphae at the points of contact with *Saccharicola* sp (Figure 5); at those points we also observed the formation of small structures on *Saccharicola* sp. hyphae. At 96 h, at the points of contact with *Saccharicola* sp, *R. solani* hyphae showed deformation, and the mycelium, less intense coloration (Figure 5). At the points of interaction between the antagonist hyphae and the pathogens, we observed that the antagonist hyphae were smaller in diameter, which suggests that young mycelium is the one that comes into contact with the pathogen hyphae.

### Scanning electron microscopy (MEB)

In the interaction *Saccharicola* sp-*P. capsici*, winding of the antagonist hyphae around *P. capsici* mycelium was observed (Figura 6), as well as

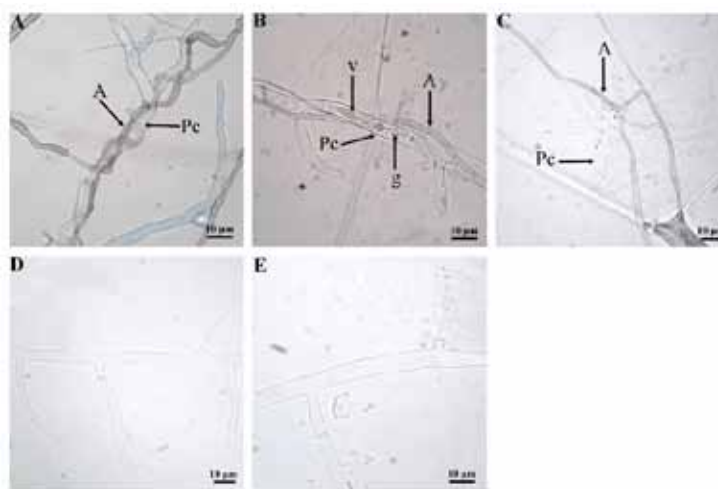


Figura 4. Interacción micelial entre *Saccharicola* sp-*P. capsici*. A) Enrollamiento de *Saccharicola* sp en la hifa de Pc a las 72 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem), B) hifas con vacualización (v) y granulaciones en el citoplasma, C) hifas deformes y con apariencia de estar vacías al 7° día posterior al encuentro del micelio de ambos microorganismos, D) y E) *P. capsici* testigo a las 72 y 7° día respectivamente.

Figure 4. Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*P. capsici*. A) *Saccharicola* sp winding around Pc hyphae 72 h after mycelia of both organisms came into contact (hpem), B) hyphae showing vacuoles (v) and cytoplasm granulation, C) deformed hyphae and seeming to be empty 7 days after mycelium of both microorganisms came into contact, D and E) *P. capsici* control at 72 h and 7 days after, respectively.

En *R. solani* desde las 24 h posteriores al encuentro de los micelios de ambos microorganismos se observaron hundimientos en las hifas de *R. solani* en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp (Figura 5) y en estos puntos también fue evidente la formación de pequeñas estructuras en las hifas de *Saccharicola* sp. A las 96 h en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp las hifas de *R. solani* presentaban deformación y el micelio mostraba una coloración menos intensa (Figura 5). En los sitios de interacción entre las hifas del antagonista con los patógenos fue evidente que las hifas del antagonista eran de menor diámetro, lo cual sugiere que el micelio joven es el que establece el contacto con las hifas de los patógenos,

#### Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la interacción *Saccharicola* sp-*P. capsici* se observó el enrollamiento de las hifas del antagonista alrededor del micelio de *P. capsici* (Figura 6), así como también la formación de estructuras de anclaje sobre el mismo fitopatogeno.

#### Antagonismo de *Saccharicola* sp en invernadero

En condiciones de invernadero *P. capsici* y *F. oxysporum* fueron patógenos al chile, el primero ocasionó 100 % de incidencia y el 50 % de mortalidad en plantas enfermas. Con *F. oxysporum* se registró un 75 % de incidencia y 50 % de plantas muertas, mientras que *R. solani* no fue patógeno al chile. Cuando se inoculó el antagonista en conjunto con los tres patógenos tanto en suelo estéril como en suelo naturalmente infestado hubo 100 % de incidencia en las plantas de chile. El antagonista no tuvo un efecto favorable en las variables diámetro de la base del tallo, altura y peso seco del follaje y raíz; claramente la aplicación de *Saccharicola* sp no protegió a las plantas de chile del ataque

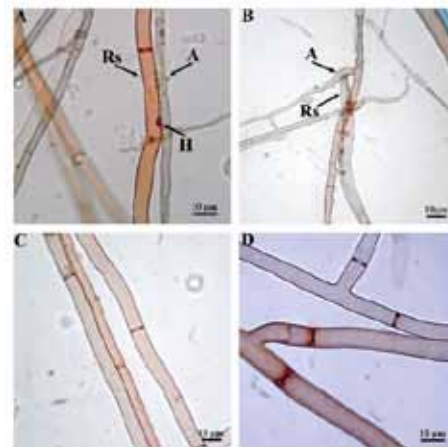


Figura 5. Interacción micelial entre *Saccharicola* sp-*R. solani* (A-Rs). A) Hundimientos (h) en la hifa de Rs formados en los sitios de contacto con el micelio de *Saccharicola* sp a las 24 h posteriores al encuentro del micelio de ambos microorganismos (hpem). B) Hifa de Rs deforme y de coloración menos intensa a las 96 hpem.

Figure 5. Mycelial interaction between *Saccharicola* sp-*R. solani* (A-Rs). A) Rs hyphae (h) sinking at the points of contact with *Saccharicola* sp mycelium 24 h after the mycelium of both organisms came into contact (hpem). B) Rs hypha deformed and with less intense coloration at 96 hpem.

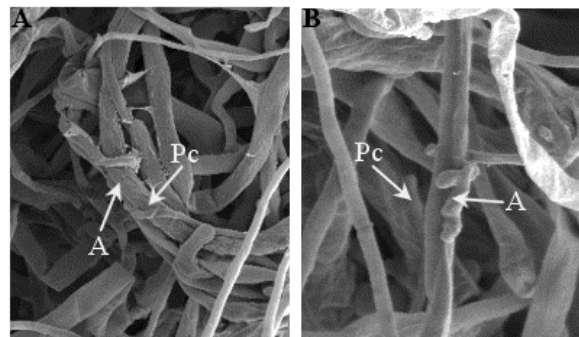


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido. A) Enrollamiento de *Saccharicola* sp en la hifa de Pc; B) Estructura de anclaje de *Saccharicola* sp sobre Pc.

Figure 6. Scanning electron microscopy. A) *Saccharicola* sp winding around Pc hyphae; B) *Saccharicola* sp anchoring structure on Pc.

por fitopatógenos, ni mejoró el desarrollo de las plantas.

## DISCUSIÓN

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp causó reducción significativa de 44.8 % y 45.1 % en el crecimiento micelial de *P. capsici* y *F. oxysporum* a los 3 días posteriores a la confrontación (dpc), mientras que para *R. solani* la reducción fue de 36.2 % a los 2 dpc (Cuadro 1). Chapla *et al.* (2012), también consignaron un efecto similar de *Saccharicola* sp contra *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* y *Microbotryum violaceum*. El hecho de que el micelio de *Saccharicola* sp haya entrado en contacto con el de los patógenos a los 3 y 2 dpc sugiere que existe agresividad por parte del antagonista y susceptibilidad en el fitopatógeno (Benhamou y Chet, 1993).

En cuanto a la reducción del crecimiento micelial de los fitopatógenos Dennis y Webster (1971) mencionan que la producción de antibióticos por agentes de control biológico, podrían inhibir la tasa de crecimiento del fitopatógeno durante una intensa competencia por nutrientes. Así, la capacidad de *Saccharicola* sp de crecer sobre el micelio de *P. capsici* y *F. oxysporum*, podría deberse a que compiten por los nutrientes del medio de cultivo y a una parasitosis en la que participa la producción de enzimas como: celulasas, xilanasas, amilasas y pectinasas (Paganini-Marques, 2013).

En la interacción *R. solani*-*Saccharicola* sp no se observó inhibición, ni formación de estructura de anclaje del antagonista sobre patógeno, a los 30 dpc; sin embargo, *R. solani* no produjo microesclerocios (Figura 3). Dennis y Webster (1971) indican que los antibióticos producidos por algunos agentes de control biológico tienen efectos inhibitorios, que varían dependiendo del hongo fitopatógeno.

formation of anchored structures on the same phytopathogen.

## *Saccharicola* sp antagonist activity in the greenhouse

Under greenhouse conditions, *P. capsici* and *F. oxysporum* were pathogenic to chili pepper. The first caused 100 % disease incidence and 50 % mortality in infected plants. In *F. oxysporum*, 75 % incidence was recorded and 50 % dead plants; *R. solani* was not pathogenic to chili pepper. When the antagonist was inoculated along with the three pathogens, both in sterile soil and naturally infested soil, there was 100 % incidence in the chili pepper plants. The antagonist had no favorable effect on the diameter of the base of the stem, height or canopy and root dry weight. It was obvious that the application of *Saccharicola* sp did not protect the chili pepper plants from phytopathogens attack nor improved the plant development.

## DISCUSSION

Under *in vitro* conditions, *Saccharicola* sp caused a significant reduction of 44.8 % and 45.1 % in *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelial growth 3 days after confrontation (dpc), but the reduction in *R. solani* was of 36.2 % at 2 dpc (Table 1). Chapla *et al.* (2012) also referred a similar effect for *Saccharicola* sp against *Fusarium* spp, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum* and *Microbotryum violaceum*. The fact that *Saccharicola* sp mycelium come into contact with the pathogens mycelium at 3 and 2 dpc suggests that there is antagonist aggressiveness and pathogen susceptibility (Benhamou and Chet, 1993).

Regarding phytopathogens mycelial growth, Dennis and Webster (1971) mentioned that the

*Saccharicola* sp se ha encontrado como endófito en algunas plantas. Un aislamiento endófito aislado de caña de azúcar produjo metabolitos secundarios conocidos como poliketidos (Rojas *et al.*, 2011); en otro aislamiento obtenido de *Eugenia jambolana* se detectaron metabolitos bioactivos con capacidad antifúngica (Chapla *et al.*, 2012; Honório, 2013; Borges, 2016). Posiblemente el efecto generado por *Saccharicola* sp en *R. solani* se deba a su capacidad de producir dichos metabolitos y que estén ejerciendo una acción inhibitoria en la formación de microesclerocios. Este efecto es importante para el control biológico, ya que muchos hongos forman estructuras de resistencia que les permite sobrevivir bajo condiciones adversas del ambiente hasta por más de 20 años (Higuera-Moros *et al.*, 2003).

En la presente investigación el antagonista afectó la producción de propágulos del hongo fitopatógeno, en *P. capsici* la estimuló mientras que en *F. oxysporum* la redujo. El mayor número de esporangios y mayor liberación de zoosporas por *P. capsici* expuesto al antagonista *Saccharicola* sp (Cuadro 2), es un fenómeno que ha sido consignado por otros investigadores; por ejemplo, Sid-Ahmed *et al.* (1999) observaron la producción de esporangios de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma harzianum*. Estos autores indican que la estimulación en la producción de esporangios está asociado a la inhibición del crecimiento vegetativo de *P. capsici* como resultado de la acción antagonista (Brasier, 1975; Sid-Ahmed *et al.*, 1999) y del desarrollo de mecanismo de defensa del patógeno (Dennis y Webster, 1971; Elad *et al.*, 1999).

El adosamiento observado en este estudio es un indicativo de afinidad de la composición química de las paredes hifales de los micelios de ambos microorganismos y se le considera como el inicio del micoparasitismo (Pérez-Moreno, 1992). El enrollamiento de las hifas de *Saccharicola* sp alrededor de *P. capsici* se interpreta como una expresión de parasitismo (Benítez *et al.*, 2004).

production of antibiotics by biological control agents may inhibit the phytopathogen growth rate during an intense competition for nutrients. Thus, *Saccharicola* sp capacity to grow on *P. capsici* and *F. oxysporum* mycelium may result from the competition for nutrients in the culture medium and parasitosis that involves enzyme production (cellulases, xylanases, amylases and pectinases) (Paganini-Marques, 2013).

In the interaction *R. solani*- *Saccharicola* sp no inhibition or anchoring structures formation on the pathogen at 30 dpc was observed. However, *R. solani* did not develop microsclerotia (Figure 3). Dennis and Webster (1971) stated that antibiotics produced by some biological agents have inhibitory effects that may vary depending on the phytopathogen fungus.

*Saccharicola* sp has been found as endophyte in some plants. An endophyte isolate obtained from sugarcane produced secondary metabolites known as polyketides (Rojas *et al.*, 2011); in another isolate obtained from *Eugenia jambolana* bioactive metabolites with antifungal activity were detected (Chapla *et al.*, 2012; Honório, 2013; Borges, 2016). It is possible that the effect produced by *Saccharicola* sp in *R. solani* may have resulted from its capacity to produce such metabolites and that they have inhibitory action on microsclerotia formation. This effect is important to biological control, since many fungi form resistance propagules that allow them survive under environmental harsh conditions even more than 20 years (Higuera-Moros *et al.*, 2003).

In this study, the antagonist affected the capacity of the phythopathogen to produce fungus propagules: in *P. capsici* it was stimulated, but in *F. oxysporum* it was reduced. The greater number of sporangia and higher release of *P. capsici* zoospore when exposed to the *Saccharicola* sp antagonist (Table 2) is a phenomenon that has been reported by other researchers. For example, Sid-Ahmed

En este trabajo se observó el enrollamiento de la hifa del antagonista sobre *P. capsici*, dicho efecto se constató con microscopía electrónica de barrido, que reveló la formación de estructuras de anclaje, vacuolización, granulaciones en el citoplasma y deformación de las hifas de *P. capsici*, con apariencia de estar vacías (Figura 4), lo cual posiblemente se deba a la capacidad de *Saccharicola* sp de producir celulasas (Paganini-Marques, 2013;). Dichas enzimas están involucradas en la desintegración de la celulosa, principal componente de la pared celular (Köhl y Schösser, 1991; Castro-Rocha *et al.*, 2012). Este mismo efecto fue reportado por Sid-Ahmed *et al.* (1999) quienes observaron la vacuolización y desintegración de las hifas de *P. capsici* en presencia de *Trichoderma harzianum*.

En *R. solani* se observaron hundimientos en sus hifas en los sitios de contacto con *Saccharicola* sp en donde también se observó la formación de pequeñas estructuras papiladas emergiendo de las hifas de *Saccharicola* sp. Las hifas de *R. solani* mostraron deformación y una coloración menos intensa (Figura 5), posiblemente por efecto de los metabolitos bioactivos producidos por *Saccharicola* sp (Chapla *et al.* 2012; Honório, 2013; Borges, 2016).

A pesar de que en condiciones *in vitro* hubo reducción del crecimiento micelial de los fitopatógenos y en las pruebas de interacción micelial se observaron principios de micoparasitismo de *Saccharicola* sp sobre las hifas de *P. capsici* y *R. solani*, esta acción no se expresó en invernadero, probablemente debido a la homeostasis del suelo, que dificulta o impide el establecimiento de cualquier especie introducida (Bautista-Calles *et al.*, 2014). Las aplicaciones de antagonistas tendrían más oportunidad de éxito si se aplican frecuentemente durante el ciclo del cultivo; por ello es importante determinar si aplicaciones semanales de *Saccharicola* sp ayudarían a reducir la incidencia y severidad de los fito-

*et al.* (1999) observed the production of *P. capsici* sporangia in the presence of *Trichoderma harzianum*. These authors stated that the stimulation of sporangia production was associated with the inhibition of *P. capsici* vegetative growth as a result of the antagonist action (Brasier, 1975; Sid-Ahmed *et al.*, 1999) and the development of a defense mechanism by the pathogen (Dennis y webster, 1971; Elad *et al.*, 1999).

The attachment observed in this study is an indicator of the chemical composition affinity of mycelia hyphae walls of both microorganisms and it is considered as the beginning of mycoparasitism (Pérez-Moreno, 1992). *Saccharicola* sp hyphae winding around *P. capsici* is interpreted as a parasitism expression (Benítez *et al.*, 2004).

In this study we observed the antagonist hyphae to wind around *P. capsici*. Such effect was proven using scanning electron microscopy, which showed development of anchoring structures and vacuolization, granulation and deformation of *P. capsici* hyphae with appearance to be empty (Figure 4). This effect may have been caused by *Saccharicola* sp capacity to produce cellulases (Paganini-Marques, 2013). Those enzymes are involved in cellulose disintegration, which is the main component of cell walls (Köhl and Schösser, 1991; Castro-Rocha *et al.*, 2012). The same effect was reported by Sid-Ahmed *et al.* (1999), who observed *P. capsici* vacuoles and hyphae disintegration in the presence of *Trichoderma harzianum*.

In *R. solani*, sinking in hyphae was observed at the points of contact with *Saccharicola* sp, where also formation of small papillated structures emerging from *Saccharicola* sp was detected. *R. solani* hyphae showed deformation and less intense coloration (Figure 5), possibly because of the effect of bioactive metabolites produced by *Saccharicola*

patógenos en el cultivo de chile u otro cultivo. Así como también, conocer que metabolitos secundarios ejercen efecto *in vitro* en la reducción micelial de *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*.

## CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* *Saccharicola* sp causó reducción significativa del crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*; sin embargo, en condiciones de invernadero la aplicación de *Saccharicola* sp no protegió a las plantas de chile del ataque por fitopatógenos, ni mejoró el desarrollo de las plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por los recursos económicos otorgados para la realización de la presente investigación, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y a la M.C. Greta Hanako Rosas Saito de la Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic® por el análisis de las muestras.

## LITERATURA CITADA

- Ait-Lahsen H, Soler AM, de la Cruz J, Monte E and Llobell A. 2001. An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67:5833-5839. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.12.5833-5839.2001>
- Almeida T.T., Orlandelli R.C., Azevedo J.L. y Pamphile J.A. 2015. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. Genetics and Molecular Research 14:4920-4931. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.11.25>
- Bautista-Calles J, Huerta-Lara M y García-Espinosa R. 2014. Antagonistas a *Phytophthora capsici* inoculados en sustratos de germinación de *Capsicum annuum* Leonian y *Mucuna deeringiana* Bort. Avances en investigación Agropecuaria 18:95-114. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83731110007>

sp (Chapla *et al.* 2012; Honório, 2013; Borges, 2016).

Although under *in vitro* conditions, the phytopathogens mycelial growth was reduced, and in the mycelial interaction tests we observed the beginning of *Saccharicola* sp parasitism on *P. capsici*, as well as mycoparasitism on *R. solani*, this action was not expressed in the greenhouse, possibly because of soil homeostasis that limits or prevents the establishment of any introduced species (Bautista-Calles *et al.*, 2014). The antagonist applications could be more successful if they are frequently made during the crop cycle. For this reason, it is important to determine if *Saccharicola* sp weekly applications could help reduce phytopathogens incidence and severity in chilli pepper or other crops. It is also important to know which secondary metabolites have *in vitro* effect on *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani* mycelial reduction.

## CONCLUSIONS

Under *in vitro* conditions *Saccharicola* sp significantly reduced *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* mycelial growth. However, under greenhouse conditions, *Saccharicola* sp did not protect the chilli pepper plants from phytopathogen attacks nor improved the plants development.

## ACKNOWLEDGMENTS

To Colegio de Postgraduados for funding this research, to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted, and to M.Sc. Greta Hanako Rosas Saito from the Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Cluster BioMimic® for samples analysis.

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

- Benhamou N and Chet I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-83-1062>
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC and Condón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260. Disponible en línea: [revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/9480/9476](http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/9480/9476)
- Borges MS. 2016. Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). Tesis de Maestría en Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 50-106 pp. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/11449/136385>
- Brasier CM. 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. *New Phytologist* 74:183-194. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb02604.x>
- Castro-Rocha A, Fernández PS y Osuna AP. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225129005.pdf>
- Chapla MV, Somensi A, Cavalheiro JA, Bolzani SV y Araújo AR. 2012. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. 35a Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Química. Brasil. 1p. Disponible en línea: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T1941-1.pdf>
- Dennis C and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 25-39. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536\(71\)80077-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1536(71)80077-3)
- Elad Y, David DR, Levi T, Kapat A, Kirshner B, Gavrin E and Levin A. 1999. *Trichoderma harzianum* T39 mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. 459-467 pp. In: Lyr H, Russell PE, Dehne HW and Sisler HD (eds.). *Modern fungicides and antifungal compounds II*. Intercept Publishers: Andover, England. 505 p. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00417-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00417-3)
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota. 262-268 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x>
- Higuera-Moros A, Fontalvo J, Niño L, Sánchez J, Delgado J, Villalobos R y Montiel M. 2003. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo de harina de semillas de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., frijol chino *Vigna radiata* L. y quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Ciencia* 11:14-21. Disponible en línea: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/view/9144/9133>
- Honório AE. 2013. Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Saccharicola* sp. isolado de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). Tesis de Maestría en Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 39-104 pp. Disponible en línea: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136385>
- Hwang BK and Kim AH. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79:221-227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-79-0221>
- Köhl J and Schösser E. 1991. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and cellulolytic activity of strains of *Trichoderma*. *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology* 23:160-164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-88728-3.50029-9>
- Kwan DH and Schulz F. 2011. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16:6092-6115. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16076092>
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Leme, AC, Bevilacqua MRR, Rhoden SA, Mangolin CA, Machado MFPS and Pamphile JA. 2013. Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. *Genetics and molecular research* 12:4095-4105. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013 September 27.11 September 2013>
- Marlatt ML, Correll JC and Kaufman P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease* 80:1336-1342. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-80-1336>
- Morán-Bañuelos SH, Aguilar-Rincón V, Corona-Torres T y Zavaleta-Mejía E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotécnica México* 33:21-26. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61014255004>
- Navarrete-Maya R, Trejo-Albarrán E, Navarrete-Maya J, Prudencio-Sains JM y Acosta Gallegos JA. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. *Agricultura Técnica en México* 35:455-466. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S0568-25172009000400011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S0568-25172009000400011)
- Paganini-Marques N. 2012. Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 31-86 pp. Disponible en línea: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88017/000721712.pdf?sequence=1>
- Pérez-Moreno J. 1992. Aspectos ecológicos; aislamiento de cepas, síntesis de micorriza y pruebas “in vitro” contra patógenos de diversos hongos ectomicorrizicos del parque nacional Zoquiapan, Edo. de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Edo. de México. 87-90 pp.
- Ramos-Sandoval RU, Gutiérrez-Soto JG, Rodríguez-Guerra R, Salcedo-Martínez SM, Hernández-Luna CE, Luna-Olvera HA, Jiménez-Bremont JF, Fraire-Velázquez S y Almeida-León IH. 2010. Antagonismo de dos ascomicetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:75-86. Disponible en línea: [http://www.redalyc.org/pdf/612/Resumenes/Resumen\\_61218468001\\_1.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/612/Resumenes/Resumen_61218468001_1.pdf)
- Rico-Guerrero L, Medina-Ramos S, Muñoz-Sánchez C, Guevara-Olvera L, Guevara-González R, Guerrero-Aguilar B, Torres-Pacheco I, Rodríguez-Guerra R y González-Chavira M. 2004. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian



- en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Revista mexicana de Fitopatología 22:1-6. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222101.pdf>
- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia 42:265-270. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/3755439>
- Ristaino JB and Johnston SA. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Disease 83:1080-1089. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1080>
- Rojas JD, Durães SL, de Araujo WL, Garcez LMS, Ferreira da SL, Furlan RAR and Padilla G. 2011. The diversity of poliketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. Microbial Ecology 63:565-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9938-0>
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Disponible en línea: <http://www.gob.mx/siap/index> (Consulta, febrero 2016).
- Sid-Ahmed A, Pérez-Sánchez C, Egea C and Candela ME. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathology 48:58-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00317.x>
- Silva VM. 2015. *Saccharicola* sp., agente de control biológico del tule (*Typha domingensis* Pers.). Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 56 pp. Disponible en línea: [colposdigital.colpos.mx:8080/js-pui/handle/10521/48](http://colposdigital.colpos.mx:8080/js-pui/handle/10521/48)
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM y Luna-Ruiz JJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum*) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219207>

# Characterization of *Citrus exocortis viroid* in different conditions of indexing

## Caracterización del *Viroide exocortis de los cítricos* en diferentes condiciones de indexado

Susana Alcántara-Mendoza, Santiago Vergara-Pineda, Oscar García-Rubio, Víctor H. Cambrón-Sandoval, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, CP 76230, México; Domingo Colmenares-Aragón\*, Departamento de Cuarentena, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. km 21.5 Carretera Amazcala-Chichimequillas, El Marqués, Querétaro, CP 76263, México; Cristian Nava-Díaz, Especialidad en Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México. \*Autor para correspondencia: dca79mx@gmail.com

Recibido: 18 de Enero, 2017.

Aceptado: 13 de Abril, 2017.

Alcántara-Mendoza S, Vergara-Pineda S, García-Rubio O, Cambrón-Sandoval VH, Colmenares-Aragón D, Nava-Díaz C. 2017. Characterization of *Citrus exocortis viroid* in different conditions of indexing. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 284-303.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-3

Primera publicación DOI: 1 de mayo, 2017.

First DOI publication: May 1, 2017.

**Resumen.** *Citrus exocortis viroid* (CEVd) es un fitopatógeno regulado en la citricultura de México. El diagnóstico por indexado para detectar la presencia y transmisión de CEVd en material propagativo de bancos de germoplasma es de aplicación oficial. El objetivo de este estudio fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y la rapidez con que se generan los síntomas para establecer su aplicación en el diagnóstico biológico.

**Abstract.** *Citrus exocortis viroid* (CEVd) is a regulated pathogen in Mexican citriculture. The diagnosis by indexing to detect the presence and transmission of CEVd in propagative material of germplasm banks is of official application. The aim of this study was characterizing to CEVd by *in vitro* and *in vivo* indexing to analyzing the efficiency of the transmission and the speed with which the symptoms are generated to establish their application in the biological diagnosis. The height, incidence, area under the disease progress curve (ABCP) and transmission efficiency were evaluated in etrog citron indicator plants, cultivated *in vivo* inoculated by grafting and in buds cultivated *in vitro* inoculated with callus. The mean height of buds and infected plants was 7.5 mm and 56.3 mm less than the control, incidence, ABC and regression model were 81.2%, 10.7,  $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$ ,  $R^2 = 0.99$  *in vitro* y 70.8%, 9.84,  $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$ ,  $R^2 = 0.94$  *in vivo*, respectively. The efficiency

Se evaluó altura, incidencia, área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCP) y eficiencia de transmisión en plantas indicadoras de citron etrog cultivadas *in vivo* inoculadas por injerto y en brotes cultivados *in vitro* inoculados con callos. La altura media de brotes y plantas infectadas fue menor 7.5 mm y 56.3 mm respecto al testigo, la incidencia, ABCP y modelo de regresión fueron 81.2 %, 10.7,  $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$ ,  $R^2 = 0.99$  *in vitro* y 70.8%, 9.84,  $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$ ,  $R^2 = 0.94$  *in vivo*, respectivamente. La eficiencia fue 99 % en ambos métodos con síntomas a partir del décimo día posterior a la inoculación *in vitro* y 40 *in vivo*. Las condiciones *in vitro* generan una rápida expresión de síntomas en el diagnóstico por indexado contribuyendo a la detección oportuna de CEVd para evitar su dispersión.

**Palabras clave:** cultivo de tejidos, callos, pospoviroidae, injerto, inoculación.

El viroide exocortis de los cítricos (CEVd) es un patógeno que causa síntomas reducción de crecimiento, desprendimiento y agrietamiento de la corteza, epinastia de hojas y grietas en el peciolo (Bernard *et al.*, 2009) afecta a diferentes especies de cítricos como *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, lima rangpur (*Citrus limonia*), limón (*C. limon*) y citron etrog (*C. medica*) (Lin *et al.*, 2015a), tiene varios hospedantes como vid (*Vitis vinifera*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), haba (*Vicia faba*), pepino (*Cucumis sativus*), ortiga de terciopelo (*Gynura aurantiaca*), crisantemo (*Crysanthemum morifolium*), impatiens (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verbena x hybrida*) (Škorić *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis, 2014) y petunia (*Petunia* spp.) (Van Brunshot *et al.*, 2014). La transmisión del viroide se lleva a cabo por injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma

of both indexing methods was 99 % with initial symptoms tenth days after the *in vitro* inoculation and 40 *in vivo*. The *in vitro* conditions generate a rapid expression of symptoms in the diagnosis by indexing contributing to the opportune detection of CEVd to avoid its dispersion.

**Key words:** tissue culture, callus, pospoviroid, graft, inoculation,

*Citrus exocortis viroid* (CEVd) is a pathogen that causes symptoms of stunting, bark sloughing and cracking, leaf epinasty and cracks in the petiole (Bernard *et al.*, 2009); it affects different species of citrus, such as *Poncirus trifoliata* and its hybrids, rangpur lime (*Citrus limonia*), lemon (*C. limon*) and citron (*C. medica*) (Lin *et al.*, 2015a), and has various hosts such as the common grapevine (*Vitis vinifera*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), broad bean (*Vicia faba*), cucumber (*Cucumis sativus*), velvet plant (*Gynura aurantiaca*), chrysanthemum (*Crysanthemum morifolium*), impatiens (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verbena x hybrida*) (Škorić *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis, 2014) and petunia (*Petunia* spp.) (Van Brunshot *et al.*, 2014). The transmission of the viroid was carried out by grafting infected buds in healthy trees, or mechanically (Lin *et al.*, 2015a) with the use of a cutting instrument and contaminated trimming. There is no chemical to fight this disease, and the only form of control is prevention, with the use of propagative material free of viroids (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) from germplasm banks and greenhouses that accomplish strictly with biological and molecular diagnoses (NAPPO, 2013).

The biological diagnosis by indexing is an efficient tool to test the health state of a plant regarding a disease by inoculation with the grafting

mecánica (Lin *et al.*, 2015a) a través del uso de la herramienta de corte y poda contaminada. El control químico para el combate de la enfermedad no existe y el único medio de control es la prevención con el uso de material propagativo libre de viroides (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) que provenga de bancos de germoplasma y viveros que cumplan de forma obligatoria con diagnósticos biológicos y moleculares (NAPPO, 2013).

El diagnóstico biológico por indexado es una herramienta eficiente para comprobar el estado fitosanitario de una planta respecto a una enfermedad mediante la inoculación por injerto de yema o cualquier otro tejido infectado en plantas indicadoras que permitan la replicación del viroide, la manifestación de síntomas (Roistacher, 1991; Hajeri *et al.*, 2011) y el aumento de su concentración. El indexado *in vivo* para el diagnóstico del CEVd puede durar 90 días (Malfitano *et al.*, 2005; Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a), es laborioso, requiere de invernaderos tecnificados y dificulta el análisis de grandes cantidades de plantas, lo que disminuye la posibilidad de crear nuevos bancos de germoplasma para conservar y propagar variedades sanas. Actualmente solo existen dos bancos de germoplasma en México (DGSV, 2016) que cumplen con los requisitos y diagnósticos oficiales establecidos por el SENASICA, uno de los cuales es operado por la misma institución y el otro pertenece al sector privado. Un diagnóstico rápido, exacto y confiable de una enfermedad es la base del éxito para la conservación de germoplasma, la importación, introducción y propagación comercial de yemas de cítricos libres de viroides.

El efecto de los viroides sobre el rendimiento y calidad de la cosecha de los cítricos son altamente dependientes de la especie, variedad, patrón, tipo de aislamiento viroidal y de las condiciones ambientales en que se desarrollan (Pethybridge *et al.*, 2008). El estudio de las condiciones que afectan

of the bud or any other infected tissue in indicator plants that allow the replication of the viroid, the manifestation of symptoms (Roistacher, 1991; Hajeri *et al.*, 2011) and the increase of its concentration. Indexing *in vivo* for the CEVd diagnosis can last up to 90 days (Malfitano *et al.*, 2005; Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a); it is labour intensive and requires technified greenhouses, and the analysis of large amounts of plants is complicated, which reduces the possibility of creating new germplasm banks to preserve and propagate new healthy varieties. Currently there are only two germplasm banks in Mexico (DGSV, 2016) that accomplish with the official requirements and diagnoses established by SENASICA, one of which is operated by that institution, whereas the other belongs to the private sector. A quick, accurate and reliable diagnosis of a disease is the key to success in germplasm conservation, and the import, introduction, and propagation of viroid-free citrus buds.

The effect of the viroids on the yield and quality of citrus crops are highly dependant on the species, variety, pattern, type of viral isolate, and on the environmental conditions in which they develop (Pethybridge *et al.*, 2008). The study of the conditions that affect the development of a disease help predict prediction models, find possible weather conditions related to changes, determine the intensity of the disease, establish management measures to reduce the possible effect of the incidence and severity on the field, or to speed up the disease with diagnosis purposes. The development of characteristic symptoms of viroids in economically important plants using *in vitro* culture has proven to be an effective tool in transmission-related studies (El-Dougdoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012) and diagnosis by indexing (Kapari *et al.*, 2008). Alternative techniques to the official diagnosis by indexing that help understand the behavior of

el desarrollo de una enfermedad permiten generar modelos de predicción, detectar posibles variables climáticas asociadas con cambios, determinar la intensidad de la enfermedad, establecer medidas de manejo para reducir el posible efecto de la incidencia y severidad en campo o acelerar la velocidad de la enfermedad con fines de diagnóstico. El desarrollo de síntomas característicos de viroides en plantas de interés económico mediante el uso de cultivo *in vitro* ha mostrado ser una herramienta eficaz en estudios relacionados con transmisión (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012) y diagnóstico por indexado (Kapar *et al.*, 2008). Técnicas alternativas al diagnóstico oficial por indexado que permitan conocer el comportamiento de los viroides en ambientes controlados pueden ser útiles en el desarrollo de diagnósticos oportunos, la prevención de la enfermedad y el establecimiento de medidas de manejo. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas causados por el viroide para establecer su aplicabilidad en el diagnóstico biológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de callos y brotes

Varetas de 8 cm longitud y 3 mm de diámetro de citron etrog (*C. medica*) se disectaron de plantas sanas e infectadas con CEVd aislamiento E811 cultivadas en invernadero. El material vegetal infectado con CEVd fue obtenido de la colección de la DGSV-SENASICA en México procedente de USDA-ARS. Las varetas se lavaron con jabón líquido y agua corriente, se desinfectaron con 0.5 % de hipoclorito de sodio durante un minuto,

viroids in controlled environments can help develop timely diagnoses, prevent diseases, and establish management measures. Based on this, the aim of this work was to characterize CEVd under indexing conditions *in vitro* and *in vivo* comparing the efficiency of transmission and the time required to develop symptoms caused by the viroid to establish its applicability in the biological diagnosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Cultures of callus and sprouts

Citron (*C. medica*) budwood, 8 cm long and 3 mm in diameter, were dissected from plants, both healthy and diseased with CEVd isolate E811 planted in greenhouses. The plant material infected with CEVd was obtained from the collection of the DGSV-SENASICA in Mexico, from the USDA-ARS. The budwood were washed with liquid soap and faucet water, disinfested with 0.5% sodium hypochlorite solution for one minute, 70% ethanol for 50 seconds, and finally rinsed three times with sterile distilled water in aseptic conditions inside a laminar flow cabinet. The budwood were divided into 3 cm long segments, dissected longitudinally, and cultured *in vitro* with the cut surface in contact with the medium. The explants were cultured in each jar, 8 cm in diameter and 12 cm tall. The callus induction medium contained inorganic Murashige and Skoog salts (1962) supplemented with i-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), thiamine HCl (0.1 mg L<sup>-1</sup>), pyridoxine HCl (0.5 mg L<sup>-1</sup>), nicotinic acid (0.5 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), naphthaleneacetic acid (10 mg L<sup>-1</sup>) and 6-benzylaminopurine (0.25 mg L<sup>-1</sup>) according to the procedure by Duran *et al.* (1989) and Navas *et al.* (1995). The medium was adjusted to a pH of 5.7, solidified with 2.8 g L<sup>-1</sup> of phytigel® Sigma and sterilized in an autoclave

70 % de etanol durante 50 segundos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar. Las varetas se dividieron en segmentos de 3 cm de largo, se disectaron longitudinalmente y se cultivaron *in vitro* con la superficie cortada en contacto con el medio. Los explantes se cultivaron en cada frasco de 8 cm de diámetro por 12 cm de alto. El medio para inducción de callo contenía sales inorgánicas de Murashige and Skoog (1962) suplementado con i-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), tiamina HCl (0.1 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina HCl (0.5 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), ácido naftalenácetico (10 mg L<sup>-1</sup>) y 6-benzilaminopurina (0.25 mg L<sup>-1</sup>) de acuerdo con el procedimiento de Duran *et al.* (1989) y Navas *et al.* (1995). El medio se ajustó a pH de 5.7, se solidificó con 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel® Sigma y se esterilizó en autoclave a 116 °C por 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 26 °C ± 2 °C durante 3 semanas hasta la formación de callo y se seleccionaron aquellos que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias. Pequeñas porciones de callo de 3 mm se utilizaron para el indexado *in vitro* una vez que se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR.

Se obtuvieron tallos con brotes de 4 a 5 cm de largo de plantas de citron etrog cultivadas en invernadero sin historial de infección y negativas a CEVd por RT-PCR. Los tallos con brotes se lavaron y desinfectaron superficialmente con el procedimiento descrito anteriormente y se sumergieron durante 1 minuto en solución de estreptomycin (200 mg L<sup>-1</sup>) para eliminar bacterias del tejido. Los brotes se disectaron para cortar secciones de tallo de 1.5 ± 0.5 cm de las plantas y se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) adicionando 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El medio se ajustó a pH de 5.7 y se dispuso 25 ml en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 116 °C por 20 minu-

at 116 °C for 20 minutes. The cultivars were kept in the dark at 26 °C ± 2 °C for 3 weeks until the callus was formed, those without contamination by saprophytic fungi or bacteria, were chosen. Small 3 mm portions of callus were used for the indexing *in vitro* once the presence of CEVd was found using RT-PCR.

Citron plant stalks were obtained with sprouts 4 to 5 cm in length, planted in a greenhouse, with no record of infections and negative for CEVd by RT-PCR. The stalks with sprouts were washed and superficially disinfested using the procedure described previously, and submerged in water for 1 minute in a streptomycin solution (200 mg L<sup>-1</sup>) to eliminate bacterial from the tissue. The sprouts were dissected to cut stalk sections of 1.5 ± 0.5 cm long from the plants and those were cultured in a MS medium (Murashige and Skoog, 1962), adding 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The medium pH was adjusted to 5.7 and dispensed in 25 ml in test tubes and sterilized in an autoclave at 116 °C for 20 minutes. The medium was solidified with 3.0 g L<sup>-1</sup> of phytigel® (Sigma). The sprouts were incubated at 25 ± 2 °C with a photoperiod of 12 hours and after 48 hours of incubation, the sprouts without contamination by saprophytic fungi or bacteria were selected to indexing.

### **Indexing *in vitro***

The sprouts were inoculated by a lateral cutting, 2-3 mm long, tongue-shaped graft with callus. The inoculated sprouts were transferred to new culture tubes solid sterile MS medium, and were incubated for 50 days at 25 ± 2 °C with a photoperiod of 16 hours. The blades used during inoculation were disinfested between treatments by immersion in a 1 % sodium hypochlorite solution for 15 seconds to prevent cross-infections (Kovalskaya and Hammond, 2014). During the test, the number

tos. El medio se solidificó con 3.0 g L<sup>-1</sup> de phytagel® (Sigma). Los brotes se incubaron a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 12 horas luz y después de 48 horas de incubación los brotes que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias se seleccionaron para indexar.

### **Indexado *in vitro***

Los brotes se inocularon por injerto lateral en forma de lengüeta de 2-3 mm de largo con callo. Los brotes inoculados fueron transferidos a tubos nuevos de cultivo que contenían medio MS sólido estéril y se incubaron durante 50 días a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas. Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre tratamientos por inmersión en solución con 1 % de hipoclorito de sodio durante 15 segundos para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Durante el ensayo se registró el número de brotes con síntomas y se midió la altura directamente sobre el brote con un vernier digital en la campana de flujo laminar. La presencia de CEVd en los brotes se detectó por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

### **Indexado *in vivo***

Plantas indicadoras de citron etrog con diagnóstico negativo a CEVd por RT-PCR se inocularon con injertos de yema y como testigo se usaron plantas no injertadas. Las yemas injertadas provenían de plantas que se diagnosticaron previamente como libres o infectadas con CEVd. Durante el establecimiento del ensayo, las plantas se podaron a 30 cm de altura y todas las hojas se eliminaron al momento de injertar para permitir el desarrollo de nuevos brotes. El injerto de yema se realizó de acuerdo con el método de Roistacher (1991). Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre

of sprouts with symptoms were recorded, and the height above the sprout was measured using a digital caliper in the laminar flow cabinet. The presence of CEVd in the sprouts was detected by the chain reaction of polymerase with reverse transcriptase (RT-PCR).

### **Indexing *in vivo***

Citron indicator plants with negative CEVd diagnoses by RT-PCR were inoculated with bud grafts and non-grafted plants were used as a control. The grafted buds came from plants previously diagnosed as healthy or infected with CEVd. During the setup of the test, the plants were trimmed to a height of 30 cm and all their leaves were eliminated for grafting to help new sprouts develop. The bud graft was carried out following the method by Roistacher (1991). The blades used during inoculation were disinfested between treatments and repetitions by submerging them in a 1 % sodium hypochlorite solution for one minute to prevent cross-infections (Kovalskaya and Hammond, 2014). The plants were planted individually in 4L plastic pots and kept in a greenhouse at 28-32 °C. For one year and four months, a record was kept of symptoms described by Roistacher (1991) and Bernard *et al.* (2009), the presence of CEVd was detected using RT-PCR and the height was measured from ground level to the tallest sprout.

### **Detection of CEVd by RT-PCR**

The citron budwood used as a source of plant material for the culture of callus and sprouts were diagnosed for the presence or absence of CEVd one week before placing the material. Indexed sprouts were diagnosed 60 days after inoculation and citron plants of the *in vivo* indexing were

tratamientos y repeticiones por inmersión en una solución con 1 % de hipoclorito de sodio durante un minuto para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las plantas fueron cultivadas de forma individual en macetas de plástico de 4 L y mantenidas en invernadero con 28-32 °C. Durante año y cuatro meses se registró el desarrollo de síntomas descritos por Roistacher (1991) y Bernard *et al.* (2009), se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR y se midió la altura del nivel del suelo hasta el brote más alto.

### Detección de CEVd por RT-PCR

Las varetas de citron que sirvieron como fuente de material vegetal para el cultivo de callos y brotes fueron diagnosticadas a la presencia o ausencia de CEVd una semana antes de colectar el material. Los brotes indexados se diagnosticaron a los 60 días después de la inoculación y las plantas de citron del indexado *in vivo* se diagnosticaron una semana antes y 180 días después de injertar. La presencia de CEVd en callos, yemas, brotes indexados cultivados *in vitro* y en plantas indexadas en invernadero se confirmó por RT-PCR. El RNA total se extrajo con los reactivos y el protocolo de RNeasy Plant Mini® de Qiagen y la síntesis de cDNA se llevó a cabo con la enzima SuperScrip™ II Reversa Transcriptasa (Invitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del cDNA viroidal por PCR se llevó a cabo con los iniciadores CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' y CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' que amplifican un fragmento de 371 pb (Yang *et al.*, 1992) de acuerdo con las condiciones de Bernad *et al.* (2009) usando y Platinum® *Taq* polimerase high fidelity (Invitrogen Corp.). Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg ml<sup>-1</sup>), visualizado en luz

diagnosed one week before and 180 days after grafting. The presence of CEVd in callus, buds, sprouts indexed *in vitro* and in a greenhouse was confirmed by RT-PCR. Total RNA was extracted with the reagents and the protocol by RNeasy Plant Mini® by Qiagen and the cDNA synthesis was carried out with the enzyme SuperScrip™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp.) following manufacturer instructions. The amplification of viroidal cDNA by PCR was carried out in primers CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' and CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' that amplify a fragment of 371 pb (Yang *et al.*, 1992) according to conditions described by Bernad *et al.* (2009) using Platinum® *Taq* polymerase high fidelity (Invitrogen Corp.). The products of the reaction were analyzed by electrophoresis in a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg ml<sup>-1</sup>), visualized under UV light and photodocumented in a Gel Doc EZ system® (Biorad). The fragments obtained in the RT-PCR were sequenced in an Applied Biosystem Corp Genetic Analyzer 3100. The sequences were analyzed using the program Chromas V. 2.5.0, aligned with Clustal W in the program Mega v.7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016), and a consensual sequence was obtained using the program Seaview v.4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). The consensual sequence was compared with the original isolation sequence and with sequences deposited in the National center for biotechnology information (NCBI, 2010) through the option BLASTn ver 2.3.0 (Altschul *et al.*, 1990).

**Sensitivity, specificity, and accuracy of the RT-PCR:** The parameters related to the diagnosis by RT-PCR were calculated for the treatments grafted with tissue infected with CEVd in each indexing procedure according to Papayiannis, 2014. The calculation formulas were as follows: sensitivity=



UV y fotodocumentado en un equipo Gel Doc EZ system® (Biorad). Los fragmentos obtenidos de la RT-PCR fueron secuenciados en un equipo Genetic Analyzer 3100 de Applied Biosystem Corp. Las secuencias se editaron con el programa Chromas V. 2.5.0, se alinearon con Clustal W en el programa Mega v.7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo una secuencia consenso con el programa Seaview v.4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). La secuencia consenso se comparó con la secuencia del aislamiento de origen y con secuencias depositadas en el National center for biotechnology information (NCBI, 2010) a través de la opción BLASTn ver 2.3.0 (Altschul *et al.*, 1990).

**Sensibilidad, especificidad y exactitud de la RT-PCR:** Los parámetros asociados al diagnóstico por RT-PCR se calcularon para los tratamientos injertados con tejido infectado por CEVd en cada procedimiento de indexado de acuerdo con Papiyannis, 2014. Las fórmulas de cálculo fueron: sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)\* 100; especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)\* 100; exactitud= (muestras negativas+ positivos/ negativos+ positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)\* 100.

**Eficiencia del indexado:** La eficiencia del indexado ( $\Theta$ ) se determinó como la probabilidad de expresión de síntomas (P) en muestras inoculadas con tejido infectado (n) con un nivel de confianza del 95 %, de acuerdo a la metodología de Vidalakis *et al.* (2004). La eficiencia se calculó con la fórmula  $\Theta = 1 - (1 - P_L)^n$  usando el límite inferior de probabilidad de Clopper y Pearson ( $P_L = 0.7935$  calculado para 16 unidades) y  $n=4$  como el número mínimo de muestras recomendado por Roistacher (1991) y Vidalakis *et al.* (2004) para el diagnóstico de CEVd por indexado.

(positive samples / positive samples+ false negatives)\* 100; specificity= (negative samples / negative samples + false positives)\* 100; accuracy= (negative samples + positives/ negatives+ positives+ false negatives+ false positives)\* 100.

**Indexing efficiency:** The indexing efficiency ( $\Theta$ ) was determined as the probability of the expression of symptoms (P) in samples inoculated with infected tissue (n) with a level of confidence of 95 %, according to the methodology by Vidalakis *et al.* (2004). Efficiency was calculated with the formula  $\Theta = 1 - (1 - P_L)^n$  using the lower probability limit by Clopper and Pearson ( $P_L = 0.7935$  calculated for 16 units) and  $n=4$  as the minimum number of samples recommended by Roistacher (1991) and Vidalakis *et al.* (2004) for the diagnosis of CEVd by indexing.

**Experimental design and statistical analysis:** We used an experimental design of fields divided in time by each indexing condition (*in vitro* and *in vivo*). The largest field was for the treatments, and the small field, the days after inoculation (dai). The biological indexing *in vitro* of CEVd was composed of four experiments, separated in time, which included three treatments with four repetitions: the inoculation of sprouts with callus infected by CEVd (T1), inoculation with a healthy callus (T2) and a non-inoculated sprout as a control (Ta) with a total of 48 samples analyzed. The variables evaluated were the incidence of sprouts with symptoms at 10, 15 y 20 dai and accumulated height from the initial height at 10, 20, 30 and 40 dai.

The *in vivo* biological indexing consisted in evaluating four experiments with three treatments: plant inoculated with buds infected by CEVd (T3), plant inoculated with buds without evidence of infection by CEVd by RT-PCR and indexing (T4) and non-inoculated plant as controls (Tb) with a

**Diseño experimental y análisis estadístico:** Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas en el tiempo por cada condición de indexado (*in vitro* e *in vivo*). La parcela grande fueron los tratamientos y la parcela chica el tiempo transcurrido en días después de la inoculación (ddi). El indexado biológico *in vitro* de CEVd se conformó de cuatro experimentos separados en tiempo que incluyeron tres tratamientos con cuatro repeticiones: la inoculación de brote con callo infectado por CEVd (T1), la inoculación con callo sano (T2) y brote sin inocular como testigo (Ta) con un total de 48 muestras analizadas. Las variables que se evaluaron fueron incidencia de brotes con síntomas a los 10, 15 y 20 ddi y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30 y 40 ddi.

El indexado biológico *in vivo* consistió en evaluar cuatro experimentos con tres tratamientos: planta inoculada con yemas infectadas por CEVd (T3), planta inoculada con yemas sin evidencia de infección por CEVd por RT-PCR e indexado (T4) y planta no inoculada como testigos (Tb) con un total de 48 muestras analizadas y cuatro repeticiones por tratamiento. Las variables que se evaluaron fueron incidencia a los 40, 50 y 60 días después de la inoculación (ddi) y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30, 40 y 180 ddi. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95 % con el paquete estadístico Statistical Analysis System ver 9.0 (2002). Se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en brotes y plantas infectados con el método del trapecio en el programa ABCDPE ver 1.1 (Mora y Acevedo, 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Detección por RT-PCR:** Las muestras infectadas de ambos indexados resultaron positivas a CEVd

total of 48 samples analyzed and four repetitions per treatment. The variables evaluated were the incidence at 40, 50, and 60 days after inoculation (dai) and accumulated height from the initial height at 10, 20, 30, 40, and 180 dai. The data of the variables underwent an analysis of variance and Tukey comparison of averages test, with a trust level of 95 % using the Statistical Analysis System ver 9.0 (2002). The area under the disease progress curve was calculated for infected sprouts and plants using the trapeze method in the AUDPC program ver 1.1 (Mora and Acevedo, 2016).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Detection by RT-PCR:** The infected samples of both indexing turned out positive for CEVd with 94 to 100 % sensitivity in RT-PCR (Table 1). The sprouts grafted with healthy callus, plants grafted with healthy buds, and the controls, turned out negative (Figure 1). The detection of CEVd in the samples of the *in vitro* indexing of this study correspond with the results obtained by Hajeri *et al.* (2011), who detected the presence of CEVd in plantlets developed *in vitro*, inoculated with protoplasts of infected callus. To avoid the sensitivity, specificity, and accuracy in this work, we considered as false negatives the samples that showed CEVd symptoms, but which were not amplified by RT-PCR, which could have been due to the presence of inhibitors in the reaction or to the use of a hardly thermostable reverse transcriptase; these deficiencies can be overcome with more sensitive protocols (Guerrero *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) that allow for an increase in the temperature of cDNA synthesis of the viroid and reduce the formation of secondary structures of the RNA of interest. The specificity and accuracy of the indexing was 97 to 100 %, values that indicate the health status of the samples. The results of the

con 94 a 100 % de sensibilidad en la RT-PCR (Cuadro 1). Los brotes injertados con callo sano, plantas injertadas con yema sana y los testigos resultaron negativos (Figura 1). La detección de CEVd en las muestras del indexado *in vitro* de este estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Hajeri *et al.* (2011) quienes lograron detectar la presencia de CEVd en plántulas desarrolladas *in vitro* inoculadas con protoplastos de callos infectados. Para evaluar la sensibilidad, especificidad y exactitud en este trabajo, se consideró como falsos negativos a muestras que presentaron síntomas de CEVd pero que no amplificaron por RT-PCR lo cual pudo deberse a la presencia de inhibidores en la reacción o al uso de una transcriptasa reversa poco termoestable, estas deficiencias pueden ser superadas con protocolos más sensibles (Guerrero *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que permitan incrementar la temperatura de síntesis de cDNA del viroide y disminuir la formación de estructuras secundarias del ARN de interés. La especificidad y exactitud en los indexados fue del 97 a 100 %, valores que nos indican el estado fitosanitario de las muestras. Los resultados de la secuenciación mostraron que los fragmentos obtenidos correspondían al *Citrus exocortis viroid* con 99 % de similitud y 99 % de cobertura con un tamaño de 310 pb indicando su presencia en las plantas indicadoras. Probablemente el alto valor de similitud encontrado se deba a que la composición genética del viroide suele no variar cuando es inoculado en el mismo tipo de hospedero de donde se aisló originalmente y a que los viroides se componen de haplotipos estrechamente relacionados (Bernard *et al.*, 2009). La detección de viroides en cítricos por RT-PCR es una herramienta útil (Saponari *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que no representa una desventaja al diagnóstico biológico ya que las aportaciones del indexado están relacionadas con el estudio de la interacción planta patógeno en un ambiente controlado de desarrollo

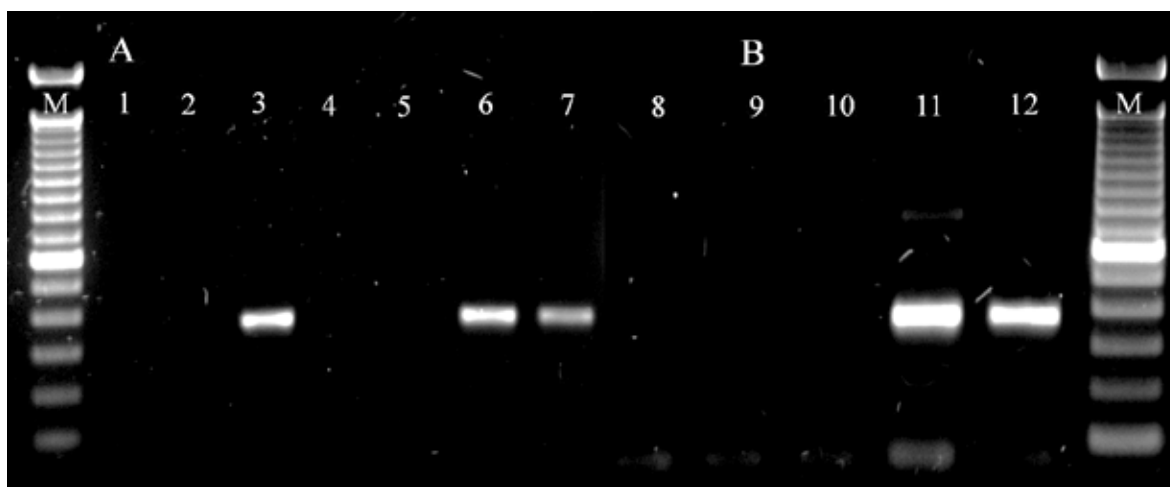
**Cuadro 1. Sensibilidad, especificidad, exactitud y eficiencia asociados al diagnóstico de CEVd por RT-PCR e indexado.**

**Table 1. Sensitivity, specificity, accuracy, and efficiency related to the diagnosis of CEVd using RT-PCR and indexing.**

| Diagnóstico por RT-PCR                                                      | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| Positivos                                                                   | 15              | 16             |
| Falsos positivos                                                            | 0               | 0              |
| Negativos                                                                   | 16              | 16             |
| *Falsos negativos                                                           | 1               | 0              |
| Sensibilidad                                                                | 93.8 %          | 100 %          |
| Especificidad                                                               | 100 %           | 100 %          |
| Exactitud                                                                   | 96.9 %          | 100 %          |
| Diagnóstico por indexado                                                    | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> |
| Muestras con síntomas/<br>muestras injertadas                               | 16/16           | 16/16          |
| Eficiencia del indexado ( $\Theta$ )<br>usando 4 unidades como<br>indicador | 99.8 %          | 99.8 %         |

Sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)\* 100; Especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)\* 100; Exactitud= (muestras negativas + positivos / negativos + positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)\* 100; Eficiencia ( $\Theta$ )=  $1 - (1 - P_L)^n$ ; con probabilidad de Clopper y Pearson  $P_L = 0.7935$  y  $n = 4$ . \*Para fines comparativos en éste trabajo se consideró como falso negativo la ausencia de amplificación por RT-PCR en muestras con síntomas / Sensitivity= (positive samples / positive samples + false negatives)\* 100; Specificity= (negative samples / negative samples + false positives)\* 100; Accuracy= (negative samples + positives / negatives + positives+ false negatives + false positives)\* 100; Efficiency ( $\Theta$ )=  $1 - (1 - P_L)^n$ ; with Clopper and Pearson probability  $P_L = 0.7935$  and  $n = 4$ . \*For comparative purposes, this work considered a false negative the absence of amplification by RT-PCR in plants with symptoms.

sequencing showed that the fragments obtained corresponded to the *Citrus exocortis viroid* with a similarity of 99% and 99% coverage with a size of 310 pb, indicating its presence in indicator plants. The high similarity value found may be due to the genetic composition of the viroid not usually varying when it is inoculated in the same type of host from which it was originally isolated, and to the fact that viroids are composed of broadly related haplotypes



**Figura 1.** Detección de *Citrus exocortis viroid* por RT-PCR. (A) Carriles 1-7: Indexado *in vitro*, M: marcador de 100 pb Invitrogen®, 1: control negativo sin ADN molde, 2: callo sano, 3: callo infectado, 4: brotes no injertados, 5: brotes injertados con callo sano, 6: brotes injertados con callo infectado 7: control positivo de tejido infectado. (B) Carriles 8-12: Indexado *in vivo*, 8: control negativo sin ADN molde, 9: plantas no injertadas, 10: plantas injertadas con yema sana, 11: plantas injertadas con yema infectada, 12: control positivo de CEVd. El fragmento amplificado corresponde a 371 pb. La imagen es representativa de un total de 48 muestras analizadas *in vitro* y 48 muestras *in vivo*.

**Figure 1.** Detection of *Citrus exocortis viroid* by RT-PCR. (A) Lanes 1-7: Indexing *in vitro*, M: 100 pb Invitrogen®, 1: negative control without mold DNA, 2: healthy callus, 3: infected callus, 4: non-grafted sprouts, 5: sprouts grafted with healthy callus, 6: sprouts grafted with infected callus 7: positive infected tissue control. (B) Lanes 8-12: Indexing *in vivo*, 8: negative control without mold DNA, 9: non-grafted plants, 10: plants grafted with healthy bud, 11: plants grafted with infected bud, 12: positive CEVd control. The amplified segment corresponds to 371 pb. The image is representative of a total of a total of 48 samples analyzed *in vitro* and 48 samples *in vivo*.

de la enfermedad. En infecciones asintomáticas en que no hay evidencia visual de la infección por viroides en el hospedante (Kovalskaya y Hammond, 2014) la detección por RT-PCR puede contribuir a determinar la presencia y constitución genética de CEVd y un ensayo de indexado que incluya diferentes hospedantes puede determinar cuáles son potencialmente susceptibles y el grado de daño que puede llegar a causar una enfermedad.

### Altura, incidencia y ABCP

Se presentaron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre tratamientos, tiempo (ddi) y la interacción tratamiento\* tiempo para las variables evaluadas en ambos procedimientos de indexado

(Bernard *et al.*, 2009). The detection of viroids in citrus by RT-PCR is a useful tool (Saponari *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) which does not represent a disadvantage to the biological diagnosis, since the contributions of the indexing are related to the study of the plant-pathogen interaction in a controlled environment for the development of the disease. In asymptomatic infections in which there is no visual evidence of an infection by viroids in the host (Kovalskaya and Hammond, 2014) detection by RT-PCR can contribute to determine the presence and genetic constitution of CEVd and an indexing test that includes different hosts could help determine which ones are potentially susceptible and the degree of damage a disease can cause.

(Cuadro 2). La altura media acumulada de los tratamientos *in vitro* fue 35.8 mm en testigo; 32.1 mm en brotes injertados con callos sanos y 19.3 mm en brotes injertados con callos infectados; mientras que para indexado en invernadero fueron 156.5 mm para testigo, 162.9 mm para plantas injertadas con yema sin infección y 106.7 mm para plantas injertadas con yemas infectadas. Existieron diferencias significativas en las alturas de los brotes *in vitro* en todas las fechas de evaluación. En las plantas indexadas en invernadero se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) a los 10 días después de la inoculación y altamente significativas a los 180 días. Se observó incremento de altura más o menos constante a través del tiempo en los tratamientos inoculados con callo o yema sana con respecto al testigo mientras que la altura de los tratamientos infectados fue 46 % menor (Figura 2A-B). Las diferencias en la altura de los brotes inoculados y los testigos del indexado *in vitro* observados en este estudio son parecidos a los resultados obtenidos por Černi *et al.* (2012) quienes compararon la altura de brotes de *Gynura aurantiaca* infectados por CEVD cultivados *in vitro* con valores estadísticos de altura mayores en los brotes sanos. En el indexado *in vivo* la altura de plantas injertadas con yemas infectadas

### Height, incidence, and ABCP

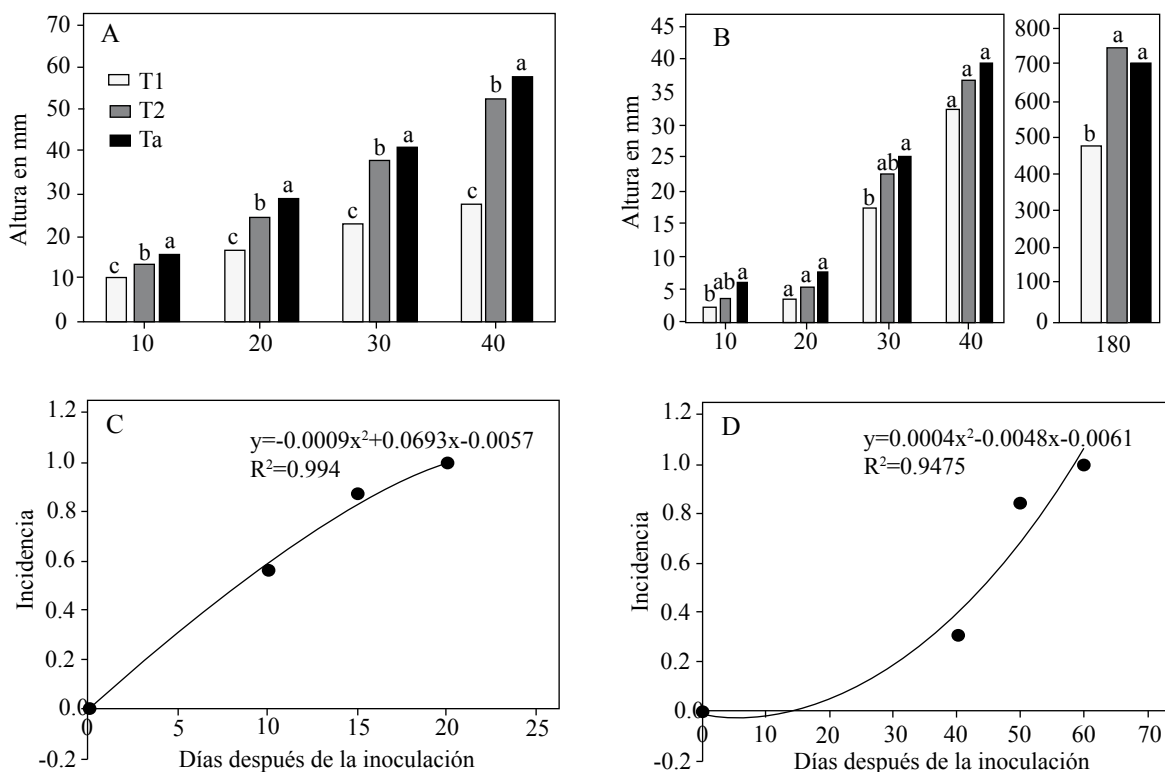
Highly significant differences ( $p \leq 0.01$ ) were observed between treatments, time (dai) and the interaction treatment\* time for the variables evaluated in both indexing procedures (Table 2). The average accumulated height of the treatments *in vitro* was 35.8 mm for the control; 32.1 mm for sprouts grafted with healthy callus and 19.3 mm for sprouts grafted with infected callus; whereas for indexing in the winter, these were 156.5 mm for the control, 162.9 mm for plants grafted with uninfected buds, and 106.7 mm for plants grafted with infected buds. Significant differences were observed in the heights of the sprouts *in vitro* in all the evaluation dates. In plants indexed in greenhouses, significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found 10 days after inoculation, and highly significant after 180 days. A roughly consistent increase in height was observed in time in the treatments inoculated with healthy callus or buds with respect to the control, while the height of the infected treatments was 46 % lower (Figure 2A-B). The differences in height of the inoculated sprouts and the controls of the *in vitro* indexing observed in this study are similar to results obtained by Černi

**Cuadro 2. Cuadrados medios de la altura e incidencia acumulada en dos condiciones de indexado.**

**Table 2. Average squares of the height and accumulated incidence in two indexing conditions.**

| FV          | GL     |            | <i>In vitro</i> |            | <i>In vivo</i> |            |
|-------------|--------|------------|-----------------|------------|----------------|------------|
|             | Altura | Incidencia | Altura          | Incidencia | Altura         | Incidencia |
| Trat        | 2      | 2          | 1197.5**        | 2.6**      | 14226.0**      | 2.0**      |
| Tiempo      | 3      | 2          | 2427.3**        | 0.07**     | 706280.8**     | 0.17**     |
| Trat*tiempo | 6      | 4          | 132.5**         | 0.07**     | 12007.1**      | 0.17**     |
| Media       |        |            | 29.1            | 0.27       | 142.0          | 0.24       |
| CV (%)      |        |            | 1.9             | 19.8       | 9.0            | 7.6        |

FV: factor de variación, GL: grados de libertad, Trat: tratamiento, CV: coeficiente de variación, \*\*: altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) / FV: factor of variation, GL: degrees of freedom, Trat: treatment, CV: coefficient of variation, \*\*: highly significant ( $p \leq 0.01$ ).



**Figura 2.** Comparación de medias de altura y curva de incidencia en brotes cultivados *in vitro* (A, C) y plantas injertadas *in vivo* (B, D). Letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes con Tukey ( $p=0.01$ ). T1: brotes injertados con callo infectado, T2: brotes injertados con callo sano, Ta: brotes no injertados, T3: plantas injertadas con yema infectada, T4: plantas injertadas con yema sana, Tb: plantas no injertadas. La línea y el modelo (C, D) representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

**Figure 2.** Comparison of averages of height and incidence curve in sprouts planted *in vitro* (A, C) and plants grafted *in vivo* (B, D). Different letters in each column are statistically different with Tukey ( $p=0.01$ ). T1: sprouts grafted with infected callus, T2: sprouts grafted with healthy callus, Ta: non-grafted sprouts, T3: plants grafted with infected bud, T4: plants grafted with healthy bud, Tb: non-grafted plants. The line and model (C, D) represent the adjustment with a quadratic regression.

fue 42 % menor con respecto al testigo, síntoma que se asocia a la infección de CEVd en plantas de cítricos (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las diferencias en altura entre tratamientos parecen estar relacionadas con la expresión diferencial de auxinas y citoquininas incluyendo la función de los meristemos apicales y laterales, los procesos de inmunidad de las plantas y la respuesta al estrés biótico o abiótico (Argueso *et al.*, 2010; Naseem y Dandekar, 2012) como el causado por una infección con CEVd. Probablemente el contenido de auxinas promovió la dominancia apical en los

*et al.* (2012), who compared the heights of *Gynura aurantiaca* sprouts infected by CEVd planted *in vitro* with greater statistical values for height in healthy sprouts. In the *in vivo* indexing, the height of plants grafted with infected buds was 42% lower than the control, symptom related to the infection with CEVd in citrus plants (Kovalskaya and Hammond, 2014). The height differences between treatments seem to be related to the differential expression of auxins and cytokinins, including the function of apical and lateral meristems, the plant immunity processes and the response to biotic and

brotos y plantas sanas de éste trabajo resultando en mayor altura, mientras que altos contenidos de citoquinas en plantas y brotes infectados por CEVd pudieron inhibirla (Laplaze *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Naseem y Dandekar, 2012) debido al impacto de las citoquininas en el flujo, distribución y señalización de la auxina (Shimizu *et al.*, 2009).

La incidencia en los brotes cultivados *in vitro* se incrementó a través del tiempo alcanzando la tasa más alta 20 ddi por injerto comparado con la curva de progreso de la enfermedad *in vivo* (Figura 2C-D) donde se alcanzó la máxima tasa el día 60 después de injertar. El indexado *in vitro* disminuyó 75 % el tiempo requerido para la aparición de síntomas típicos de la enfermedad después de la inoculación comparado con los ensayos del indexado *in vivo*, los cuales requirieron 30 días más. Una evaluación detallada del tiempo necesario para llevar a cabo un indexado podría incluir el tiempo de formación de callos *in vitro* (3 semanas). En este estudio solamente se consideró la variable ddi como el momento a partir del cual patógeno y hospedante están en contacto para la expresión de síntomas. Es cierto que el indexado *in vitro* requiere de tiempo para el desarrollo de los callos que servirán como inóculo, pero existe la posibilidad de utilizar otro tipo de tejido como la corteza de plantas infectadas (Kapari *et al.*, 2008). Además, la presencia de CEVd en brotes y callos cultivados *in vitro* podría contribuir a desarrollar nuevas líneas de investigación de aspectos relacionados con la patogenicidad de los viroides ya que el cultivo de callo infectado es fácil de conservar y multiplicar y es un tejido útil cuando se requiere homogenizar la muestra. Trabajos futuros que contribuyan a determinar si callos infectados con CEVd pueden infectar plantas cultivadas en invernadero serían de utilidad en el indexado tradicional *in vivo*.

El progreso de la enfermedad se ajustó a un modelo de regresión cuadrática donde  $y = -0.0009x^2 +$

abiotic stresses (Argueso *et al.*, 2010; Naseem and Dandekar, 2012) such as the one cause by an infection with CEVd. The auxin content may have promoted the apical dominance in healthy sprouts and plants in this work, resulting in a greater height, while the high contents of cytokinins in plants and sprouts infected by CEVd could have inhibited it (Laplaze *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Naseem and Dandekar, 2012) due to the impact of the cytokinins on the flow, distribution, and signaling of the auxin (Shimizu *et al.*, 2009).

The incidence on the sprouts planted *in vitro* increased with time, reaching the highest rate 20 dai by grafting, in comparison with the progress curve of the disease *in vivo* (Figure 2C-D), where the highest rate was reached on day 60 after grafting. The *in vitro* indexing decreased 75 % in the time required for the appearance of typical symptoms of the disease after inoculation compared with the tests of the indexing *in vivo*, which required another 30 days. A detailed evaluation of the time needed to carry out an indexing could include the time of formation of callus *in vitro* (3 weeks). This study only considered the variable dai as the moment as of which pathogen and host are in contact for the expression of symptoms. Although it is true that indexing *in vitro* requires time to develop callus that will act as inoculants, it is possible to use another type of tissue such as the cortex of infected plants (Kapari *et al.*, 2008). Also, the presence of CEVd in sprouts and callus planted *in vitro* could contribute to develop new lines of research of aspects related to the pathogenicity of the viroids, since infected callus cultures are easy to preserve and multiply, and it is a useful tissue when the sample needs to be homogenized. Future investigations that contribute to determine if callus infected with CEVd can infect plants grown in greenhouses could be useful in traditional *in vivo* indexing.

The disease progress was adjusted to a quadratic

$0.0693x - 0.0057$ ,  $R^2 = 0.994$  con  $p \leq 0.05$  y  $ABCP = 10.781$  para el indexado *in vitro*, mientras que para el indexado *in vivo* fueron  $y = 0.0004x^2 + 0.0048x - 0.0061$ ,  $R^2 = 0.947$  no significativa, y el  $ABCP = 9.844$ . El método del área bajo la curva del progreso de la enfermedad permitió una mejor comparación de los ambientes en que se desarrolló el viroide con respecto al modelo de regresión cuadrático que resultó no significativo en el indexado *in vivo* debido a la forma irregular de los datos con respecto al tiempo. La incidencia inicial mayor *in vitro* durante la aparición de la enfermedad representó una menor tolerancia al desarrollo de síntomas de CEVd comparado con la incidencia inicial *in vivo*. El uso de la misma variedad indicadora en ambos indexados indica que la concentración y el tamaño del hospedante entre un indexado y otro (5-30 cm) pudieron ser los principales factores de influencia en el desarrollo de la enfermedad. La rapidez con la que aparecen los síntomas *in vitro* podría deberse al tiempo que requieren los viroides para replicarse y moverse dentro de la planta inoculada (Kapari *et al.*, 2008). Posiblemente una mayor concentración derivada del tamaño de los brotes (5 cm) con respecto al tamaño de las plantas (30 cm) favoreció el rápido desarrollo de síntomas *in vitro* en éste estudio. Se ha demostrado que las temperaturas (24-40 °C) a las que se desarrollan los bioensayos contribuye a incrementar la concentración del viroide para la expresión de síntomas de CEVd (Škorić *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2015) potenciándose en hospederos más pequeños. Otro factor implicado en el proceso de infección por viroides es el movimiento a larga distancia dentro del floema que permite alcanzar hojas, raíces y órganos lejos de los tejidos inicialmente infectados (Bani *et al.*, 2010). En éste trabajo, la distancia de movimiento de CEVd en plantas con raíces del indexado *in vivo* fue mayor comparada con los brotes cultivados *in vitro* retardando el proceso de infección y en consecuencia la expresión de síntomas.

regression model, where  $y = -0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$ ,  $R^2 = 0.994$  with  $p \leq 0.05$  and  $AUDPC = 10.781$  for the indexing *in vitro*, while for the indexing *in vivo* they were  $y = 0.0004x^2 + 0.0048x - 0.0061$ ,  $R^2 = 0.947$  not significant, and the  $AUDPC = 9.844$ . The Area under the disease progress curve method helped obtain a better comparison of the environments in which the viroid developed in regard to the quadratic regression method that did not result significant in the *in vivo* indexing, due to the irregular shape of the data in regard to time. The highest initial incidence *in vitro* during the appearance of the disease represented a lower tolerance to the development of the CEVd symptoms in comparison with the initial incidence *in vivo*. The use of the same indicator variety in both indexing indicates that the concentration and the size of the host between indexing (5-30 cm) could be the main factors that influence the development of the disease. The speed with which the symptoms appear *in vitro* could be due to the time required by the viroids to replicate and move in the inoculated plant (Kapari *et al.*, 2008). Possibly, a higher concentration derived from the size of the sprouts (5 cm) in regard to the size of the plants (30 cm) favored the quick development of symptoms *in vitro* in this study. It has been proven that the temperatures (24-40 °C) the biotests undergo contributes to increasing the concentration of the viroid for the expression of symptoms of CEVd (Škorić *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2015) potentiating in smaller hosts. Another factor implied in the infection processes by viroids is the long distance movement inside the phloem that helps reach leaves, roots, and organs far away from those initially infected (Bani *et al.*, 2010). In this investigation, the distance travelled by CEVd in plants with roots of the *in vivo* indexing was greater than in sprouts planted *in vitro*, delaying the infection process, and consequently, the expression of symptoms.

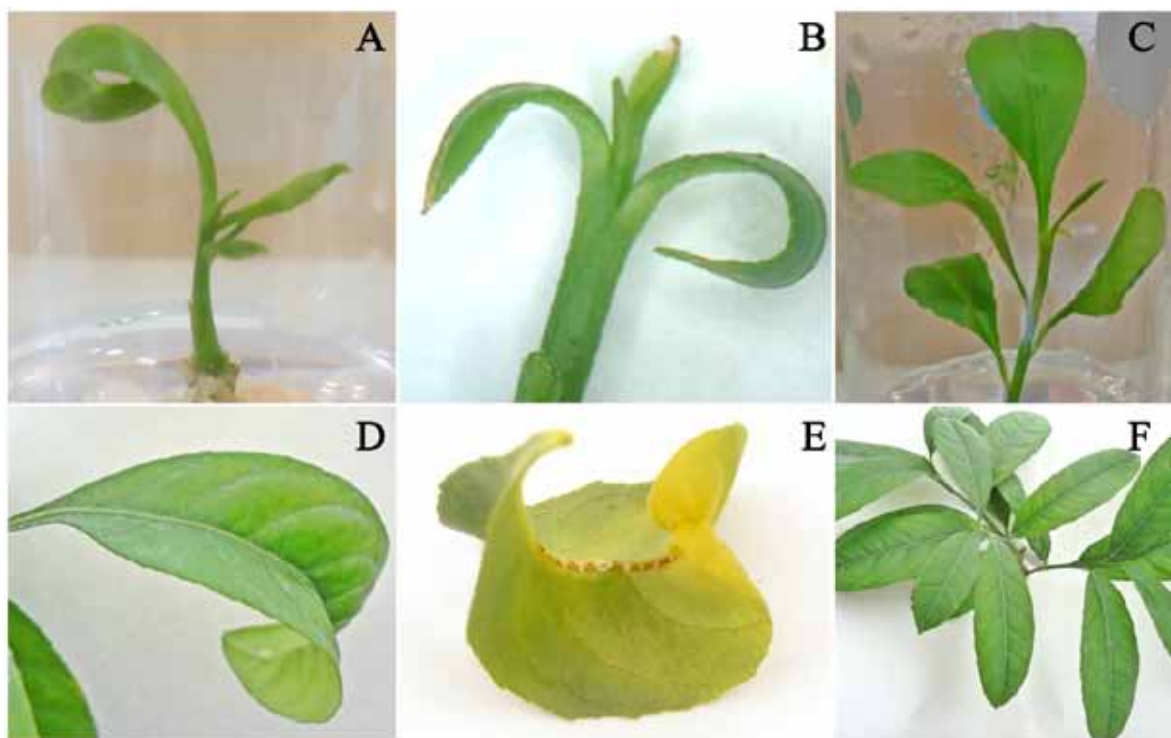


## Eficiencia del indexado

Los resultados de este estudio indican que ambos indexados *in vitro* e *in vivo* fueron 99 % eficientes (Cuadro 1). Un protocolo de indexado con una cantidad suficiente de indicadores biológicos puede considerarse eficiente si al menos un indicador biológico expresa síntomas. La cantidad de indicadores biológicos está determinada por el tipo de aislamiento, el tipo de infección o coinfección con otros patógenos y la capacidad de tener al menos un 99 % de eficiencia con una confianza del 95 % (Vidalakis *et al.*, 2004). Los brotes cultivados *in vitro* injertados con callo infectado mostraron síntomas de epinastia, reducción de crecimiento, hojas de tamaño reducido, rugosas y con puntas secas (Figura 3) que coinciden con lo reportado por Kapari *et al.* (2008) en brotes injertados con corteza infectada de CEVd. No se observaron síntomas en los brotes injertados con callo sano ni en los brotes testigo. Las plantas injertadas con yemas infectadas con CEVd presentaron síntomas de epinastia leve a severa, hojas arrugadas y torcidas hacia el envés con grietas de color café claro a oscuro en peciolo y ramas, ampollas en peciolo y crecimiento reducido que concuerdan con reportes de bioensayos de transmisión de CEVd en plantas de *C. medica* Arizona 861-S desarrolladas en invernadero (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a). El uso del cultivo *in vitro* en este estudio demostró ser útil para llevar a cabo la transmisión y desarrollo de síntomas característicos de CEVd con una eficiencia similar a los procedimientos de indexado *in vivo*, tal como se reporta en otros estudios para enfermedades asociadas a viroides en plantas de interés económico (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012). La presencia de síntomas en las muestras puede facilitar el diagnóstico molecular de los viroides (Camps *et al.*, 2014) porque se distribuyen de manera heterogénea en los tejidos de

## Indexing efficiency

The results of this study indicate that both *in vitro* and *in vivo* indexing were 99 % efficient (Table 1). An indexing protocol with a sufficient amount of biological indicators can be considered efficient if at least one biological indicator expresses symptoms. The amount of biological indicators is determined by the type of isolation, the type of infection or coinfection with other pathogens and the ability to have an efficiency of at least 99% with a trust of 95 % (Vidalakis *et al.*, 2004). The sprouts planted *in vitro* grafted with infected callus showed symptoms of epinasty, growth reduction, leaves with reduced sizes, rugged, and with dry tips (Figure 3), coinciding with reports by Kapari *et al.* (2008) for sprouts grafted with cortex infected with CEVd. No symptoms were observed in the sprouts grafted with healthy callus or in control sprouts. The plants grafted with buds infected with CEVd showed symptoms of slight to severe epinasty, leaves wrinkled and twisted to the reverse with light to dark brown cracks in petiole and branches, blisters in the petiole and reduced growth, which coincide with CEVd transmission reports of biotests for *C. medica* Arizona 861-S plants grown in greenhouses (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a). The use of the crop *in vitro* in this study proved to be useful to carry out the transmission and development of characteristic CEVd symptoms with an efficiency similar to the *in vivo* indexing procedures, as reported in other studies for diseases related to viroids in economically important plants (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012). The presence of symptoms in the samples can simplify the molecular diagnosis of the viroids (Camps *et al.*, 2014) since they distribute themselves homogeneously in the plant tissues (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015b) and it is difficult to determine if the sampled tissue corresponds to the



**Figura 3.** Síntomas asociados a *Citrus exocortis viroid* (CEVd) en brotes de *Citrus medica* inoculados *in vitro* (A epinastia y B: puntas secas) y en plantas cultivadas *in vivo* (D: epinastia y E: grietas en el envés). Brotes (C: sin síntomas) y plantas (F: sin síntomas) testigo.

**Figure 3.** Symptoms related to *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in *Citrus medica* sprouts inoculated *in vitro* (A epinastia and B: dry tips) and in plants planted *in vivo* (D: epinastia and E: cracks on the reverse). Sprouts (C: without symptoms) and control plants (F: without symptoms).

las plantas (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015b) y es difícil determinar si el tejido muestreado corresponde al tejido infectado a menos que la expresión de síntomas sirva como indicador.

La evaluación de la eficiencia en los métodos de indexado puede proveer de herramientas para personalizar los procesos a las necesidades específicas. Las condiciones, así como el número de indicadores usados en el diagnóstico puede ajustarse con base en la probabilidad de expresión de síntomas para minimizar el costo general del diagnóstico (Vidalakis *et al.*, 2004). Las condiciones *in vitro* abren una posibilidad de mejora a la dinámica actual del indexado aplicable en los programas de

infected tissue, unless the expression of symptoms serves as an indicator.

The evaluation of the efficiency of indexing methods can provide tools to personalize the processes to specific needs. The conditions, as well as the number of indicators used in the diagnosis, can be adjusted based on the probability of the expression of symptoms to minimize the overall cost of the diagnosis (Vidalakis *et al.*, 2004). The *in vitro* conditions open up a possibility of improvement from the current dynamics of indexing applicable in the propagative material certification programs for citrus plants to quickly discriminate the material infected by CEVd. Viroidal diseases in germplasm

certificación de material propagativo de cítricos para discriminar el material infectado por CEVd de forma rápida. La prevención de enfermedades viroidales en bancos de germoplasma se realiza a través del diagnóstico conjunto de indexado y pruebas de RT-PCR. El cumplimiento de los programas de certificación establecidos por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO) y la Organización de Protección de Plantas en América del Norte (NAPPO) han resultado en un control efectivo de enfermedades causadas por viroides (Barba *et al.*, 2003; Gergerich *et al.*, 2015). El procedimiento de indexado *in vitro* desarrollado en este estudio se suma a los esfuerzos de los programas de cuarentena y certificación de germoplasma con métodos alternativos al diagnóstico tradicional que minimicen los riesgos de epidemias causadas por viroides.

## CONCLUSIONES

El indexado *in vitro* de CEVd tiene la misma eficiencia que un diagnóstico *in vivo* y requiere de 20 a 40 días menos para alcanzar la máxima incidencia después de la inoculación. El cultivo de callos durante 3 semanas previo a la inoculación requiere ser sustituido por otro tipo de tejido no cultivado para reducir el tiempo total del indexado *in vitro*. El indexado *in vitro* para detección y diagnóstico de CEVd ofrece la posibilidad de sustituir al método tradicional *in vivo* en los procedimientos de certificación de cítricos para la formación de Bancos de Germoplasma.

## LITERATURA CITADA

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215: 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

banks are prevented with the joint diagnosis of indexing and RT-PCR tests. The compliance of certification programs established by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) and the North American Plant Protection Organization (NAPPO) has resulted in an effective control of diseases caused by viroids (Barba *et al.*, 2003; Gergerich *et al.*, 2015). The *in vitro* indexing procedure developed in this study is another addition to the efforts by the germplasm quarantine and certification programs with alternative methods to the traditional diagnosis that minimize the risks of epidemics caused by viroids.

## CONCLUSIONS

The *in vitro* indexing of CEVd has the same efficiency of an *in vivo* diagnosis, and requires between 20 and 40 days less to reach the maximum incidence after inoculation. The culture of callus for 3 weeks before inoculation requires substitution by another unplanted tissue to reduce the total time of the *in vitro* indexing. The *in vitro* indexing for the detection and diagnosis of CEVd offers the possibility of substituting the traditional *in vivo* method in the citrus certification procedures for the formation of germplasm banks.

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

- Argueso CT, Raines T and Kieber JJ. 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 533-539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.006>
- Bani HSM, Pensabene BG, Duran VN and Serra P. 2015. Phloem restriction of viroids in tree citrus hosts is overcome by grafting with etrog citron: potential involvement of a translocatable factor. *Journal of General Virology* 96 (8): 2405-2410. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.000154>
- Bani HSM, Barbosa CJ, Serra P and Duran-Vila N. 2010. Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. *Plant*

- Pathology 59: 413-421. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02234.x>
- Barba M, Gumpf DJ and Hadidi A. 2003. Quarantine of imported germplasm. pp: 303–311. *In*: Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semancik JS (eds.). Viroids, CSIRO Publishing. Science Publishers Inc., Australia USA. 400p.
- Bernard L, Duran VN and Elena SF. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology* 90: 2040–2049. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.010769-0>
- Camps R, Castro M and Besoain X. 2014. Simultaneous detection of CTV, CEVd and HSVd using Arizona 861 S1 citron and RT-PCR. *Ciencia e Investigación Agraria* 41: 255-261. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202014000200012>
- Černi S, Čurković PM, Rusak G and Škorić D. 2012. *In vitro* system for studying interactions between *Citrus exocortis viroid* and *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. metabolism and growing conditions. *Journal of Plant Interactions* 7: 254-261. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2011.591945>
- Clopper CJ and Pearson ES. 1934. The use of confidence of fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26: 404-413. <https://doi.org/10.1093/biomet/26.4.404>
- El-Dougdoug, K. H. A., Osman, M. E., Hayam, A. S., Rehab, D. A., and Reham, E. M. (2010). Elimination of Hop Stunt Viroid from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4, 54–60.
- Duran VN, Cambra M, Medina V, Ortega C and Navarro L. 1989. Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with citrus tristeza virus and citrus infectious variegation virus. *Phytopathology* 79: 820-826.
- DGSV, Dirección General de Sanidad Vegetal. 2016. Unidades de Producción de material propagativo de cítricos. Directorio de Bancos de Germoplasma. Ciudad de México. <http://senasica.gob.mx/?doc=24706>.
- El-Dougdoug KHA, Osman ME, Hayam AS, Rehab DA and Reham EM. 2010. Elimination of Hop Stunt Viroid (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 54–60.
- EPP0. 2016. Certification schemes. Pathogen-tested citrus trees and rootstocks PM4/12(1). European and Mediterranean plant protection organization. Paris, France. <https://gd.eppo.int/taxon/CEVD00/documents> (consulta febrero, 2016).
- Gergerich RC, Welliver RA, Gettys S, Osterbauer NK, Kamenidou S, Martin RR, Golino DA, Eastwell K, Fuchs M, Vidalakis G and Tzanetakakis IE. 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. *Plant Disease* 99: 176–187. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0762-FE>
- Gouy M, Guindon S and Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Guerrero GCE, Alvarado GOG, Gutiérrez MH, González GR, Álvarez OMG y Luna RM. 2013. Detección por RT-PCR punto final y tiempo real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31(1): 20-28. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974003>
- Hajeri S, Ramandugu C, Manjunath K, Ng J, Lee R and Vidalakis G. 2011. *In vivo* generated Citrus exocortis viroid progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology* 417: 400-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.013>
- Kapari IT, Kyriakou A, Papayiannis L, Tsaltas D, Gregoriou S and Psaltis I. 2008. Rapid *in vitro* microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology* 57(2): 348-353. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01774.x>
- Kovalskaya N and Hammond RW. 2014. Molecular biology of viroid host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228:48-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874 <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera RMB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T and Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell* 19: 3889-3900. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Lin CY, Wu ML, Shen TL, Yen HH and Hung TH. 2015a. Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and *Citrus exocortis viroid* infecting citrus in Taiwan. *Virology Journal* 12:11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0247-y>
- Lin CY, Wu ML, Shen TL and Hung TH. 2015b. A mutual titer-enhancing relationship and similar localization patterns between Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid co-infecting two citrus cultivars. *Virology Journal* 12:142. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0357-6>
- Mahfouze SA, El-Dougdoug KA and Allam EK. 2010. Production of Potato spindle tuber viroid-free potato plant materials *in vitro*. *Journal of American Science* 6:1570-1577. <http://doi.org/10.7537/marsjas061210.178>
- Malfitano M, Barone M, Duran-Villa N and Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 87 (2): 115-121. Disponible en línea: <http://www.jstor.org/stable/41998221>
- Mora AG y Acevedo SG. 2016. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE ver.1.1. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 56: 75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NAPPO. 2013. Norma regional de medidas fitosanitarias 16. Medidas integradas para la movilización de material propagativo de cítricos. North American Plant Protection Organization. North Carolina, USA. Disponible en línea: [http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16\\_10-09-2013-s.pdf](http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16_10-09-2013-s.pdf).
- Naseem M and Dandekar T. 2012. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLOS*

- Pathogens 8(11): e1003026. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Navas CJ, Moreno P and Durán VN. 1995. Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens are maintained in callus culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40: 133-137. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00037666>
- NCBI. 2010. National center for biotechnology information. Nucleotide blast. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (consulta, febrero 2016).
- Palukaitis P. 2014. What has been happening with viroids?. *Virus Genes* 49: 175-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-014-1110-8>
- Papayiannis LC. 2014. Diagnostic real time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of Virological Methods* 196:93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.001>
- Pethybridge SJ, Hay FS, Barbara DJ, Eastwell KC and Willson CR. 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology and management. *Plant Disease* 92:3. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0324>
- Roistacher CN. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. 286 p.
- Saponari M, Loconsole G, Liao HH, Jiang B, Savino V and Yokomi RK. 2013. Validation of high throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *Journal of Virological Methods* 193: 478-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.002>
- Shimizu SS, Tanaka M and Mori HE. 2009. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology* 69: 429-435. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- Singh RP, Dilworth AD, Ao X, Sing M and Baranwal VK. 2009. Citrus exocortis viroid transmission through commercially-distributed seeds of Impatiens and Verbena plants. *European Journal of Plant Pathology* 124: 691-694. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9440-4>
- Škorić D, Conerly M, Szychowski JA and Semancik JS. 2001. CEVd induced symptom modification as a response to a host specific temperature sensitive reaction. *Virology* 280: 115-123. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0744>
- Statistical Analysis System SAS. 2002. Statistical Analysis System for Windows release 9.0. SAS Inst. Inc., NC, USA.
- Van Brunshot SL, Persley DM, Roberts A and Thomas JE. 2014. First report of pospiviroids infecting ornamental plants in Australia: *Potato spindle tuber viroid* in *Solanum laxum* (synonym *S. jasminoides*) and *Citrus exocortis viroid* in *Petunia* spp. *New disease report* 29:3. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.003>
- Vidalakis G, Garnsey SM, Bash JA, Greer GD and Gumpf DJ. 2004. Efficacy of Bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease* 88: 1328-1334. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1328>
- Yang X, Hadidi A and Garnsey SM. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82:279-28. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n03\\_279.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n03_279.PDF)

# Distribution, life cycle and histological changes by *Heterodera* sp. in carrot in Puebla

## Distribución, ciclo de vida y alteraciones histológicas de *Heterodera* sp. en zanahoria, en Puebla

Ilia Mariana Escobar-Avila, María Gabriela Medina-Canales, Alejandro Tovar-Soto\*, Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Carpio s/n, Colonia Casco de Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, CDMX, C.P. 11340. \*Autor para correspondencia: alejandrotovars@hotmail.com.

Recibido: 30 de Junio, 2016.

Aceptado: 06 de Diciembre, 2016.

Escobar-Avila IM, Medina-Canales MG, Tovar-Soto A. 2017. Distribution, life cycle and histological changes by *Heterodera* sp. in carrot in Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 304-313.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-7.

Primera publicación DOI: 13 de febrero, 2017.

First DOI publication: February 13, 2017.

**Resumen.** En el 2009 se encontró en el Valle de Tepeaca, Puebla, un nematodo formador de quistes del género *Heterodera* asociado a zanahoria. A la fecha se desconoce la distribución en algunos municipios productores, su ciclo de vida y las alteraciones histológicas en las raíces de plantas infectadas. Durante 2008 a 2016 se muestrearon 28 parcelas con zanahoria de seis municipios del Valle de Tepeaca. Se separaron las raíces y en ellas se buscaron hembras blancas adheridas, del suelo se extrajeron los quistes. En invernadero se sembró zanahoria cv. Mexicana en suelo naturalmente infestado, las raíces se tiñeron con fucsina ácido-lactoglicerol

**Abstract.** In 2009, in the Tepeaca Valley, Puebla, it was found a cyst-forming nematode of the genus *Heterodera* associated with carrot. At this time, it is unknown the distribution in some producing municipalities, its life cycle and the histological changes on infected plant roots. Between 2008 and 2016, 28 carrot fields were sampled in six municipalities of the Tepeaca Valley. The roots were separated and white females were searched, the cysts were extracted from soil. Carrot cv. Mexicana were grown in naturally infested soil in the greenhouse, the roots were stained with fuchsine lacto glycerol acid to know the development time of each cycle phase. To describe the histological changes, the infected roots were imbibed in paraffin and sections stained with fast green-fuchsine for analysis. *Heterodera* sp. was found in 93 % of the plots and completed its cycle in 73 days at 20-25 °C. The histological alterations show the presence of feeding sites (syncytia) with dense and granular cytoplasm, with hypertrophied nuclei, dissolution and thickening of cell walls located mainly in the cortex and vascular cylinder. There was also the

para conocer el tiempo de desarrollo de cada fase del ciclo. Para describir las alteraciones en raíces infectadas, éstas se incluyeron en parafina con lo que se hicieron cortes, se tiñeron con fucsina-verde rápido para su análisis. *Heterodera* sp. se encontró en el 93 % de las parcelas y completó su ciclo en 73 días a 20-25 °C. Las alteraciones histológicas mostraron la presencia de sitios de alimentación (sincitios) con citoplasma denso y granuloso, con núcleos hipertrofiados, disolución y engrosamiento de paredes celulares, ubicados principalmente en la corteza y cilindro vascular. Además hubo presencia de zonas lignificadas con hiperplasia e hipertrofia.

**Palabras clave:** Histopatología, *Daucus carota* cv *mexicana*, nematodo formador de quistes, endoparásito sedentario.

El género *Heterodera* pertenece al grupo de los nematodos formadores de quistes (NFQ), se caracterizan por tener hembras obesas citriformes, que retienen los huevos dentro de su cuerpo, tras la muerte, su cutícula sufre cambios y se engrosa formando el quiste, que protege a los huevos de condiciones ambientales adversas, éste puede persistir viable en el suelo hasta 30 años (Siddiqi, 2000; Subbotin *et al.*, 2010; Manzanilla-López y Marbán-Mendoza, 2012). Este nematodo es de importancia económica para la agricultura debido a que ocasiona pérdidas en el rendimiento de los cultivos, estas pérdidas se deben a que induce sitios de alimentación conocidos como sincitios que alteran el sistema radicular de las plantas, esto limita la absorción de agua y nutrientes (Sharma, 1998; Subbotin *et al.*, 2010; Subbotin y Franco, 2012). Tovar-Soto *et al.* (2009, 2010) encontraron un NFQ del género *Heterodera* asociado al cultivo de zanahoria (*Daucus carota*) en la zona agrícola del Valle de Tepeaca, Puebla, conformada por varios

presence of lignificate areas with hyperplasia and hypertrophy.

**Key words:** Histopathology, *Daucus carota* cv *mexicana*, cyst-forming nematode, sedentary endoparasite.

The genus *Heterodera* belongs to the group of cyst-forming nematodes (CFN) and are distinguished for having lemon shaped females, which retain the eggs inside their bodies. After their death, the cuticle changes and thickens to form the cyst, which protects the eggs from hostile environmental conditions. It can remain viable in the soil for up to 30 years (Siddiqi, 2000; Subbotin *et al.*, 2010; Manzanilla-López and Marbán-Mendoza, 2012). This nematode is economically important for agriculture due to the losses it produces in crops, caused by the induction of feeding sites known as syncytia, which alter the radicle systems of plants, limiting the absorption of water and nutrients (Sharma, 1998; Subbotin *et al.*, 2010; Subbotin and Franco, 2012). Tovar-Soto *et al.* (2009, 2010) found a CFN of the genus *Heterodera* associated to carrot (*Daucus carota*) fields in the agricultural area of the Valley of Tepeaca, Puebla, composed of several farming municipalities (Lugo-Morín *et al.*, 2010). In 2014 Puebla was the second largest carrot producer in Mexico, with harvests of 27, 109 ton (SAGARPA, 2016). Although this nematode has been found in the area, its distribution in some carrot-producing municipalities is unknown, as is its life cycle and the histological alterations it induces in the roots; these data are crucial to establish control tactics. The aim was to estimate the distribution of the CFN *Heterodera* sp. in some carrot-producing municipalities in the Valley of Tepeaca, as well as to determine the time of development of the different phases of its life cycle and describe the

municipios productores (Lugo-Morín *et al.*, 2010). Para el 2014 Puebla ocupó el segundo lugar a nivel nacional como productor de zanahoria, con una cosecha de 27, 109 ton (SAGARPA, 2016). Aunque se ha detectado este nematodo en la zona, aún se desconoce la distribución que guarda en algunos municipios productores de zanahoria, también se desconoce su ciclo de vida y las alteraciones histológicas que induce en las raíces, datos indispensables para poder establecer tácticas de control. El objetivo consistió en estimar la distribución que tiene el NFQ *Heterodera* sp. en algunos municipios productores de zanahoria del Valle de Tepeaca; así como, determinar el tiempo de desarrollo de las diferentes fases del ciclo de vida y describir las alteraciones histológicas que induce en las raíces de esta hortaliza. Durante 2008-2016 se muestrearon 28 parcelas con zanahoria en los municipios de Acatzingo, Los Reyes de Juárez, Quecholac, San Nicolás Buenos Aires, San Salvador el Seco y Tepeaca. En cada parcela seleccionada se tomó aleatoriamente una muestra, conformada por 10 submuestras de suelo (200-250 g) y plantas (3-6) en diferente etapa fenológica, esto conformó la muestra representativa (2-2.5 kg de suelo y 30-60 plantas) (De la Jara-Alcocer *et al.*, 1994). De cada muestra, las plantas se separaron del suelo, las raíces se lavaron con agua, luego se pesaron 5 g y se colocaron en una caja Petri, en donde se observaron en un microscopio estereoscópico Motic para localizar hembras blancas adheridas a éstas. Los quistes se obtuvieron a partir de 200 cm<sup>3</sup> de suelo previamente secado de cada muestra, utilizando la técnica de flotación de Fenwick (De la Jara-Alcocer *et al.*, 1994). Los quistes separados en cada muestra se caracterizaron para observar forma, color y presencia de cono vulvar (n=20), luego se realizaron cortes para reconocer el tipo de fenestración (Subbotin *et al.*, 2010). Para determinar el tiempo de desarrollo de cada una de las fases del ciclo del nematodo

histological alterations it induces in the roots of this vegetable. Between 2008 and 2016, 28 carrot fields were sampled in the municipalities of Acatzingo, Los Reyes de Juárez, Quecholac, San Nicolás Buenos Aires, San Salvador el Seco, and Tepeaca. In each field chosen, one sample was taken at random, composed of 10 soil subsamples (200-250 g) and plants (3-6) in different phenological stages; this made up the representative sample (2-2.5 kg of soil and 30-60 plants) (De la Jara-Alcocer *et al.*, 1994). For each sample, the plants were separated from the soil, their roots were washed with water, 5 g were weighed and then placed in a Petri dish, where they were observed under a Motic stereoscopic microscope for the search of white females attached to them. The cysts were obtained from 200 cm<sup>3</sup> of soil previously dried using the Fenwick flotation technique (De la Jara-Alcocer *et al.*, 1994). The cysts separated in each sample were separated to observe shape, color and presence of vulvar cone (n=20). Then, cuts were made to recognize the type of fenestration (Subbotin *et al.*, 2010). In order to determine the time of development of each of the phases of the nematode cycle in the root, we set up an experiment in a greenhouse with 36 three-kilo bags with naturally infested soil from a carrot field in the municipality of Acatzingo. In each bag, we planted 10 seeds of carrot cv. Mexicana, which were kept at 20-25 °C. Ten days after germination (DAG), plants were removed from three bags, their roots were washed with water and stained with fuchsine lacto glycerol acid. Later, they were placed in a Petri dish to observe the phases of the nematode under a Motic stereoscopic microscope. Every seven days for 12 weeks, the same procedure was followed with the remaining bags (Byrd *et al.*, 1983). For the histopathological study, six styrofoam pots were set up with 1 kg of tinalized soil, and ten seeds of carrot cv. Mexicana were planted. Three of the pots were inoculated with eggs and



en la raíz, se montó en invernadero un experimento con 36 bolsas de plástico de tres kg con suelo naturalmente infestado, procedente de un campo de zanahoria del municipio de Acatzingo. En cada bolsa se sembraron 10 semillas de zanahoria cv. Mexicana, mismas que se mantuvieron a 20-25 °C. Diez días posteriores a la germinación (DPG), se sacaron las plantas de tres bolsas, sus raíces se lavaron con agua y se tiñeron con fucsina ácido-lactoglicerol, posteriormente se colocaron en una caja Petri para observar las fases del nematodo con ayuda de un microscopio estereoscópico Motic. Cada siete días durante 12 semanas se siguió el mismo procedimiento con las bolsas restantes (Byrd *et al.*, 1983). Para el estudio histopatológico, se pusieron seis macetas de unicel con 1 kg de suelo tinalizado, en cada una se sembraron 10 semillas de zanahoria cv. Mexicana. Tres de las macetas se inocularon con huevos y juveniles del segundo estadio (J2) del nematodo, las otras tres se dejaron sin inocular (testigos). Las macetas se dejaron durante 60 días en el invernadero a 20-25 °C; después de ese tiempo, las plantas fueron sacadas de las macetas, sus raíces se lavaron, luego, se fijaron con una mezcla de etanol-formol-ácido acético (FAA) en donde se dejaron por 48 h. En seguida se cortaron en trozos de 1-3 mm, se deshidrataron en etanol a diferentes concentraciones (70, 80, 90, 96 y 100 %), en donde se dejaron 15 min para cada concentración. Luego, se transparentaron con etanol absoluto-xilol y xilol 15 min en cada uno. Posteriormente se incluyeron en parafinas con diferentes puntos de fusión (52-54, 54-56 y 56-58 °C) (Carvajal-Sandoval, 1996). Una vez incluido el material, se realizaron cortes seriados de 10 µm de espesor en el plano longitudinal y transversal con ayuda de un micrótopo de rotación marca Reichert. Los cortes se montaron en portaobjetos mediante un baño de flotación en una mezcla con agua y gelatina. Por último, los cortes se desparafinaron con xilol y etanol absoluto-xilol

juveniles from stage 2 (J2) of the nematode, and the other three were left without inoculating (controls). The pots were left for 60 days in the greenhouse at 20-25 °C; after this time, the plants were removed from their pots, their roots were washed, and they were fixated with a mixture of ethanol-formaldehyde-acetic acid (FAA), where they were kept for 48 h. Straight afterwards, they were cut into 1-3 mm pieces, dehydrated in ethanol at different concentrations (70, 80, 90, 96 and 100 %), where they were kept for 15 min for each concentration. They were then made transparent using absolute ethanol-xylol and xylol 15 min in each. Later, they were included in paraffins with different melting points (52-54, 54-56 and 56-58°C) (Carvajal-Sandoval, 1996). Once the material was included, serial cuts 10 µm thick were made longitudinally and transversally with a Reichert rotary microtome. The cuts were mounted onto a microscope slide with a flotation bath in a mixture of water and gelatin. Next, the cuts were dewaxed with xylol and absolute ethanol-xylol for 5 minutes in each and then passed through ethanol at different concentrations (100, 96 and 70 %) for 15 min each. Finally, they were rinsed for 10 minutes in distilled water, stained with fast green-fuchsine, dehydrated with 2 changes of absolute ethanol-xylol for 15 minutes each, and mounted with synthetic resin for their analysis (Carvajal-Sandoval, 1996).

The carrot roots from 17 fields sampled (61 %) showed white, pearly, lemon-shaped females attached, with vulvar cone, and a prominent gelatinous matrix in which they hold part of the eggs (egg sac), indicating that carrot is a good host in which they complete their life cycles (Figure 1A and D). Young cysts were also found in roots; a high percentage displayed the gelatinous matrix mentioned above in females; these were also lemon-shaped and with a vulvar cone. Cysts were also found in soil in 93 % of the fields studied, the population

por 5 min en cada uno y después se pasaron a etanol a diferentes concentraciones (100, 96 y 70 %) 15 min cada uno. Finalmente se enjuagaron por 10 min en agua destilada, se tiñeron con fucsina-verde rápido, se deshidrataron con dos cambios de etanol absoluto y etanol absoluto-xilol durante 15 min cada uno y se montaron con resina sintética para su análisis (Carvajal-Sandoval, 1996).

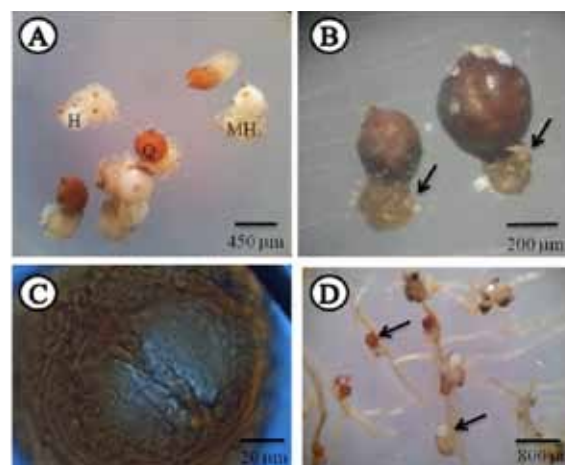
Las raíces de zanahoria de 17 parcelas muestreadas (61 %) mostraron hembras blancas adheridas, aperladas citriformes, con presencia de cono vulvar y una matriz gelatinosa prominente en donde retienen parte de los huevos, lo que indica que la zanahoria es un buen hospedante en donde completa su ciclo de vida (Figura 1A y D). También en raíces se encontraron quistes jóvenes adheridos, un alto porcentaje mostró la matriz gelatinosa antes referida en hembras; éstos también fueron citriformes y con cono vulvar. Además, se obtuvieron quistes a partir de suelo en el 93 % de las parcelas estudiadas, cuya densidad poblacional osciló de 3 a 1391 quistes en 200 cm<sup>3</sup> de suelo (Cuadro 1) (Figura 1A, B y D). Al efectuar cortes a nivel del cono vulvar, aparece un puente con ambifenestras (Figura 1C), con estos criterios se confirmó que la población encontrada en las parcelas muestreadas con zanahoria en la zona de estudio corresponde al género *Heterodera* (Sharma, 1998; Subbotin *et al.*, 2010).

En el ciclo de vida, los J2 aparecieron dentro de las raíces laterales 10 DPG; así mismo, a los 24 y 38 DPG aparecieron los estadios J3 y J4, respectivamente (Figura 2). Por su parte, los machos se observaron en las raíces dentro de una exuvia a los 52 y hasta los 59 DPG; las hembras adultas se observaron adheridas a las raíces a partir del día 59 y hasta el día 66. Los primeros quistes adheridos a las raíces se identificaron por su color café claro, a los 73 y hasta los 94 DPG (Figura 2).

El estudio histopatológico mostró en los cortes trasversales de raíces infectadas sitios de alimen-

density of which ranged from 3 to 1391 cysts in 200 cm<sup>3</sup> of soil (Table1) (Figure 1A, B and D). When cutting at the level of the vulvar cone, an ambifenestra appears (Figure 1C); with these criteria we confirmed that the population found in the fields sampled with carrots in the area studied belong to the genus *Heterodera* (Sharma, 1998; Subbotin *et al.*, 2010).

In the life cycle, the J2 appeared inside the lateral roots 10 DAG; likewise, at 24 and 38 DAG, stages J3 y J4 appeared, respectively (Figure 2). On the other hand, the males were observed on the roots inside an exuvia at 52 and up to 59 DAG;



**Figura 1.** Quistes y hembras blancas de *Heterodera* sp. A) Hembras y quistes con masas de huevos. B) Quistes de diferente tamaño. Las flechas señalan las masas de huevos. C) Corte de un quiste a nivel del cono vulvar donde se observa la ambifenestra y el puente. D) Raíces de zanahoria con hembras y quistes adheridos con masas de huevos. H= Hembra, Q= Quiste, MH= Masa de huevos, P= Puente.

**Figure 1.** Cysts and white females of *Heterodera* sp. A) Females and cysts with egg sacs. B) Different sized cysts. Arrows indicate the egg sac. C) Cut of a cyst at the level of the vulvar cone showing the ambifenestra and the bridge. D) Carrot roots with females and cysts attached with egg sacs. H= Female, Q= Cyst, MH= Egg Sacs, P= Bridge.

**Cuadro 1. Número de quistes de *Heterodera* sp. por 200 cm<sup>3</sup> de suelo de parcelas en la zona de estudio y presencia o ausencia de hembras blancas adheridas a las raíces de zanahoria.****Table 1. Number of *Heterodera* sp. cysts per 200 cm<sup>3</sup> of field soil in the area under study and presence or absence of white females attached to carrot roots.**

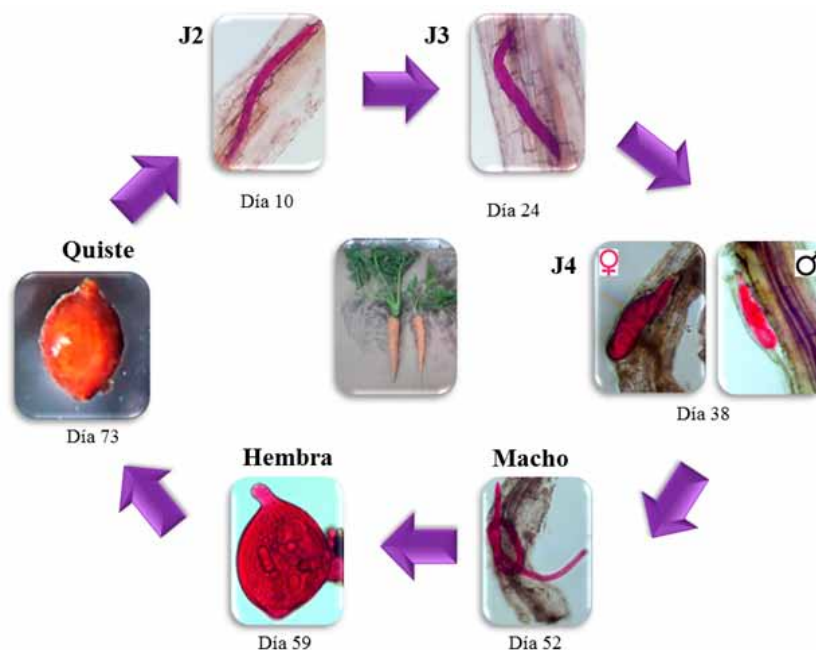
| Localidad, Municipio                           | Georreferenciación                   | Quistes/200 cc de suelo | Hembras/5 g de raíz |
|--|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Santiago Acozac, Los Reyes de Juárez           | N:18°58.534; O:97°47.855; 1900 msnm  | 41                      | Si                  |
| San Mateo Parras, Los Reyes de Juárez          | N:18°97.637; O:97°79.993; 2200 msnm  | 93                      | Si                  |
| San Mateo Parras, Los Reyes de Juárez          | N:18°58.549; O:97°47.878; 1900 msnm  | 24                      | Si                  |
| San Mateo Parras, Los Reyes de Juárez          | N:18°97.526; O:97°79.996; 2153 msnm  | 18                      | Si                  |
| San Mateo, Los Reyes de Juárez                 | N:18°92.176; O:97°64.372; 2180 msnm  | 52                      | Si                  |
| San Mateo, Los Reyes de Juárez                 | N:18°96.597; O:97°78.930; 2153 msnm  | 35                      | Si                  |
| San Cristóbal de los Nava, Los Reyes de Juárez | N:18°59.76; O:97°49.499; 2236 msnm   | 11                      | No                  |
| El Cristo, Acatzingo                           | N:18°98.714; O:97°82.680; 2292 msnm  | 1391                    | Si                  |
| San José Buena Vista, San Salvador el Seco     | *                                    | 3                       | No                  |
| Buena Vista, San Nicolás Buenos Aires          | N:18°99.164; O:97°85.459; 2238 msnm  | 3                       | No                  |
| Rancho las Moras, San Nicolás Buenos Aires     | N:18°97.244; O:97°81.997; 2213 msnm  | 14                      | No                  |
| PalmaritoTusuapan, Quecholac                   | N:18°58.52; O:97°50.43; 2241msnm     | 45                      | Si                  |
| El Cristo, Acatzingo                           | N:18°58.512; O:97°50.43; 2241msnm    | 70                      | No                  |
| Santiaguito, Los Reyes de Juárez               | N: 18°59.041; O:97°50.551; 2254 msnm | 182                     | No                  |
| Santiaguito, Los Reyes de Juárez               | N: 18°59.013; O:97°51.051; 2247msnm  | 8                       | No                  |
| El Cristo, Acatzingo                           | N:18°58.464; O:97°50.479; 2241msnm   | 34                      | Si                  |
| Santa María Actipa, Acatzingo                  | N:18°58.486; O:97°50.295; 2246 msnm  | 113                     | Si                  |
| El Cristo, Acatzingo                           | N:18°98.043; O:97°84.102; 2246 msnm  | 60                      | Si                  |
| San Cristóbal de los Nava, Los Reyes de Juárez | N:18°97.739; O:97°85.407; 2236 msnm  | 26                      | No                  |
| Santa María Actipa, Acatzingo                  | N:18°92.18; O:97°64.365; 2200 msnm   | 74                      | Si                  |
| San Juan Acozac, Los Reyes de Juárez           | N:18°92.685; O:97°64.500; 2134 msnm  | 0                       | No                  |
| PalmaritoTusuapan, Quecholac                   | N:18°92.515; O:97°64.415; 2135 msnm  | 4                       | Si                  |
| PalmaritoTusuapan, Quecholac                   | N:18°92.266; O:97°64.44; 2135 msnm   | 53                      | Si                  |
| PalmaritoTusuapan, Quecholac                   | N:19°25.315; O:97°53.177; 2232 msnm  | 38                      | Si                  |
| San Juan Acozac, Los Reyes de Juárez           | N:19°25.315; O:97°53.177; 2200 msnm  | 0                       | No                  |
| San Mateo Parra, Tepeaca                       | N:18°99.108; O:97°85.564; 2252 msnm  | 3                       | No                  |
| San Juan Acozac, Los Reyes de Juárez           | N:18°99.796; O:97°87.288; 2254 msnm  | 54                      | Si                  |
| San Mateo Parra, Tepeaca                       | N:19°24; O:97°52 2392 msnm           | 27                      | Si                  |

\*Los datos de georreferenciación no fueron tomados / Georeferentiation data were not taken.

tación conocidos como sincitios ubicados principalmente en el cilindro vascular, ocasionando desplazamiento de los vasos del xilema y del floema (Figura 3C, D y F), en donde se observó engrosamiento y disolución de paredes celulares, con citoplasma denso, granuloso y vacuolado (Figura 3C, D y F). También hubo hiperplasia, y presencia de núcleos hipertrofiados (Figura 3E). Además fue notoria la presencia de zonas lignificadas (Figura 3C,

female adults were observed attached to the roots starting on day 66. The first cysts attached to the roots were identified by their light brown color, at 73 and up to 94 DAG (Figure 2).

The histopathological study showed, in the transversal cuts of infected roots, feeding sites known as syncytia, located mainly in the vascular cylinder, causing the displacement of the xylem and phloem vessels (Figure 3C, D and F), where thic-



**Figura 2.** Fases de desarrollo del ciclo de vida del nematodo formador de quistes *Heterodera* sp. en las raíces de zanahoria cv. Mexicana bajo condiciones de invernadero. Véase las diferentes fases y los tiempos en que aparecieron en la raíz.

**Figure 2.** Life cycle phases of development of the cyst forming nematode *Heterodera* sp. in carrot cv. Mexicana roots under greenhouse conditions. Notice the different phases and the times that appeared in the root.

E y F). Estos cambios celulares los induce el nematodo para poder alimentarse (Endo, 1971). Todos estos cambios han sido documentados en diferentes especies del género *Heterodera* en diferentes cultivos (Endo, 1971; Sasanelli y Vovlas, 2013; Barrot, 2016). Esto contrasta con los cortes de raíces de tejido sano (testigos) en el plano longitudinal y transversal en donde no se observaron alteraciones (Figura 3A y B).

## CONCLUSIONES

*Heterodera* sp. se encontró en el 93 % de las parcelas muestreadas y completó su ciclo de vida

kening and dissolution of cell walls were observed, with dense, granular and vacuolated cytoplasm (Figure 3C, D and F). There was also hyperplasia, and the presence of hypertrophied nuclei (Figure 3E). Also notorious was the presence of lignified areas (Figure 3C, E and F). These cellular changes are induced by the nematode to be able to feed (Endo, 1971). All these changes have been documented in different species of the genus *Heterodera* in different crops (Endo, 1971; Sasanelli and Vovlas, 2013; Barrot, 2016). This contrasts with the cuts in roots with healthy tissue (control) in the longitudinal and transversal plane, where no alterations were found (Figure 3A and B).

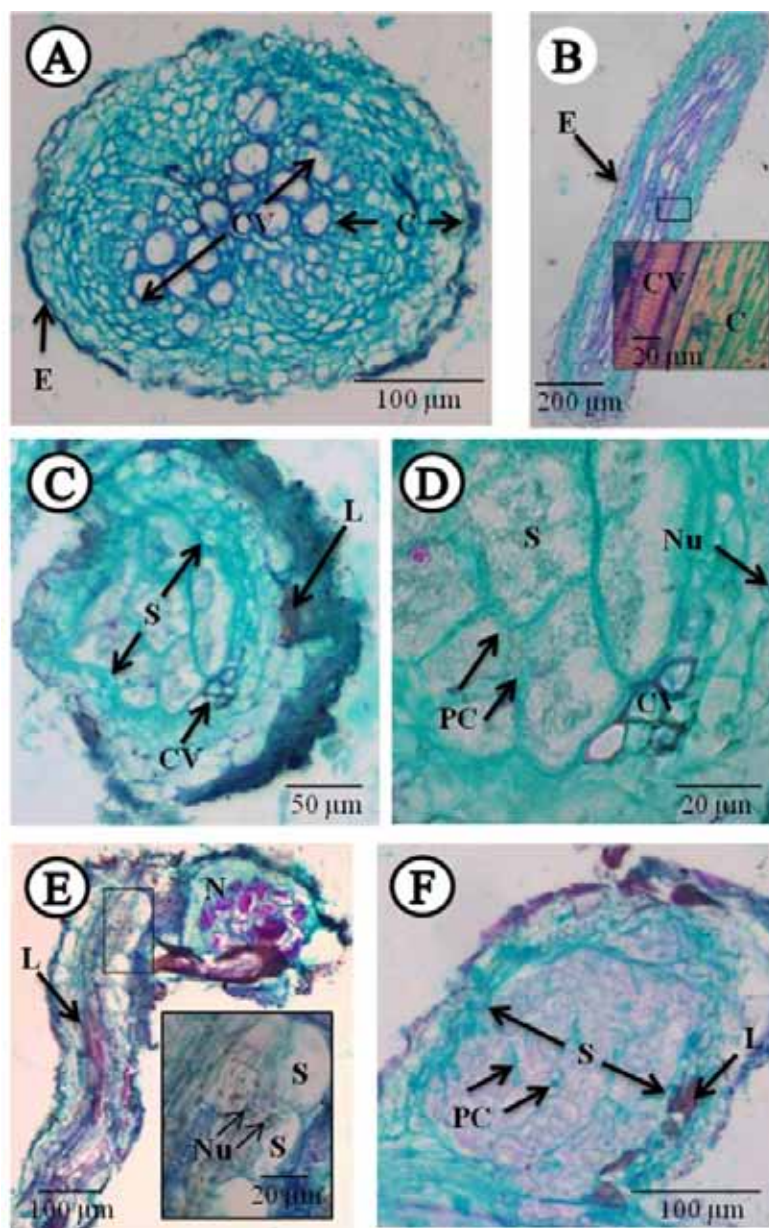


Figura 3. Cortes al micrótopo en los planos trasversal y longitudinal de las raíces de zanahoria sanas e infectadas con el nematodo formador de quistes *Heterodera* sp., teñidas con fucsina-verde rápido. A) Corte trasversal de raíz sana (testigo). B) Corte longitudinal de raíz sana (testigo). C-D) Cortes trasversales de la raíz infectada por el nematodo. E- F) Cortes longitudinales de la raíz parasitada con el nematodo. C= Corteza, CV= Cilindro vascular, E= epidermis, L= Lignificación, N= Nematodo, Nu= Núcleo, PC= Pared celular, S= Sincitio.

Figure 3. Longitudinal and transversal cuts to the microtome in healthy and infected carrot roots with the cyst-forming nematode *Heterodera* sp., stained with fast green-fuchsine. A) Transversal cut of healthy root (control). B) Longitudinal cut of healthy root (control). C-D) Transversal cuts of root infected by the nematode. E- F) Longitudinal cut of root with nematode parasite. C= Cortex, CV= Vascular cylinder, E= epidermis, L= Lignification, N= Nematode, Nu= Nucleus, PC= Cell wall, S= Syncytium.

en el invernadero en 73 días a 20-25 °C. Las alteraciones histológicas mostraron la presencia de sitios de alimentación (sincitios) ubicados principalmente en la corteza y cilindro vascular, con citoplasma denso y granuloso, núcleos hipertrofiados, disolución y engrosamiento de paredes celulares. Además hubo presencia de zonas lignificadas con hiperplasia e hipertrofia.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo muestra los resultados de la tesis de maestría del primer autor, quien agradece al CONACYT por haber otorgado una beca para la realización de los estudios de posgrado, así mismo agradece al sistema BEIFI-IPN por el apoyo económico brindado.

#### LITERATURA CITADA

- Byrd DW, Kirkpatrick T and Barker KR. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15: 142-143. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/pdf/142.pdf>
- Barrot L. Resistance to *Heterodera carotae* and methods for use. FR., WO2016166262 A1, 20 de Octubre de 2016. PCT/EP2016/058304, 15 Abr 2016. Disponible en línea: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016166262&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>
- Carvajal-Sandoval A. 1996. Manual de Histología Vegetal. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 42 p.
- De la Jara-Alcocer F, Zeron-Bravo F, Torres-Coronel R y Tovar-Soto A. 1994. Manual de Prácticas de Nematología Agrícola. 2ª Edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D. F., México. 107 p.
- Endo B.Y. 1971. Nematode-induced syncytia (Giant cells). Host-parasite relationships of Heteroderidae. pp. 91-117. *In*: Zuckerman BM, Mai WF and Rohde RA (eds.). Plant Parasitic Nematodes. II. Cytogenetics, Host-parasite Interactions, and Physiology. Academic Press. New York, USA. 347 p.
- Lugo-Morín DR, Ramírez-Juárez J, Méndez-Espinoza JA y Peña-Olvera B. 2010. Redes sociales asimétricas en el sistema hortícola del Valle de Tepeaca, México. *Economía, Sociedad y Territorio* 10: 207-230. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11112509008>

#### CONCLUSIONS

*Heterodera* sp. was found in 93 % of the fields sampled and completed its life cycle in the greenhouse in 73 days at 20-25 °C. Histological alterations showed the presence of feeding sites (syncytia) located mainly in the cortex and vascular cylinder, with dense and granular cytoplasm, and hypertrophied nuclei, dissolution and thickening of cell walls. There were also lignified areas with hyperplasia and hypertrophy.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This paper shows the results of the Master's degree thesis by the first author, who would like to thank CONACYT for the scholarship granted to carry out his Graduate studies, as well as the BEIFI-IPN system for the economic support provided.

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

- Manzanilla-López RH and Marbán-Mendoza N. 2012. Practical Plant Nematology. Biblioteca básica de Agricultura. México. 881 p.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/) (consulta, marzo 2016).
- Sassaneli N and Vovlas N. 2013. Pathogenicity and Host Parasite Relationships of *Heterodera cruciferae* in Cabbage. *Plant Disease*. 97(3):333-338. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0699-RE>
- Sharma SB. 1998. The Cyst Nematodes. Springer Science & Business Media. Great Britain, UK. 452 p.
- Siddiqi MR. 2000. Tylenchida: Parasites of Plants and Insects. Second Edition. CAB International, Wallingford, U.K. 835 p.
- Subbotin SA, Mundo-Ocampo M, and Baldwin JG. 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). 8A. Nematology monographs and perspectives. Netherlands. 351 p.
- Subbotin SA and Franco J. 2012. Cyst nematodes. pp. 299-357. *In*: Manzanilla-López R.H., and Marbán-Mendoza

- N. (eds.). Practical Plant Nematology. Colegio de Postgraduados, México. Biblioteca básica de Agricultura. México. 881 p.
- Tovar-Soto A, Hernández-López JM y Torres-Coronel R. 2009. Nematodos Formadores de Quistes en la Zona Hortícola del Estado de Puebla. XI Congreso Internacional/XXXVI Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Acapulco, Gro., México. 4 p.
- Tovar-Soto A, Medina-Canales MG y Torres-Coronel R. 2010. Nematodos Fitoparásitos Asociados a Hortalizas en el Valle de Tepeaca, Puebla, México. XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Mérida, Yuc. México. 4 p.

# Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## Comparación de enzimas y compuesto fenólicos en tres especies de cítricos infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**Lidia Monserrat Flores-Torres, Alberto Flores-Olivas\*, Yisa María Ochoa-Fuentes.** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **J. Isabel López-Arroyo,** Campo Experimental INIFAP, Carretera Montemorelos-China Km. 31, Colonia Ex Hacienda Las Anacuas General Terán C.P. 67413, General Terán Nuevo León; **Víctor Olalde-Portugal,** Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte carretera. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, CP 36821, México; **Adalberto Benavides-Mendoza,** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **Susana González-Morales,** CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315; **Víctor Manuel Zamora-Villa,** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315. \*Autor para correspondencia: lidiaf2004@yahoo.com.mx, aflooli@uaaan.mx.

**Recibido:** 04 de septiembre, 2016. **Aceptado:** 13 de enero, 2017.

Flores-Torres LM, Flores-Olivas A, Ochoa-Fuentes YM, López-Arroyo JI, Olalde-Portugal V, Benavides-Mendoza A, González-Morales S, Zamora-Villa VM. 2017. Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 314-325.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1608-2

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

**Resumen.** El objetivo fue determinar diferencias en la actividad enzimática antioxidante y la concentración de fenoles totales en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka); y naranja dulce

**Abstract.** The objective was to determine differences in antioxidant enzyme activity and total phenol concentration in Mexican lime plants (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka); and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Infected under natural field conditions with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*CaLas*), in Bustamante, Tamaulipas, Mexico. The presence of *CaLas* was determined by qPCR. We determined the enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), which is activated by pathogen attack; the peroxidase involved in wall lignification in response to infection; the  $\alpha$ -amylase which degrades starch and accumulates in vascular tissue; and phenolic compounds involved in defense functions. A contrasts analysis was performed. Total protein concentration showed significant differences



Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), infectadas bajo condiciones naturales de campo con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), en Bustamante, Tamaulipas, México. Se determinó la presencia de CaLas por qPCR; la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL), que se activa ante el ataque de patógenos; peroxidasa que interviene en la lignificación de paredes como respuesta a la infección;  $\alpha$ -amilasa que degrada el almidón y se acumula en el tejido vascular, y compuestos fenólicos que cumplen funciones de defensa. Se realizó un análisis de contrastes. La concentración de proteínas totales mostró diferencias significativas entre especies ( $P < 0.0001$ ). Con una media de 6.1 y 6.37 mg de proteínas por g de tejido fresco para árboles infectados de limón mexicano; y naranja dulce negativa a CaLas. La actividad peroxidasa presentó diferencia significativa para limón persa ( $P = 0.0341$ ), con una media de 1.96 U·mg de proteína<sup>-1</sup>. En naranja dulce se observó mayor actividad de  $\alpha$  amilasa en los árboles infectados por CaLas (1.19 U·mg de proteína<sup>-1</sup>). La concentración de PAL y fenoles totales no mostraron diferencias significativas entre especies. En el presente estudio se observó que CaLas influye en la actividad enzimática de cítricos.

**Palabras clave:** Huanglongbing, Fenilalanina amonio liasa, peroxidasa,  $\alpha$ -amilasa, proteínas totales, fenoles totales.

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), afecta las zonas productoras de cítricos en México (DGSV-SENASICA y Mora-Aguilera, 2012); reduce 18.6 % el volumen de jugo y 17.3 % el peso de fruto de limón persa en Yucatán, México; lo que provoca pérdidas de producción de 2.4 tha<sup>-1</sup> (Flores-Sánchez, *et al.*, 2015). La infección inducida por HLB, altera la exportación de fotoasimilados,

between species ( $P < 0.0001$ ). With a mean of 6.1 and 6.37 mg of protein per g of fresh tissue for infected Mexican lime trees, and sweet orange negative CaLas. The peroxidase activity presented a significant difference for Persian lime ( $P = 0.0341$ ), with a mean of 1.96 U·mg of protein<sup>-1</sup>. In sweet orange, higher  $\alpha$ -amylase activity was observed in CaLas infected trees (1.19 U·mg protein<sup>-1</sup>). The concentration of PAL and total phenols did not show significant differences between species. In the present study it was observed that CaLas influences the enzymatic activity of *Citrus* species.

**Key words:** Huanglongbing, Phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, alpha amylase, total proteins, total phenols.

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas), affects the citrus-producing areas in Mexico (DGSV-SENASICA and Mora-Aguilera, 2012); it reduces by 18.6 % the volume of juice and by 17.3 % the weight of fruits in Persian lime in Yucatan, Mexico, causing losses in production of 2.4 tha<sup>-1</sup> (Flores-Sánchez, *et al.*, 2015). The infection induced by HLB alters the export of photoassimilates caused by the retention of starch, which generates the expression of symptoms in the tree (Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

CaLas causes biochemical and structural changes in citrus plants to prevent the spread of the bacteria, by activating response proteins (Albrecht and Bowman, 2008). In response to the infection of citrus plants with HLB, carbohydrate metabolism involving  $\alpha$ -amylase is altered (Albrecht and Bowman, 2008; Etxeberria *et al.*, 2009).

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) intervenes in response to the attack of the pathogens (Almarino *et al.*, 1994). In citrics, the flavedo has the ability to respond to attacks by pathogens, by the increase of

provocada por la retención de almidón, lo que genera la expresión de síntomas en el árbol (Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

*CaLas* provoca cambios bioquímicos y estructurales en plantas de cítricos para evitar la diseminación de la bacteria, mediante la activación de proteínas de respuesta (Albrecht y Bowman, 2008). Como respuesta a la infección de plantas de cítricos con HLB, el metabolismo de carbohidratos en el que interviene la  $\alpha$  amilasa, es alterado (Albrecht y Bowman, 2008; Etxeberria *et al.*, 2009).

La fenilalanina amonio-liasa (PAL) interviene en respuesta al ataque de patógenos (Almarino *et al.*, 1994). En cítricos, se ha observado que el flavedo posee la capacidad de responder al ataque por patógenos, mediante el aumento de los niveles de transcrito de la PAL así como de su actividad (Ballester *et al.*, 2006). La enzima peroxidasa (POD) protege a las plantas del daño causado por radicales libres o ROS generados por diferentes tipos de estrés, participa también en la lignificación de la pared celular y en la degradación del ácido indolacético (Robinson, 1991). Se ha demostrado que los fenoles poseen una función importante en la defensa de las plantas frente a distintos factores bióticos y abióticos (Lu *et al.*, 2015). Éstas se pueden modificar por efectores que secretan las bacterias *Ca. Liberibacter* dentro del hospedante y que alteran genes relacionados con la defensa; *CaLas* codifica salicilato hidroxilasa como mecanismo para evadir la defensa de las plantas (Aritua *et al.*, 2013). Mora-Aguilera *et al.*, 2014, señalan que el manejo del HLB debe considerar la susceptibilidad de las especies de cítricos y la carga del inóculo. Entender el comportamiento enzimático de árboles infectados con *CaLas* en diferentes especies permitiría desarrollar alternativas para la protección o defensa de la planta. El estudio se desarrolló con el objetivo de determinar diferencias en la actividad enzimática antioxidante y concentración de fenoles

the PAL transcript levels, as well as of its activity (Ballester *et al.*, 2006). The enzyme peroxidase (POD) protects plants from the damage caused by the free radicals or ROS generated by different types of stress and also participates in the lignification of the cell wall and in the degeneration of indolacetic acid (Robinson, 1991). Phenols have proven to play an important part in the defense of plants to different biotic and abiotic factors (Lu *et al.*, 2015). They can be modified by effectors secreted by the bacteria *Ca. Liberibacter* inside the host, and that alter genes related to defense; *CaLas* codifies salicylate hydroxylase as a mechanism to evade the plants defenses (Aritua *et al.*, 2013). Mora-Aguilera *et al.*, 2014, indicate that HLB control must consider the vulnerability of the citrus species and the load of the inoculant. Understanding the enzymatic behavior of trees infected with *CaLas* in different species could help develop alternatives for the protection or defense of the plant. This study was developed with the objective of determining differences in the antioxidant enzyme activity and the concentration of phenols in three citrus species in Bustamante, Tamaulipas, Mexico.

Samples were taken in Felipe Angeles, Bustamante, Tamaulipas, Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) and sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) aged 10 to 12 years were sampled under rainfed conditions, in the phenological stage of fruit set. Samples were taken from two trees with symptoms per species, and one without symptoms. The material was gathered in each one of the cardinal points of the tree (north, south, east, and west), three repetitions of five leaves were taken from each point and kept in liquid nitrogen.

For DNA extraction, the technique quoted by Almeyda-León *et al.* (2001) was modified for its use: 100 mg of tissue were ground in

en tres especies de cítricos en Bustamante, Tamaulipas, México.

Las muestras se recolectaron en Felipe Ángeles, Bustamante, Tamaulipas. Se realizó un muestreo dirigido hacia árboles de 10 a 12 años de edad de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka); y naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), bajo condiciones de temporal, en la etapa fenológica de amarre de fruto. Se tomaron muestras de dos árboles con síntomas por especie y uno sin síntomas. El material se recolectó en cada uno de los puntos cardinales del árbol (norte, sur, este y oeste), se tomaron tres repeticiones de cinco hojas por punto; y se conservaron en nitrógeno líquido.

Para la extracción de ADN se usó la técnica citada por Almeyda-León *et al.* (2001) modificada: se trituraron 100 mg de tejido en nitrógeno líquido, se adicionó 1 mL de solución de extracción 2 ME/CTAB precalentado a 65 °C. Se mezcló en vortex por 30 seg y se incubó a 65 °C por 45 min. Se agregó 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se agitó la mezcla por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se repitió ciclo de centrifugado. Se recuperó la fase superior y se añadió 0.6 volumen de isopropanol para precipitar el ADN a -20 °C durante 24 h. Se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min, se lavó la pastilla con etanol al 70 %, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µL de agua inyectable (Pisa). La presencia de la bacteria se determinó de acuerdo al protocolo de SENASICA-SAGARPA, (2010), usado en la Estación Nacional de Epidemiología y Saneamiento Vegetal (SENASICA-ENECUSaV); en el estado de Querétaro, México.

El extracto crudo para cuantificación de proteínas totales, fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y  $\alpha$ -amilasa, se tomó de Díaz *et al.* (2010), modificado:

liquid nitrogen, 1 mL was added of 2 ME/CTAB extraction solution, preheated at 65 °C. It was mixed in a vortex for 30 sec and incubated at 65 °C for 45 min. Next, 500 µL of isoamyl alcohol chloroform was added 24:1, the mixture was stirred inversely and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was extracted and an equal volume of isoamyl alcohol chloroform was added 24:1; the centrifuge cycle was repeated. The top layer was taken and 0.6 volume of isopropanol was added to precipitate the DNA at -20 °C for 24 h. It was centrifuged at 12,000 rpm for 20 min, the pellet was washed with ethanol at 70 %, centrifuged at 12,000 rpm for 15 min, left to dry and resuspended in 50 µL injectable water (Pisa). The presence of bacteria was determined according to the protocol by SENASICA-SAGARPA, (2010) used in the National Plant Epidemiology and Health Station (SENASICA-ENECUSaV), in the state of Querétaro, Mexico.

The raw extract for the quantification of total proteins, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, and  $\alpha$ -amylase, was taken from Díaz *et al.* (2010), and modified: 1 g of grinded sample was placed in liquid nitrogen, in a sodium phosphate buffer solution 100 mM, pH 7. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 minutes at a temperature of 4 °C; later, the supernatant was collected and stored at -20 °C. For the extraction of phenols, methodology B, used by Kähkönen *et al.* (1999) was used here with some modifications; 250 mg of the grinded sample were placed in a 2 mL eppendorf tube and 1 mL of methanol at 80 % was added; it was shaken in a vortex for one minute and centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. The supernatant was collected in a 1.5 mL amber eppendorf tube. It was re-extracted with 500 µL of absolute methanol, repeating the process and stored at -20 °C until use.

Protein concentration was determined according to the technique by Bradford (1976), which

se colocó 1 g de muestra macerada en nitrógeno líquido, en una solución tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C, posteriormente se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. Para la extracción de fenoles se utilizó la metodología B usada por Kähkönen *et al.* (1999) con algunas modificaciones; se colocaron 250 mg de la muestra macerada en un tubo eppendorf de 2 mL y se agregó 1 mL de metanol al 80 %, se agitó en vortex por un minuto, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf ámbar de 1.5 mL. Se re extrajo con 500 µL de metanol absoluto, repitiendo el proceso; y se conservó a -20 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó según la técnica de Bradford (1976), la cual consistió en mezclar 1 mL de reactivo de Bradford con 100 µL de extracto crudo. Los valores de absorbancia de proteínas totales se determinaron a una  $\lambda=595$  nm en un thermo spectronic Biomate 3. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas por mg de tejido fresco. La curva patrón se obtuvo con albúmina de suero bovino según García y Vázquez (1998).

La determinación de la actividad fenilalanina amonio-liasas (PAL) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006). Se usó como referencia el coeficiente de extinción molar de  $0.0174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para calcular la actividad enzimática (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

La actividad peroxidasa se determinó mediante la metodología usada por Ruttimann *et al.*, (1992). La actividad de la enzima se expresó como milimoles de rojo de fenol oxidado por gramo de tejido fresco por minuto (Yedidia *et al.*, 1999).

Para la cuantificación de  $\alpha$  amilasa se utilizó el protocolo de SIGMA-ALDRICH, (2015). La curva patrón se realizó con varias concentraciones de

consistió en mixing 1 mL of Bradford reagent with 100 µL of raw extract. The total protein absorbance values were determined at a  $\lambda=595$  nm in a thermo spectronic Biomate 3. The protein content was expressed in mg of protein per mg of fresh tissue. The pattern curve was obtained with the albumen of cow serum, as per García and Vázquez (1998).

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity was determined according to the technique described by Rodríguez-Pedroso *et al.*, (2006). The  $0.0174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  molar extinction coefficient was used as a reference to calculate enzyme activity (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

Peroxidase activity was determined using the methodology used by Ruttimann *et al.*, (1992). Enzyme activity was expressed as millimoles of phenol red oxidized per gram of fresh tissue per minute (Yedidia *et al.*, 1999).

For the quantification of  $\alpha$  amylase, we used the SIGMA-ALDRICH protocol, (2015). The standard curve was produced with various concentrations of maltose. The  $\alpha$  amylase activity was defined as  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  of maltose released per  $\mu\text{g}$  of protein (Menéndez *et al.*, 2006).

The content of phenols was determined with the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.*, 1999). A mixture was prepared using 200 µL of the methanolic extract, 100 µL Folin-Ciocalteu reagent, and 200 µL of sodium carbonate at 20 %. It was shaken and left to rest for 30 min. After this time, total phenol absorbance was measured at one  $\lambda=760$  nm. A standard curve was produced with various concentrations of gallic acid.

The SAS 9.0 statistical package was used to perform an analysis of contrasts between the trees with positive and negative diagnoses for CaLas. The variables analyzed were: total proteins, PAL, POD,  $\alpha$ -amylase, and total phenols.

The sampled trees with symptoms displayed a general yellowness of the canopy and they appeared

maltosa. La actividad  $\alpha$  amilasa se definió como  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de maltosa liberados por  $\mu\text{g}$  de proteína (Menéndez *et al.*, 2006).

El contenido de fenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Se preparó una mezcla con 200  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico, 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu; y 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó y se dejó reposar durante 30 min. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de fenoles totales a una  $\lambda=760$  nm. Se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de ácido gálico.

Se utilizó el programa estadístico SAS ver. 9.0 para realizar un análisis de contrastes entre los árboles con diagnóstico positivo y negativo a *CaLas*. Las variables analizadas fueron: proteínas totales, PAL, POD,  $\alpha$ -amilasa; y fenoles totales.

Los árboles con síntomas muestreados presentaron un amarillamiento general de la copa y apariencia deshidratada; en las hojas se observaron moteados asimétricos menos visibles. Las muestras sintomáticas fueron positivas a *CaLas* y las muestras asintomáticas fueron negativas. Para la detección de *CaLam* todas las muestras fueron negativas.

El análisis de contrastes entre árboles positivos y negativos mostró diferencias significativas entre especies ( $P<0.0001$ ). La concentración de proteínas para limón mexicano mostró una media de 6.1 mg de proteínas por g de tejido fresco para árboles infectados, mientras que para negativos fue 5.46 mg de proteínas por g de tejido fresco con una significancia de  $P=0.0238$ . En naranja dulce hay una diferencia significativa de  $P=0.0002$  con una media de 5.27 y 6.37 mg de proteínas por g de tejido fresco en árboles positivos y negativos respectivamente (Cuadro 1; Figura 1). La determinación de proteínas totales en la planta permite detectar cambios ocasionados por diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Casado, 2004), tal como se muestra en este estudio al encontrar diferencias en

dehidratados; leaves presented asymmetric, less visible spots. Symptomatic samples were positive for *CaLas*, and asymptomatic samples were negative. For the detection of *CaLam* all samples were negative.

The analysis of contrasts between positive and negative trees displayed significant differences between species ( $P<0.0001$ ). Protein concentration for Mexican lime displayed an average of 6.1 mg of proteins per g of fresh tissue for infected trees, whereas for negative ones, it was 5.46 mg of proteins per g of fresh tissue with a significance of  $P=0.0238$ . In sweet orange, there is a significant difference of  $P=0.0002$  with an average of 5.27 and 6.37 mg of proteins per g of fresh tissue in positive and negative trees, respectively (Table 1; Figure 1). Determining total proteins in the plant helps find changes caused by different types of biotic and abiotic stress (Casado, 2004), as shown in this study when finding differences in the concentration of proteins between positive and negative trees for *CaLas*.

Determining PAL did not display significant differences between species, although a higher concentration of PAL was observed in Persian lime and Mexican lime (21.75, 16.09 U $\cdot\text{mg}$  of protein $^{-1}$ ) for negative trees. In contrast, sweet orange trees infected by *CaLas* showed a higher concentration (17.98 U $\cdot\text{mg}$  of protein $^{-1}$ ) (Table 1; Figure 1). The results of this study coincided with Chenyang *et al.* (2001), who mention that the enzyme activity of PAL is modified by biotic and abiotic factors in the plant, since despite having no significant differences, a higher PAL concentration was observed in sweet oranges affected by HLB. The results in Persian and Mexican lime coincided with Martinelli *et al.* (2016), who point out that the regulation of PAL dropped due to the infection of *CaLas* in both species, one considered moderately tolerant, Volkameriana lime (*Citrus*  $\times$

**Cuadro 1. Análisis de contrastes entre árboles con diagnóstico negativo y positivo a *Ca. Liberibacter asiaticus* en el estado de Tamaulipas.**  
**Table 1. Analysis of contrasts between trees with negative and positive diagnoses for *Ca. Liberibacter asiaticus* in the state of Tamaulipas.**

| Variables                       | Especies       | Media + Desviación estándar de árboles positivos | Media + Desviación estándar de árboles negativos | ANOVA |        |
|---------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|--------|
|                                 |                |                                                  |                                                  | F     | Pr > F |
| Proteínas totales (PT)          | Tres especies  | 5.7 ± 1.1                                        | 5.69 ± 0.8                                       | 9.81  | <.0001 |
|                                 | Limón persa    | 5.72 ± 1.06                                      | 5.25 ± 0.45                                      | 2.74  | 0.1010 |
|                                 | Limón mexicano | 6.1 ± 1.25                                       | 5.46 ± 0.73                                      | 5.29  | 0.0238 |
|                                 | Naranja dulce  | 5.27 ± 0.78                                      | 6.37 ± 0.59                                      | 15.03 | 0.0002 |
| Fenilalanina amonio liasa (PAL) | Tres especies  | 17.40 ± 4.4                                      | 18.09 ± 5.3                                      | 2.09  | 0.0620 |
|                                 | Limón persa    | 19.17 ± 4.04                                     | 21.75 ± 3.6                                      | 3.10  | 0.0816 |
|                                 | Limón mexicano | 15.05 ± 3.69                                     | 16.09 ± 3.45                                     | 0.50  | 0.4809 |
|                                 | Naranja dulce  | 17.98 ± 4.54                                     | 16.44 ± 6.49                                     | 1.11  | 0.2946 |
| Peroxidasas (POD)               | Tres especies  | 1.27 ± 1.4                                       | 1.82 ± 1.7                                       | 1.05  | 0.3979 |
|                                 | Limón persa    | 0.82 ± 0.60                                      | 1.96 ± 1.75                                      | 4.63  | 0.0341 |
|                                 | Limón mexicano | 1.2 ± 0.8                                        | 1.53 ± 1.33                                      | 0.38  | 0.5371 |
|                                 | Naranja dulce  | 1.79 ± 2.19                                      | 1.96 ± 1.93                                      | 0.11  | 0.7373 |
| α amilasa                       | Tres especies  | 1.08 ± 0.4                                       | 0.94 ± 0.4                                       | 6.36  | <.0001 |
|                                 | Limón persa    | 1.26 ± 0.53                                      | 1.31 ± 0.39                                      | 0.14  | 0.7064 |
|                                 | Limón mexicano | 0.79 ± 0.24                                      | 0.99 ± 0.21                                      | 2.87  | 0.0935 |
|                                 | Naranja dulce  | 1.19 ± 0.34                                      | 0.56 ± 0.6                                       | 30.27 | <.0001 |
| Fenoles totales                 | Tres especies  | 19.38 ± 5.4                                      | 20.75 ± 4.6                                      | 0.89  | 0.5045 |
|                                 | Limón persa    | 18.58 ± 5.36                                     | 20.43 ± 5.17                                     | 0.99  | 0.3233 |
|                                 | Limón mexicano | 18.72 ± 5.9                                      | 20.71 ± 4.24                                     | 1.14  | 0.2889 |
|                                 | Naranja dulce  | 20.84 ± 4.73                                     | 21.10 ± 4.79                                     | 0.02  | 0.8887 |

la concentración de proteínas entre árboles positivos y negativos a *CaLas*.

La determinación de PAL no mostró diferencias significativas entre especies, sin embargo se observó mayor concentración de PAL en limón persa y limón mexicano (21.75, 16.09 U·mg de proteína<sup>-1</sup>), para árboles negativos; por el contrario naranja dulce presentó mayor concentración en los infectados por *CaLas* (17.98 U·mg de proteína<sup>-1</sup>) (Cuadro 1; Figura 1). Los resultados de éste estudio coinciden con Chenyang *et al.* (2001) quienes mencionan que

*volkameriana*), and the other, Navel orange, highly vulnerable.

The levels of peroxidase activity presented a significant difference for Persian lime (P=0.0341). A higher concentration of the enzyme was observed in trees not infected with *CaLas* with averages of 1.96 U·mg of protein<sup>-1</sup> for Persian lime and sweet orange, and for Mexican lime, 1.53 U·mg of protein<sup>-1</sup> (Table 1; Figure 1). In this investigation, we observed a higher enzyme peroxidase activity in negative citrus trees; however, symptoms

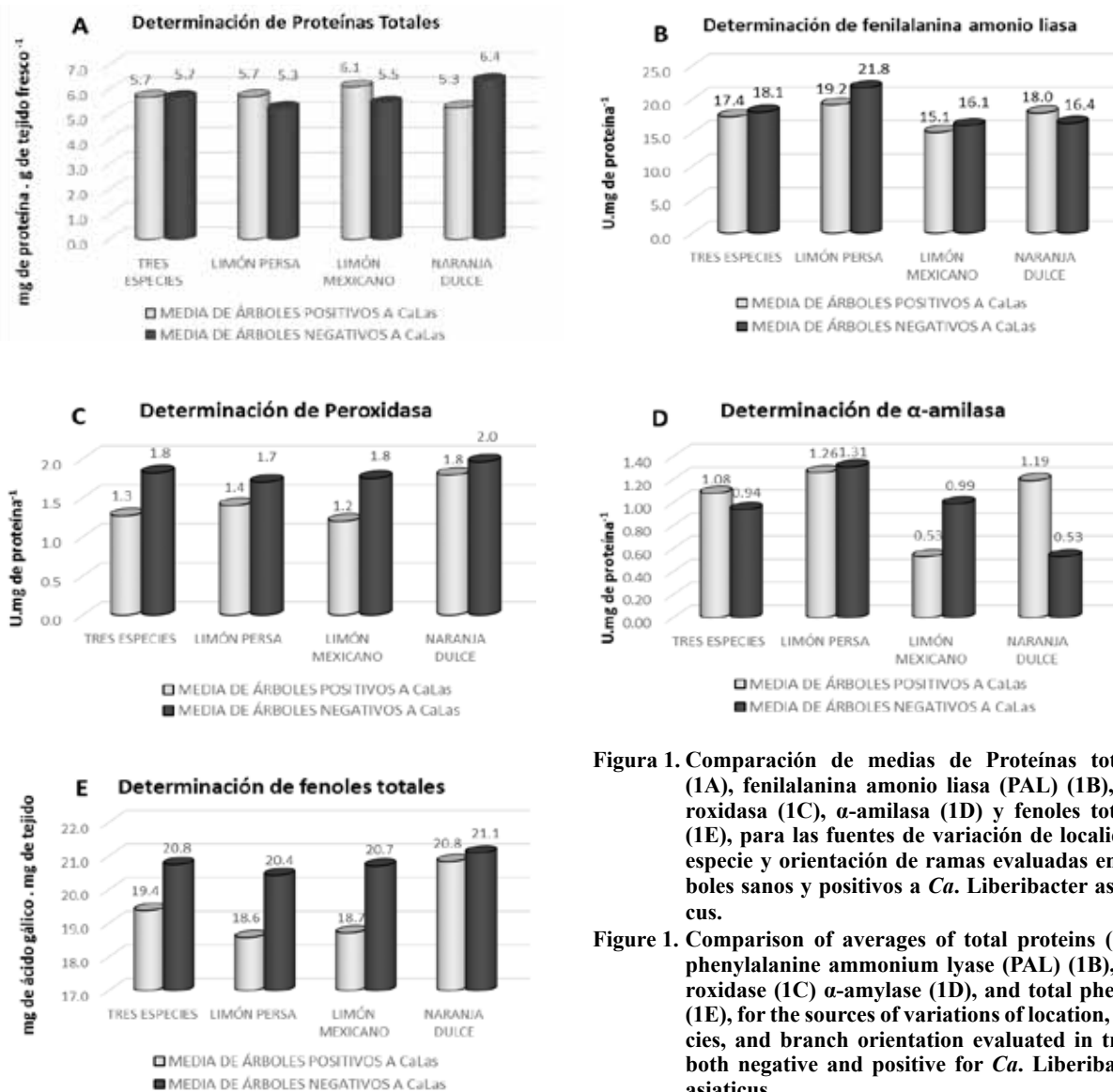


Figura 1. Comparación de medias de Proteínas totales (1A), fenilalanina amonio liasa (PAL) (1B), peroxidasa (1C),  $\alpha$ -amilasa (1D) y fenoles totales (1E), para las fuentes de variación de localidad, especie y orientación de ramas evaluadas en árboles sanos y positivos a *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Figure 1. Comparison of averages of total proteins (1A), phenylalanine ammonium lyase (PAL) (1B), peroxidase (1C)  $\alpha$ -amylase (1D), and total phenols (1E), for the sources of variations of location, species, and branch orientation evaluated in trees, both negative and positive for *Ca. Liberibacter asiaticus*.

la actividad enzimática de la PAL es modificada por factores bióticos y abióticos en la planta; ya que a pesar de no tener diferencias significativas se pudo observar mayor concentración de PAL en naranja dulce afectada por HLB. Los resultados en limón persa y mexicano coinciden con lo señalado por Martinelli *et al.* (2016) quienes indican que la regulación de la PAL disminuyó a causa de la infección de *CaLas* en dos especies de cítricos, una

of central and secondary veins degeneration in leaves leaves infected with HLB, produced by the induced lignification by this enzyme, as mentioned Robinson (1991).

In the enzyme quantification of  $\alpha$ -amylase, significant differences were presented between species and between positive and negative sweet orange trees ( $P < 0.0001$ ). Negative Persian lime and Mexican lime trees displayed a higher

considerada moderadamente tolerante, limón Volkameriana (*Citrus × volkameriana*); y la otra altamente susceptible, naranja Navel.

Los niveles de actividad peroxidasa presentaron diferencia significativa para limón persa ( $P=0.0341$ ). Se observó mayor concentración de la enzima en árboles no infectados con *CaLas* con medias de 1.96 U·mg de proteína<sup>-1</sup> para limón persa y naranja dulce, y para limón mexicano de 1.53, U·mg de proteína<sup>-1</sup> (Cuadro 1; Figura 1). En la presente investigación se observó mayor actividad enzimática de la peroxidasa de los cítricos en árboles negativos; no obstante, se observaron síntomas de acorchamiento de nervaduras centrales y secundarias de las hojas infectadas con HLB, producto de la lignificación inducida por ésta enzima como menciona Robinson (1991).

En la cuantificación enzimática de  $\alpha$ -amilasa se presentaron diferencias significativas entre especies y entre árboles positivos y negativos de naranja dulce ( $P<0.0001$ ). En árboles negativos de limón persa y limón mexicano se observó mayor concentración de  $\alpha$ -amilasa (1.31, 0.99 U·mg de proteína<sup>-1</sup>), respectivamente; en árboles positivos la mayor concentración se detectó en limón persa (1.26 U·mg de proteína<sup>-1</sup>) (Cuadro 1; Figura 1). En el estudio de Martinelli *et al.* (2016), la  $\alpha$ -amilasa se expresó en limón Volkameriana (*Citrus × volkameriana*), señalada como moderadamente tolerante, y la  $\beta$ -amilasa en naranja Navel, material altamente susceptible. En el presente estudio, el estrés ocasionado al árbol provocó que la actividad  $\alpha$ -amilasa aumentara en limón persa seguido por naranja dulce.

Los niveles de concentración de fenoles totales se presentaron en un rango mínimo de 18.5 mg de ácido gálico por g de peso fresco registrado para las muestras infectadas con *CaLas* de limón persa.

concentración de  $\alpha$ -amilasa (1.31, 0.99 U·mg of protein<sup>-1</sup>), respectively; in positive trees, the highest concentration was found in Persian lime (1.26 U·mg of protein<sup>-1</sup>) (Table 1; Figure 1). In the study by Martinelli *et al.* (2016),  $\alpha$ -amylase was expressed in Volkameriana lime (*Citrus × volkameriana*), indicated as moderately tolerant, and  $\beta$ -amylase in Navel orange, a highly vulnerable material. In this study, the stress on the tree caused the  $\alpha$ -amylase activity to increase in Persian lime, followed by sweet orange.

The levels of total phenols were displayed in a minimum range of 18.5 mg of gallic acid per g of fresh weight registered for the samples of Persian lime infected with *CaLas*. Sweet orange presented the maximum value (21.10 mg of gallic acid per g of fresh weight) in negative trees. In the analysis of contrasts, the determination of total phenols did not show significant differences between species ( $P=0.5045$ ) (Table 1; Figure 1). Coinciding with Yedidia *et al.* (1999), who point out that when suppressing the peroxidase activity, the production of phenolic compounds is also reduced, the results do not display a significant difference in peroxidase activity or in phenol compounds.

## CONCLUSIONS

The study showed a higher concentration of proteins in Mexican lime with *CaLas*, and sweet orange in the negative ones. There was a higher PAL enzyme activity in sweet orange tested positive for *CaLas* than in negative trees. The activity of the enzyme peroxidase was not perceivable in this stage of the disease, as was the case for the concentration of total phenolic compounds. The activity of  $\alpha$ -amylase was higher in Persian lime.



Naranja dulce presentó el valor máximo, 21.10 mg de ácido gálico por g de peso fresco, en árboles negativos. En el análisis de contrastes la determinación de fenoles totales no se observaron diferencias significativas entre especies ( $P=0.5045$ ) (Cuadro 1; Figura 1). Coincidiendo con Yedidia *et al.*, 1999, quienes señalan que al reprimirse la actividad de la peroxidasa, también disminuye la producción de compuestos fenólicos, los resultados no muestran una diferencia significativa en la actividad peroxidasa, ni en compuestos fenoles.

## CONCLUSIONES

El estudio mostró mayor concentración de proteínas en limón mexicano con CaLas, y naranja dulce en los negativos. Se observó mayor actividad enzimática PAL en naranja dulce positiva a CaLas que en los árboles negativos. La actividad de la enzima peroxidasa no fue perceptible en esta etapa de la enfermedad, al igual que la concentración de compuestos fenólicos totales. La actividad  $\alpha$ -amilasa fue mayor en limón persa.

## AGRADECIMIENTOS

A la UAAAN y al programa de becas de CONACYT por el financiamiento otorgado. Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas por el apoyo logístico brindado.

## LITERATURA CITADA

- Albrecht U. and Bowman K. D. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science*. 175: 291-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.001>
- Almaro, M. F., Ocampo C. y Montes de G. V. 1994. Establecimiento de un método para la determinación de la actividad enzimática de L Fenilalanina amonio liasa (PAL)

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the UAAAN and the CONACYT scholarship program for the funds granted. To the Tamaulipas State Plant Health Committee for the logistical support provided.

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

- en Cafeto. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. 19 (72): 137-140. [http://www.accefyn.org.co/revista/Vol\\_19/72/137-140.pdf](http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_19/72/137-140.pdf)
- Almeyda-León. I. H., Rocha-Peña. M. A., Piña-Razo. J. and Martínez-Soriano. J. P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219101.pdf>
- Arfaoui A., El Hadrami A., Mabrouk Y., *et al.* 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* sp. *Ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 (6-7): 470-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.004>
- Aritua V, Achor D, Gmitter F. G., Albrigo G., Wang N. 2013. Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *PLoS ONE* 8: doi: 10.1371/journal.pone.0073742
- Ballester A. R., Lafuente M. T., González-Candelas L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit- *Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* 39: 115-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.002>
- Bernal L., Martínez B. E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*. 7(25): 77-90. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34202506>
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1/2): 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Casado V. J. 2004. Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.): implicación de polifenol oxidase (PPO) y enzimas antioxidantes. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante. P-113 <http://hdl.handle.net/10045/9919>
- Chenyang H., Hsiang T., Wolyn D. 2001. Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *European Journal of Plant Pathology* 107:473-483. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1011218304331>
- Christopoulos M. V. and Tsantili E. 2015. Participation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in increased phenolic compounds in fresh col stressed walnut. (*Juglans regia* L.)

- Kernels. *Postharvest Biology and Technology* 104: 17-25 <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.03.003>
- Díaz M., Pérez Y., Cazaña Y., Prieto M., Wencomo H. y Lugo Y. 2010. Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y Forrajes* 3 (3) <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v33n3/pyf06310.pdf>
- DGSV-Senasica y Mora-Aguilera G. 2012. Ficha técnica HLB Huanglongbing. 31 p. <http://senasica.gob.mx/?id=4612>
- Etcheberria E., Gonzalez P., Achor D. and Albrigo G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74: 75-83 DOI:10.1016/j.pmp.2009.09.004
- Flores-Sánchez J. L., Mora-Aguilera G., Loeza-Kuk E, López-Arroyo. J. I., Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez. G. y Robles-García P. 2015. Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Folimonova S. Y., Robertson C. J., Gansey S. M, Gowda S. and Dawson O. 2009. Examination of the responses of different genotype of citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*. 99 (12):1346-1354. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf-plus/10.1094/PHYTO-99-12-1346>
- García A. H. y Vázquez D. R. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bitácora. Biotecnología* 3: 77-88. [www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_1998\\_2/bitacora.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/bitacora.pdf)
- Kähkönen, M.P., Hopia A. I., Heikki J. V., Jussi P. R., Pihlaja K., Kujala T. S., and Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3954-3962 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9901461>
- Kim J.S., Sagaram U. S., Burns J.K., Li J.L., Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99:50–57 <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0050>
- Koh E-J., Zhou L., Williams D. S., Park J., Ding N., Duam J-P. and Kang B-H. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Protoplasma*. 249: 687-697. DOI: 10.1007/s00709-011-0312-3
- Lozoya S. H., Rivera H. R. y Colinas-León. M. T. 2007. Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia* 41: 479-489 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2284649>
- Lu L., Wang J., Zhu R., Lu H., Zheng X. and Yu T. 2015. Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signalling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*. 172: 603-612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.097>
- Martinelli F., Reagan R. L., Dolan D., Fileccia V. and Dandekar A. M. 2016. Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease. *BMC Plant Biology* 16:167 DOI 10.1186/s12870-016-0858-5
- Menéndez A. O., Evangelista L. S., Arenas O. M., Bermúdez T. K., Del Villar M. A., Jiménez A. A. 2006. Cambios en la actividad de  $\alpha$ -amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Var. Flavicarpa Degener). *Interciencia*. 31(10): 728-733. ISSN 0378-1844
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez G., Domínguez-Monge S., Gutiérrez-Espinosa A., Loeza-Kuk E., González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 32(2): 108-119. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61243856003>
- Paz-Lago. D., Cabrera G., Ramírez M., Pombo R. y Gutiérrez A. 1999. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum* f.sp. *licopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales* 20:59-66. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=ctrop.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000790>
- Robinson, D. S. 1991. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Fox P. F. (ed). *Food Enzymology*. Vol. 1. Elsevier, London. pp: 399-426.
- Rodríguez-Pedroso A. T., Ramírez-Arrebato M. A., Cárdenas-Traviésio R. M., Falcón-Rodríguez A., Bautista-Baños S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza Sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24, 1; 1-7. [https://www.researchgate.net/profile/Silvia\\_Bautista-Banos/publication/237037513\\_Efecto\\_de\\_la\\_Quitosana\\_en\\_la\\_Induccion\\_de\\_la\\_Actividad\\_de\\_Enzimas\\_Relacionadas\\_con\\_la\\_Defensa\\_y\\_Proteccion\\_de\\_Plantulas\\_de\\_Arroz\\_Oryza\\_sativa\\_L\\_contra\\_Pyricularia\\_grisea\\_Sacc/links/0deec51b2975c15955000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Bautista-Banos/publication/237037513_Efecto_de_la_Quitosana_en_la_Induccion_de_la_Actividad_de_Enzimas_Relacionadas_con_la_Defensa_y_Proteccion_de_Plantulas_de_Arroz_Oryza_sativa_L_contra_Pyricularia_grisea_Sacc/links/0deec51b2975c15955000000.pdf)
- Rüttimann, C., E. Schwember, L. Salas, D. Cullen, and R. Vicuna. 1992. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia breviospora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 16:64–76.
- Senasica-Sagarpa. 2010. Protocolo de diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Dirección General de Sanidad Vegetal.
- SIGMA-ALDRICH. 2015 <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/enzymaticassayofamylase.printerview.html>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178 [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Trotel-Aziz. P., Couderchet M., Biagiatti S. and Aziz A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 64: 21-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Wang C.Y. 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilling zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology* 1: 33-45. doi:10.1016/0925-5214(94)00020-S

Zhong Y., Cheng C. Z., Jiang N. H., Jiang B., Zhang Y. Y., Wu B., Hu M. L., Zeng J. W., Yan H. X., Yi G. J., Zhong G. Y. 2015. Comparative transcriptome and iTraq proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. PLoS ONE. 10(6):e0126973. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126973>

# Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An *in vitro* approach towards its biological control

## Etiología de la mancha necrótica del *Agave angustifolia*: Una aproximación *in vitro* hacia su control biológico

**Horacio Duque-Bautista, Guilbaldo Gabriel Zurita-Vásquez**, Universidad de la Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria CP 70800, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México; **Yesenia Pacheco-Hernández**, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, CP 90700, Tlaxcala, México; **Nemesio Villa-Ruano\***, Universidad de la Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria CP 70800, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México. \*Autor para correspondencia: [necho82@yahoo.com.mx](mailto:necho82@yahoo.com.mx).

Recibido: 12 de Enero, 2017.

Aceptado: 15 de Febrero, 2017.

Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Nemesio Villa-Ruano N. 2017. Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An *in vitro* approach towards its biological control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 326-337.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-2

Primera publicación DOI: 22 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 22, 2017.

**Resumen.** Presentamos la identificación molecular de una especie de *Cladosporium* aislada de las manchas necróticas de los tallos enfermos de *Agave angustifolia*, los cuales se colectaron en San Luis Amatlán Oaxaca, México. Los análisis de los espaciadores transcritos internos (ITS) del gen de RNA ribosomal 18S y de la secuencia parcial codificante (cDNA) de una proteína alergénica conservada de choque térmico 70 (HSP70), revelaron su similitud

**Abstract.** We present the molecular identification of a *Cladosporium* species isolated from necrotic spots of diseased stalks of *Agave angustifolia*, which were collected in San Luis Amatlán, Oaxaca, Mexico. Analyses of the internal transcribed spacer (ITS) from the 18S ribosomal RNA gene and the partial coding region (cDNA) from an allergenic conserved heat shock protein 70 (HSP70), revealed its similarity with *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link. The *in vitro* assessment of the ethanolic extracts from *Zaluzania montagnifolia* roots and its main *ent*-kaurenoids resulted in the growth inhibition of the fungus. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were obtained by the agar dilution and broth microdilution methods. The ethanolic extract, *ent*-kaurenoic acid (*ent*-16-kauren-19-oic acid) and grandiflorenic acid (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid) showed MIC values of 150.4±3.5, 100.3±2.1, and 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, respectively

con *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link. La evaluación *in vitro* de los extractos etanólicos de las raíces *Zaluzania montagnifolia* y de sus principales *ent*-kaurenoides resultó en la inhibición del crecimiento normal del hongo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se obtuvo por el método de dilución en agar y microdilución en caldo. El extracto etanólico, el ácido *ent*-kaurenoico (*ent*-16-kauren-19-oic acid) y el ácido grandiflorenico (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid) mostraron valores MIC de  $150.4 \pm 3.5$ ,  $100.3 \pm 2.1$  y  $80.7 \pm 1.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Palabras clave:** *Cladosporium herbarum*, ITS, maguey mezcalero, derivados del *ent*-kaureno, inhibición del crecimiento.

El género *Cladosporium* está constituido por alrededor de 500 miembros con 40 especies oficialmente nombradas y 180 cepas sin nombre que han sido reportadas alrededor del mundo (Alonso, 2012). Estas especies polifiléticas son caracterizadas por su morfofisiología heterogénea y por su extraordinaria capacidad para colonizar hospederos inertes y vivos incluyendo humanos y muchas especies de plantas (Bensch *et al.*, 2012). A pesar de que muchos de estos hongos son conocidos por ser endófitos comunes, algunas especies pueden actuar como organismos oportunistas asociados a manchas foliares y otras lesiones similares en frutos de plantas con importancia agronómica (Schubert, 2005). *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link, es uno de los tres mayores complejos de especies del género *Cladosporium* que usualmente colonizan hojas muertas o en senescencia o incluso plantas herbáceas o leñosas como invasor secundario de manchas necróticas foliares (Bensch *et al.*, 2015). *C. herbarum* produce la enfermedad de pudrición en cierto número de frutos agronómicos tales como la pera, la uva, la cereza y el maracuyá (Barbosa

**Key words:** *Cladosporium herbarum*, ITS, maguey mezcalero, *ent*-kaurene derivatives, growth inhibition.

The *Cladosporium* genus is comprised by around 500 members with 40 officially named species and 180 unnamed strains reported worldwide (Alonso, 2012). These polyphyletic species are characterized by its morphophysiological heterogeneity and by its extraordinary capacity to colonize non-living and living hosts including humans and many plant species (Bensch *et al.*, 2012). Despite many of these fungi are known to be common endophytes, some species can act as opportunistic microorganisms associated to leaf spots and other lesions in fruits from plants with agronomic importance (Schubert, 2005). *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link, is one of the three major species complexes of the genus *Cladosporium* which usually colonizes falling or dead leaves or even herbaceous and woody plants as secondary invader on necrotic leaf spots (Bensch *et al.*, 2015). *C. herbarum* produces rot diseases in a number of agronomic fruit crops such as pear, grape, cherry and passion fruit (Barbosa *et al.*, 2001). Its teleomorph, *Mycosphaerella tassiana* (De Not.) Johans is associated to the brown leaf spot disease of date palm (Barbosa *et al.*, 2001). *C. herbarum* has been documented as an opportunistic phytopathogen isolated from *Agave americana* cultivated in Italy (Bensch *et al.*, 2012). However, the incidence of cladosporiosis in *Agave* plants cultivated in Latin America has been poorly described. Some regions of Mexico such as Jalisco and Oaxaca economically depend on *Agave* crops to commercialize traditional distillates. Thus, the identification of its main phytopathogens and the formulation of alternatives for their biological control should be very valuable. Considering that some *Cladosporium* species could aggravate the necrosis of many vegetables including *Agave*

*et al.*, 2001). Su teleomorfo, *Mycosphaerella tassiana* (De Not.) Johans está ligado a la enfermedad de la mancha marrón foliar de la palmera datilera (Barbosa *et al.*, 2001). *C. herbarum* ha sido documentado como un patógeno oportunista aislado del *Agave americana* cultivado en Italia (Bensch *et al.*, 2012). Sin embargo, la incidencia de cladosporiosis en plantas de *Agave* cultivadas en Latinoamérica ha sido poco descrita. Algunas regiones de México tales como Jalisco y Oaxaca dependen económicamente de los cultivos de *Agave* para comercializar destilados tradicionales. De este modo, la identificación de sus principales fitopatógenos, así como la formulación de alternativas para su biocontrol serían muy valiosas. Considerando que algunas especies de *Cladosporium* podrían agravar la necrosis de muchos vegetales incluyendo a las plantas de *Agave* y tomando en cuenta que estos hongos también contienen proteínas alergénicas para los humanos (Achatz *et al.*, 1995), su biocontrol alternativo debe ser investigado.

Las plantaciones de *Agave* en el distrito de Miahuatlán de Porfirio Díaz Oaxaca están usualmente circundadas por matorral xerófilo. En estos ecosistemas existen muchas plantas silvestres que no han sido probadas en cuanto a su capacidad antimicrobiana (Meave *et al.*, 2012). Así bien, la evaluación de sus extractos crudos y compuestos mayoritarios sobre especies fitopatógenas selectas, podría originar alternativas menos costosas para lograr su biocontrol. En este contexto, algunas enfermedades de plantas podrían razonablemente ser tratadas con recursos de plantas nativas. Una de las plantas más abundantes asociadas a este sitio geográfico es *Zaluzania montagnifolia*, una Asteraceae nativa comúnmente conocida como “yegachin” o “vara ceniza” (Villa-Ruano *et al.*, 2013). La planta es considerada como una fuente de diterpenos kaurénicos con actividad antimicrobiana sobre una vasta cantidad de especies patógenas para animales

plants and also contain some allergens for humans (Achatz *et al.*, 1995), its alternative biological control should be investigated.

The *Agave* crops from the district of Miahuatlán de Porfirio Díaz Oaxaca are usually surrounded by xeric scrublands. In this ecosystem, there are several wild plants that have not been tested for its capacity as antimicrobials (Meave *et al.*, 2012). Thus, the evaluation of crude extracts and its majoritarian compounds on selected phytopathogenic species, could originate less expensive alternatives to achieve its biological control. In this context, some plant diseases could reasonably be treated with native plant sources. One of the most abundant plants associated to this geographical location is *Zaluzania montagnifolia*, a native Asteraceae commonly known as “yegachin” or “vara ceniza” (Villa-Ruano *et al.*, 2013). The plant is considered as a source of kaurane type diterpenes with antimicrobial activity on several animal- and plant pathogenic species (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Considering the availability of *Z. montagnifolia* in this region and the known antimicrobial activity of its main chemical components, the objectives of this work were to determine the identity of the main phytopathogen involved in the generation of necrotic spots in diseased *Agave* plants, as well as to evaluate the ethanolic extracts and pure entkaurenoids of *Z. montagnifolia* on the *in vitro* growth of that phytopathogen.

#### **Isolation of *Cladosporium* sp. from diseased *A. angustifolia***

Ten stalks from *Agave angustifolia* showing necrotic spots were collected in open-field crops from San Luis Amatlán Oaxaca, México (16° 39' 02" N, 96° 49' 95" W, 1,500 masl) in July 2016. The stalks were carefully washed three times with a solution of 2 % sodium hypochlorite. After this step,

y plantas (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Considerando la disponibilidad de *Z. montagnifolia* en esta región y la conocida actividad antimicrobiana de sus compuestos mayoritarios, los objetivos primordiales de este trabajo fueron determinar la identidad del patógeno involucrado en la generación de manchas necróticas en plantas de *Agave* sintomáticas, así como también evaluar los extractos etanólicos y *ent*-kaurenoides puros de *Z. montagnifolia* sobre el crecimiento *in vitro* de tal fitopatógeno.

### **Aislamiento de *Cladosporium* sp. de plantas de *A. angustifolia* sintomáticas**

Diez tallos de *A. angustifolia* con signos de manchas necróticas fueron colectadas en cultivos abiertos de San Luis Amatlán Oaxaca, México (16° 39' 02" N, 96° 49' 95" O, 1,500 msnm) en julio del 2016. Los tallos fueron cuidadosamente lavados en tres ocasiones con una solución de hipoclorito de sodio al 2 %. Después de este paso, las manchas necróticas fueron extraídas con un bisturí estéril y entonces sumergidas en una solución de etanol absoluto (J.T. Baker, USA) por 1 minuto. El tejido fue desecado bajo flujo de N<sub>2</sub> y fue cortado en piezas pequeñas en campana de flujo laminar para posteriormente ser incubadas en medio PDA (Difco®, USA) a 30 °C en oscuridad por 5 días. Los microorganismos fueron purificados por estría cruzada y entonces mantenidos en placas Petri frescas conteniendo el mismo medio de cultivo. El microorganismo más dominante (*Cladosporium* sp.) fue sometido a identificación molecular y posteriormente evaluado en su posible papel en la generación de manchas necróticas.

### **Identificación molecular de *Cladosporium* sp. aislado del *A. angustifolia* sintomático**

100 mg de una mezcla de hifas y conidióforos fueron tomados del medio PDA conteniendo el

the necrotic spots were scratched out with a sterile surgical blade and then immersed in a solution of absolute ethanol (J.T. Baker, USA) for 1 min. The tissue was dried under N<sub>2</sub> stream and cut into small pieces in a sterile cabinet for posteriorly being incubated in PDA medium (Difco®, USA) at 30 °C in darkness for 5 days. The microorganisms were purified by cross streaking method and maintained in fresh petri dishes containing the same culture media. The most dominant microorganism (*Cladosporium* sp.) was subjected to molecular identification and it was subsequently tested for its possible involvement in the generation of necrotic spots.

### **Molecular determination of *Cladosporium* sp. isolated from diseased *A. angustifolia***

100 mg of a mixture of hyphal cells and conidiophores were taken from PDA containing the filamentous fungus. The cells were disrupted with acid-washed glass beads (G-9268, 425-600 µm 0.5 mm diameter, Sigma-Aldrich Co., USA.) in the presence of 300 µL of DNAzol reagent (ThermoFisher™, USA). The following steps were carried out in accordance with the manufacturer's recommendations. The isolated DNA was washed twice with a mix of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v: Sigma-Aldrich Co., USA). PCR reactions were carried out using 1 µg of DNA dissolved in a final volume of 50 µL. The identity of the microorganism was determined by the amplification of internal transcribed spacers (ITS) using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) and performing the PCR conditions described by White *et al.* (1990). The amplicon was cloned into TOPO TA cloning vector (ThermoFisher™, USA) and sequenced in triplicate in an ABI PRISM 3700 instrument sequencer (ABI, Foster City, CA). The

hongo filamentoso. Las células fueron lisadas con perlas de vidrio-acidificadas (G-9268, 425-600 µm 0.5 mm de diámetro, Sigma-Aldrich Co., USA) en presencia de 300 µL del reactivo DNazol (Thermo-fisher™, USA). Los pasos siguientes fueron llevados a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN aislado fue lavado dos veces con una mezcla de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v, Sigma-Aldrich Co., USA). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo usando 1 µg de ADN disuelto en un volumen final de 50 µL. La identidad del microorganismo fue determinada por la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) usando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGG-TGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATT-GATATGC) y siguiendo las condiciones de PCR descritas por White *et al.* (1990). El amplicón fue clonado en el vector TOPO TA (Thermo-fisher™, USA) y fue secuenciado por triplicado en un aparato ABI PRISM 3700 (ABI, Foster City, CA). La proteína alergénica de *C. herbarum* (proteína de choque térmico 70, acceso S83210) fue amplificada por transcripción inversa a partir del ARN total del hongo, usando el reactivo TRIZOL (Thermo-fisher™, USA) y la enzima SuperScript II (Thermo-fisher™, USA). Los ensayos de PCR fueron realizados con la enzima Platinum® ADN polimerasa de alta fidelidad (Thermo-fisher™, USA) y los iniciadores GAGATCCTTCTTCTCGACGTCG y CCTTCTAATCGTTAACGCCATG. El protocolo de PCR para amplificar este ADNc constó de 94 °C por 5 min de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 4 min. El amplicón fue separado por electroforesis y visualizado en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del NCBI (usando BLAST nucleotide) y la base MycoBank.

allergenic protein of *C. herbarum* (heat shock protein 70, accession S83210) was amplified by reverse transcription from total RNA, using TRIZOL (Thermo-fisher™, USA) and SuperScript II enzyme (Thermo-fisher™, USA). PCR assays were carried out with Platinum® DNA polymerase high fidelity (Thermo-fisher™, USA) and the primers GAGATCCTTCTTCTCGACGTCG and CCTTCTAATCGTTAACGCCATG. The PCR protocol to amplify this cDNA was 94 °C for 5 min of initial denaturation, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 4 min. The amplicon was visualized in an agarose 1 % gel electrophoresis after staining with ethidium bromide and it was simultaneously cloned and sequenced as previously described. The sequences were compared with those deposited in the nucleotide data base of the NCBI (by nucleotide BLAST) and MycoBank.

#### **Pathogenicity tests of *Cladosporium* sp. on *A. angustifolia* stalks**

Healthy young stalks of *A. angustifolia* were excised from the plant and were immersed in water to avoid dehydration along the experimental tests and finally maintained at 25 °C in normal photoperiod (12 hours light). Conidiophores from the fungus were directly harvested with a sterile needle and were immediately inoculated in the stalks by mechanic penetration in order to examine Koch's postulates. The process was carried in a sterile cabinet. The appearance of the spots was observed during 47 days.

#### **Isolation of *ent*-kaurenoids and its *in vitro* evaluation on *Cladosporium* sp.**

500 g of dried roots from *Zaluzania montagnifolia* were extracted for 10 days at room



### Pruebas de patogenicidad de *Cladosporium* sp. en tallos de *A. angustifolia*

Tallos jóvenes asintomáticos de *Agave angustifolia* fueron cortados y sumergidos en agua para evitar deshidratación durante el proceso experimental y se mantuvieron finalmente a 25 °C en fotoperiodo normal (12 horas de luz). Conidióforos del hongo se colectaron directamente con una aguja estéril y fueron inmediatamente inoculados en los tallos por penetración mecánica, con el objetivo de examinar los postulados de Koch. El proceso se realizó en una campana de flujo laminar. La apariencia de las manchas se observó durante 47 días.

### Aislamiento de los *ent*-kaurenoides y su evaluación *in vitro* sobre *Cladosporium* sp.

500 g de raíces secas de *Z. montagnifolia* fueron extraídas con 2 L de etanol absoluto (J.T. Baker, USA) por 10 días a temperatura ambiente. El extracto etanólico crudo fue filtrado con papel Whatman grado 1 y subsecuentemente reducido a sequedad en un rotaevaporador (Buchi R200). La goma resultante fue recobrada y resuspendida en el mismo solvente para obtener soluciones madre de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Estas soluciones fueron directamente usadas para los métodos de dilución en agar y microdilución en caldo o se fraccionaron por HPLC para la obtención del ácido kaurenico (ácido *ent*-16-kauren-19-oico) y el ácido grandiflorenico (ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico). La purificación semi-preparativa se llevó a cabo en un aparato Hewlett Packard 1050 acoplado a un detector de arreglo de diodos HP G1306A equipado con una columna Varian C<sub>18</sub> (250×4.5 mm D.I.; 5 µm tamaño de la partícula). Los metabolitos fueron colectados durante corridas continuas (100 µL de volumen de inyección) usando una fase móvil isocrática consistente de acetonitrilo (J.T.

temperature with 2 L of absolute ethanol (J.T. Baker, USA). The crude ethanolic extract was filtered with Whatman filter paper grade 1 and subsequently reduced until dryness in a rotary evaporator (Buchi R200). The resulting gum was recovered and then resuspended in the same solvent in order to obtain stock solutions of 100 mg mL<sup>-1</sup>. These solutions were directly used for broth microdilution and agar dilution methods or were fractioned by HPLC for the obtainment of kaurenic acid (*ent*-16-kauren-19-oic acid) and grandiflorenic acid (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid). Semipreparative purification was carried out in a Hewlett Packard 1050 system coupled to a HP G1306A diode array detector equipped with a Varian C<sub>18</sub> column (250×4.5 mm I.D.; 5 µm particle size). The metabolites were collected during continuous runs (100 µL injection volume) using an isocratic mobile phase consisting of 70 % acetonitrile (J.T. Baker, USA) with 0.05 % acetic acid (v/v) at 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate as previously described by Villa-Ruano *et al.* (2009). The retention time was compared with that of authentic standards available in our laboratory. The diterpenoids were resuspended in methanol (J.T. Baker, USA) for further antifungal assessment. Agar diffusion method was carried out by dissolving distinct concentrations (dose-response curves of 10-300 µg mL<sup>-1</sup>) of ethanolic extracts and/or pure diterpenoids in 10 mL of PDA medium (Valgas *et al.*, 2007). The phytopathogenic fungus was inoculated in the medium by massive streaking and these experiments were performed in quintuplicate. The plates were visualized in a white light transilluminator. The obtainment of MIC values was achieved by the broth microdilution method for filamentous fungi proposed by Pfaller *et al.* (2000) using resazurin (Sigma-Aldrich Co., USA) as an indicator of cell viability. The dose-response curves (10-300 µg mL<sup>-1</sup>) to obtain MIC values were performed in quintuplicate.

Baker, USA) al 70 % con 0.05 % de ácido acético (v/v) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> como lo describe previamente Villa-Ruano *et al.* (2009). El tiempo de retención fue comparado con el de estándares puros disponibles en nuestro laboratorio. Los diterpenoides se resuspendieron en metanol (J.T. Baker, USA) para su posterior evaluación antifúngica. El método de difusión en agar se efectuó por disolución de distintas concentraciones (curvas dosis-respuesta de 10-300 µg mL<sup>-1</sup>) del extracto etanólico y/o diterpenoides puros en 10 mL de medio PDA (Valgas *et al.*, 2007). El hongo fitopatógeno fue inoculado por estriado masivo y estos experimentos fueron efectuados por quintuplicado. Las placas fueron visualizadas en un transiluminador de luz blanca. La obtención de los valores de la MIC se logró por el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos propuesto por Pfaller *et al.* (2000) usando resazurina (Sigma-Aldrich Co., USA) como indicador de viabilidad celular. Las curvas de dosis respuesta (10-300 µg mL<sup>-1</sup>) para obtener los valores de la MIC fueron efectuadas en quintuplicado. Las reacciones colorimétricas se midieron a 545 nm. Los valores de la MIC fueron adicionalmente validados por ANOVA-Tukey Test (p<0.01) usando el programa GraphPad 6.05.

Como resultado de la incubación del tejido necrótico en medio PDA, fue aislado un hongo filamentosos verde-marrón (entre otros aislados) con pequeños conidios terminales (Figura 1 A-B). Este hongo fue observado como el más dominante en todas las incubaciones efectuadas. La macroscopia y microscopia óptica del microorganismo sugirió su similitud con *Cladosporium* sp. (Bensch *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR con el ADN genómico y los ADNc's obtenidos a partir de transcripción inversa produjeron fragmentos de ~500 and ~800 pb (Figura 1 C). Los análisis de la secuencia del ITS en las bases de datos del NCBI y del MycoBank demostraron su homología (94 %) con el gen

Colorimetric reactions were measured at 545 nm. The MIC values were additionally validated by ANOVA-Tukey Test (p<0.01) using the software GraphPad 6.05.

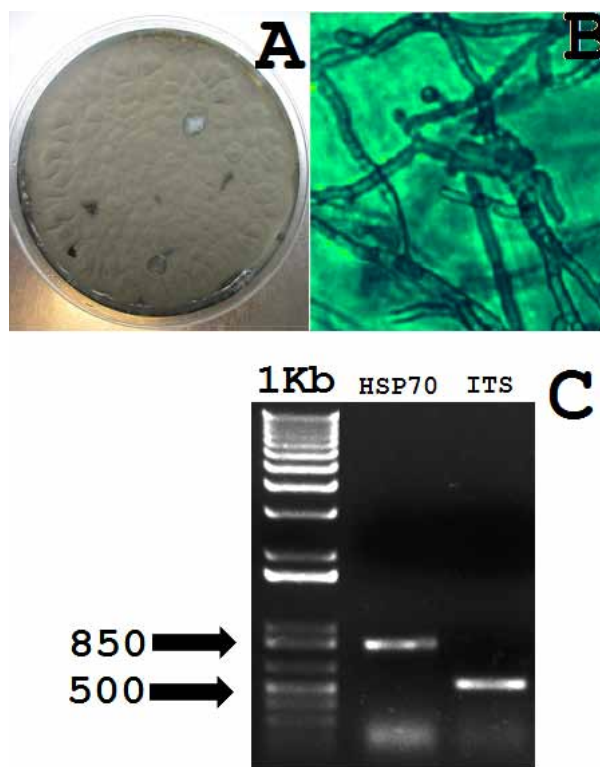
As a result of the incubation of the necrotic tissue in PDA medium, it was isolated a brown-green filamentous fungi (between others isolates) with small terminal conidia (Figure 1 A-B). This fungus was observed as the most dominant species in all the incubations. Macroscopy and microscopy of the microorganism suggested its similarity with *Cladosporium* species (Bensch *et al.*, 2012). PCR reactions with genomic DNA and cDNAs from reverse transcription produced fragments of ~500 and ~800 bp (Figure 1 C). The analyses of the ITS sequence with NCBI and MycoBank data bases demonstrated its homology (94 %) with the 18S ribosomal RNA gene from the isolate "olrim85" (ID: AY354234.1) of *C. herbarum* (Figure 2A). Whereas, the coding sequence of the allergenic protein had 99 % homology with the sequence ID:X81860.1 from *C. herbarum* deposited in the NCBI (Figure 2B). These molecular data strongly suggested the identity of the fungus as *C. herbarum*.

The inoculation of the fungus in asymptomatic *Agave* stalks exhibited necrotic symptoms since day 4 (Figure 3B). Despite the penetration with the sterile needle produced a damage in the stalks (Figure 3A), the inoculation of the fungus caused an evident systemic response and a darkening of the vasculature (Figure 3B). The systemic response was also perceived by emerging yellow spots around the necrotic cells which were visible since day 15 (Figure 3B). Interestingly, the lesions generated by the sole mechanical damage were almost imperceptible at day 47 (Figure 3A). Contrarily, those infected with the fungus were clearly aggravated at the same period of time (Figure 3B). These data strongly suggested the susceptibility of those *Agave* stalks to the *C. herbarum* infection.

de ARN ribosomal 18S del aislado “olrim85” (ID: AY354234.1) de *C. herbarum* (Figura 2A). Mientras tanto, la secuencia codificante de la proteína alergénica tuvo un 99% de homología con la secuencia ID:X81860.1 de *C. herbarum* depositada en el NCBI (Figura 2B). Estos datos moleculares sugirieron fuertemente la identidad del hongo como *C. herbarum*.

La inoculación del hongo en tallos asintomáticos de *Agave* exhibieron síntomas de necrosis desde el día 4 (Figura 3B). A pesar de que la penetración con la aguja estéril produjo un daño en los tallos (Figura 3A), la inoculación del hongo causó una evidente respuesta sistémica y un oscurecimiento de la vasculatura (Figura 3B). Dicha respuesta sistémica fue también percibida por manchas amarillas que circundaron las células necrosadas, las cuales fueron visibles desde el día 15 (Figura 3B). Interesantemente, las lesiones generadas únicamente por el daño mecánico fueron casi imperceptibles al día 47 (Figura 3A). Contrariamente, aquellas lesiones infectadas con el hongo se encontraron agravadas en el mismo periodo de tiempo (Figura 3B). Estos resultados sugieren fuertemente la susceptibilidad de estos tallos de *Agave* a la infección por *C. herbarum*. A pesar de que esta evidencia apoya el hecho de que *C. herbarum* está asociado a la generación de manchas necróticas, la participación de otros microorganismos oportunistas en la infección de cultivos de campos abiertos, no puede ser descartada.

La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos etanólicos de las raíces de *Z. montagnifolia* contra *C. herbarum* mostraron un claro efecto inhibitorio (Figura 4). El método de dilución en agar usando los ácidos *ent*-kaurenoico y grandiflorenico puros (usualmente los principales constituyentes de los extractos etanólicos de las raíces de la planta) permitió exhibir su participación en el efecto antifúngico observado (Figura 4). Como se muestra



**Figura 1.** Macroscopia y microscopia óptica de *C. herbarum* aislado de tallos sintomáticos de *Agave*. A, *C. herbarum* crecido en medio PDA. B, organización de las hifas y conidióforos de *C. herbarum*, la imagen fue grabada a 40X. C, identificación molecular de *C. herbarum* por la amplificación de un ADNc parcial proveniente de una HSP70 alergénica (~800 bp) y el ITS del gen RNA ribosomal 18S (~500bp). Los pesos moleculares aproximados son mostrados.

**Figure 1.** Macroscopy and optical microscopy of *C. herbarum* isolated from diseased *Agave* stalks. A, *C. herbarum* grown in PDA medium. B, hyphal organization and conidiophores of *C. herbarum*, the image was recorded at 40X. C, Molecular identification of *C. herbarum* by the amplification of a partial cDNA from the allergenic HSP70 (~800 bp) and the ITS from 18S ribosomal RNA gene (~500bp). The approximated molecular weights are shown.

Despite this evidence supports the fact that *C. herbarum* is associated to the generation of necrotic spots, the involvement of another opportunistic microorganisms in the infection of open-air crops, cannot be discarded.

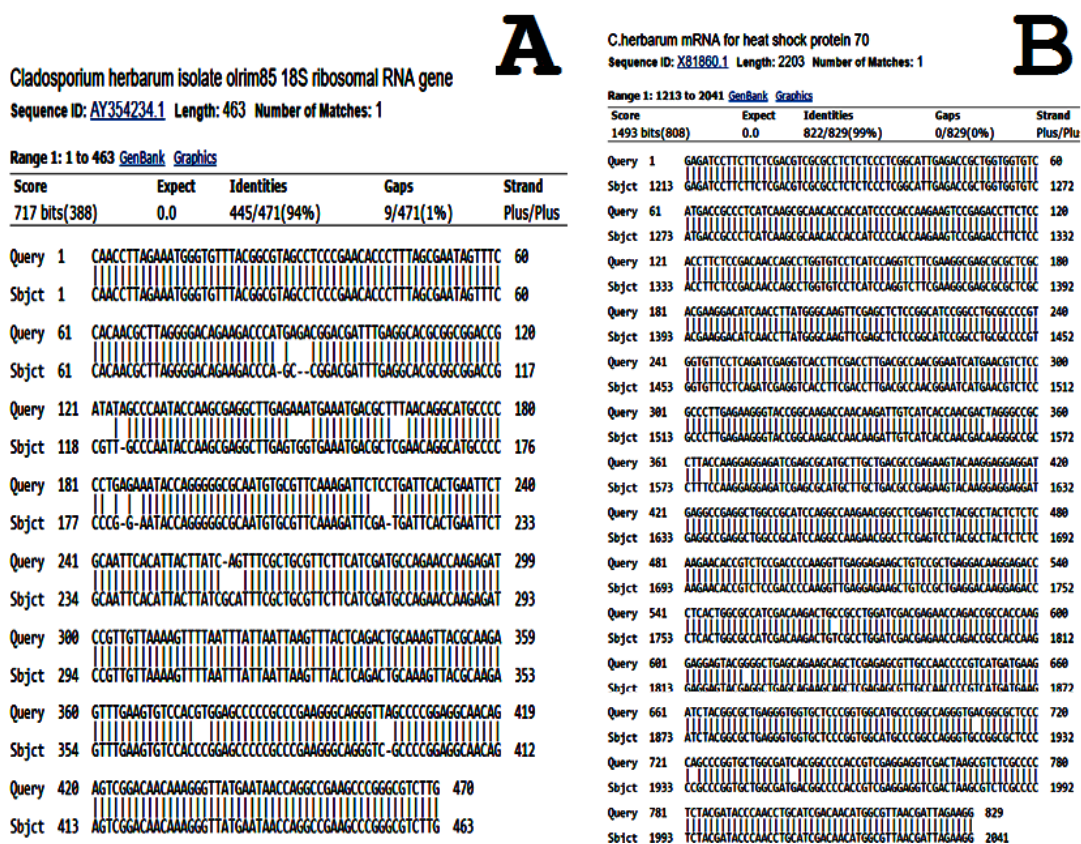


Figura 2. Resultados de los alineamientos por BLAST entre la secuencia original (query) de *C. herbarum* y su homología con aquellas depositadas en la base de nucleótidos del NCBI (subject). A, secuencia ITS; B, secuencia HSP70.

Figure 2. Results of the BLAST alignment for the original DNA sequences (query) from *C. herbarum* and its homology with those deposited in the nucleotide data base from the NCBI (subject).

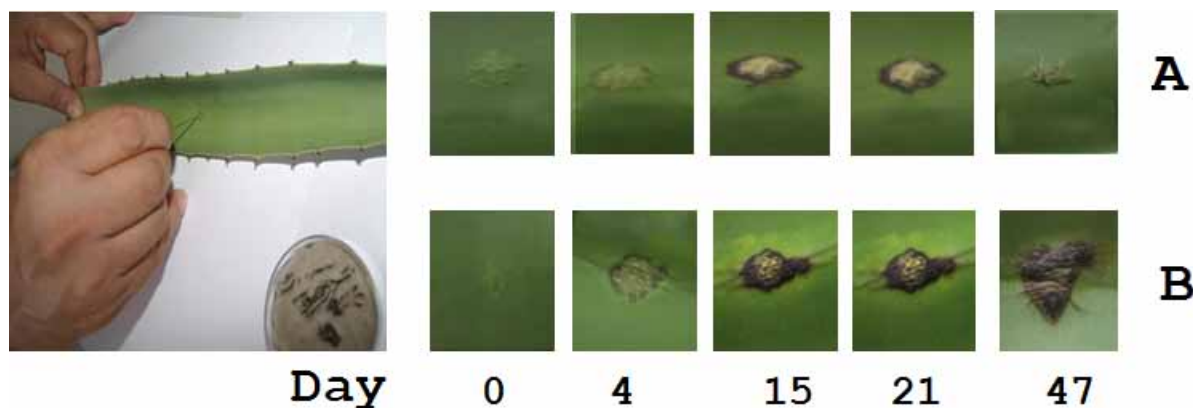


Figura 3. Efecto del daño mecánico (A) y daño mecánico con la inoculación *C. herbarum* (B) en tallos jóvenes asintomáticos de *Agave angustifolia*.

Figure 3. Effect of mechanical damage (A) and mechanical damage with inoculation by *C. herbarum* (B) in healthy young stalks from *A. angustifolia*.

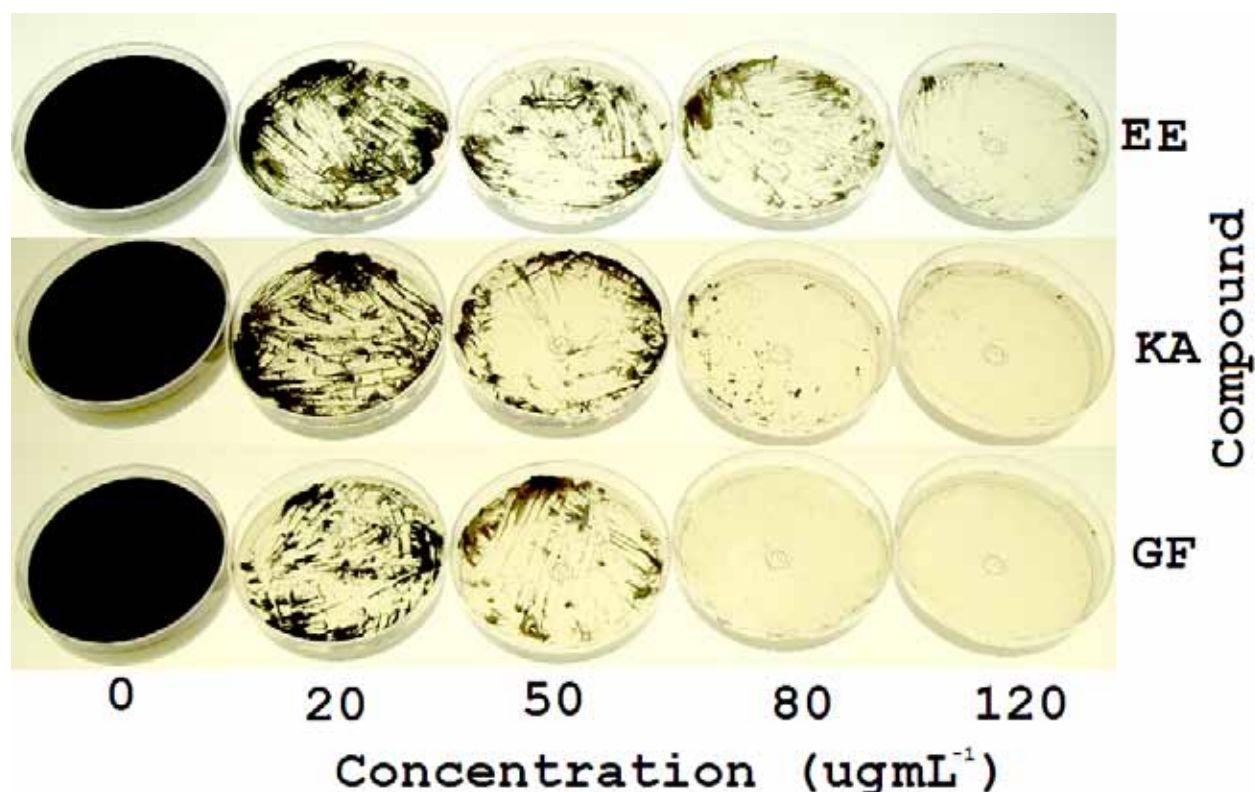


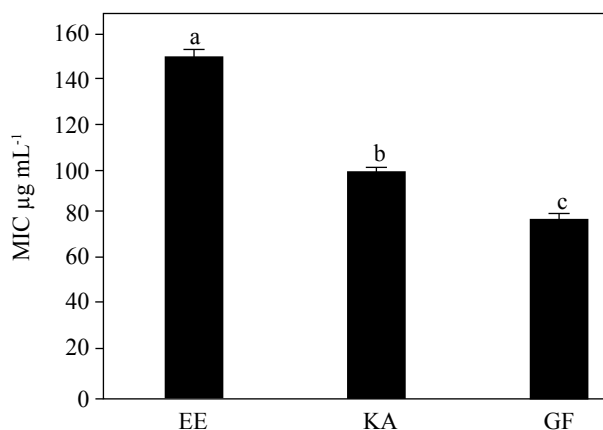
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones del extracto etanólico (EE) de *Z. montagnifolia*, el ácido *ent*-kaurenoico (KA) y el ácido grandiflorónico (GF) en el crecimiento *in vitro* de *C. herbarum*.

Figure 4. Effect of different concentrations of the ethanolic extract (EE) of *Z. montagnifolia*, *ent*-kaurenoic acid (KA) and grandifloreonic acid (GF) in the *in vitro* growth of *C. herbarum*.

en la Figure 4, el hongo creció perfectamente en medio PDA puro ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mientras que una evidente inhibición del crecimiento fue observada en relación al aumento de la concentración de cada componente evaluado ( $20\text{-}120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estos experimentos semi-cuantitativos mostraron que el extracto etanólico conteniendo ambos diterpenos fue capaz de inhibir el crecimiento normal del hongo a menos de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Los ensayos ejecutados mediante el método de dilución en caldo condujeron a la obtención de los valores de la MIC. Estos valores reflejaron la concentración del agente antimicrobiano en la cual no hay signos de crecimiento. Los valores obtenidos fueron de  $150.4 \pm 3.5$ ,

The *in vitro* antifungal activity of the ethanolic extracts from the roots of *Z. montagnifolia* against *C. herbarum* showed a clear inhibitory effect (Figure 4). Agar dilution method using pure *ent*-kaurenoic and grandifloreonic acids (usually the main constituents of the root extracts of the plant) exhibited their involvement in the observed antifungal effect (Figure 4). As shown in Figure 4, the fungus perfectly grew in sole PDA medium ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), whereas an evident growth inhibition was observed as the concentration of each component assessed was increased ( $20\text{-}120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). These semi-quantitative experiments showed that the ethanolic extract containing both diterpenes

100.3±2.1 y 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, para el extracto etanólico, el ácido *ent*-kaurenoico y el ácido grandiflorénico, respectivamente (Figura 5). Diferencias significativas (p<0.01) fueron observadas entre los tratamientos (Figura 5). De éste modo, el uso de los extractos etanólicos debería ser considerado como una alternativa económica para futuros ensayos *in vivo*, con el objetivo de determinar su posible aplicación en el control biológico de *C. herbarum*. La actividad antimicrobiana de los diterpenos evaluados ya ha sido propuesta y confirmada en diversas especies bacterianas y fúngicas (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Este trabajo contribuye a la investigación de nuevas actividades antimicrobianas de extractos de plantas conteniendo *ent*-kaurenoides. Conside-



**Figure 5.** Comparación de los valores de la MIC de los extractos etanólicos de *Z. montagnifolia* (EE), el ácido *ent*-kaurenoico (KA) y el ácido grandiflorénico (GF) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cladosporium herbarum*. Las barras indican la desviación estándar de 5 repeticiones (n=5) y letras diversas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por ANOVA-Tukey test.

**Figure 5.** Comparison of MIC values of the ethanolic extract from *Z. montagnifolia* (EE), *ent*-kaurenoic acid (KA) and grandiflorenic acid (GF) in the *in vitro* growth of *Cladosporium herbarum*. Bars indicate the standard deviation of five repetitions (n=5) and diverse letters indicate significant differences between treatments by ANOVA-Tukey test (p<0.01).

was able to inhibit the normal grow of the fungus at less than 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. The assays performed with the broth microdilution method allowed to the obtainment of MIC values. These values reflected the concentration of the antimicrobial agent in which there are no signs of growth. The values were 150.4±3.5, 100.3±2.1, and 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, for ethanolic extract, kaurenoic acid and grandiflorenic acid, respectively (Figure 5). Significant differences (p<0.01) were observed among those treatments (Figure 5). Thus, the use of the ethanolic extract should be considered as a less expensive alternative for further *in vivo* trials in order to determine its possible use in the biological control of *C. herbarum*. The antimicrobial activity of these assayed diterpenes has been already proposed and confirmed in diverse bacterial and fungal species (Villa-Ruano *et al.*, 2016). This work contributes to the investigation of novel antimicrobial activities from plant extracts containing *ent*-kaurenoids. Considering that *Z. montagnifolia* can be found in the vegetation of those regions, its viability as a source for further antifungal *in vivo* test should be contemplated.

## CONCLUSIONS

A phytopathogenic fungus was isolated from the necrotic spots of diseased *A. angustifolia* plants collected in San Luis Amatlán Oaxaca, Mexico. Based upon molecular analyses and molecular characters the fungus was identified as *C. herbarum*. The ethanolic extracts and pure kaurenoids from *Z. montagnifolia* showed *in vitro* antifungal effect at <0.5 mg mL<sup>-1</sup> on this fungus.

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

rando que *Z. montagnifolia* puede ser localizada en la vegetación circundante de aquellas regiones, su viabilidad como un recurso para subsiguientes pruebas antifúngicas *in vivo*, debe ser contemplada.

## CONCLUSIONES

Un hongo fitopatógeno se aisló de las manchas necróticas provenientes de plantas sintomáticas *A. angustifolia* colectadas en San Luis Amatlán Oaxaca, Mexico. Basado en los análisis moleculares y caracteres morfológicos el hongo fue identificado como *C. herbarum*. Los extractos etanólicos y kauronoides puros de *Z. montagnifolia* mostraron un efecto antifúngico *in vitro* a  $<0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  sobre este hongo.

## LITERATURA CITADA

- Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., Ebner C., Prillinger H., Kraft D. and Breitenbach M. 1995. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Molecular Immunology* 32:213-227. [http://dx.doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)00108-D](http://dx.doi.org/10.1016/0161-5890(94)00108-D)
- Alonso S. F. B. 2012. *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. *Boletín del Archivo Nacional* 20:104-118. <http://www.arnac.cu/wp-content/uploads/2013/03/Cladosporium.pdf>
- Barbosa M.A.G., Rehn K.G., Menezes M. and Mariano R.L.R. 2001. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:98-104. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000200005>
- Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1-401. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch K., Groenewald J.Z., Braun U., Dijksterhuis J., Yáñez-Morales M.J. and Crous P.W. 2015. Common but different: the expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 82:23-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>
- Meave J.A., Romero-Romero M.A., Salas-Morales SH, Pérez-García EA, Gallardo-Cruz JA. 2012. Diversidad, amenazas y oportunidades para la conservación del bosque tropical caducifolio en el estado de Oaxaca, México. *Ecosistemas* 21:85-100. <http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/29/25>
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K. and Bolmström A. 2000. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3359-3361. <http://jcm.asm.org/content/38/9/3359.full.pdf+html>
- Schubert K. 2005. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 3. A revision of *Cladosporium* species described by J.J. Davis and H.C. Greene (WIS). *Mycotaxon* 92:55-76. <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/92/92-55.html>
- Valgas C., de Sousa S.M., Smania E.F.A., Smania A. (2007) Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369-380. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v38n2/v38n2a34.pdf>
- Villa-Ruano N., Betancourt-Jiménez M.G. and Lozoya-Gloria E. 2009. Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *Journal of Plant Physiology* 166:1961-1967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.004>
- Villa-Ruano N., Lozoya-Gloria E. and Pacheco Hernández Y. 2016. Kaurenoic acid: a diterpene with a wide range of biological activities. *In: Studies in Natural Products Chemistry Vol.51*, Atta-ur-Rahman (ed.) Elsevier. 151-174p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63932-5.00003-6>
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ (eds). Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 315-322 p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

# Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico

## Características patogénicas de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en México

**Julio César García-Rodríguez**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Las Huastecas, Carretera Tampico-Mante Kilómetro 55, Villa Cuauhtémoc, Altamira, Tamaulipas, C.P. 89610, México; **Mio Morishita, Masayasu Kato & Naoki Yamanaka\***, Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan. \* Autor para correspondencia: naokiy@affrc.go.jp.

**Recibido:** 30 de Enero, 2017.

**Aceptado:** 13 de Abril, 2017.

García-Rodríguez JC, Morishita M, Kato M, Yamanaka N. 2017. Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 338-349.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1701-5

Primera publicación DOI: 2 de mayo, 2017.

First DOI publication: May 2, 2017.

**Resumen.** En México, la roya asiática de la soya causada por *Phakopsora pachyrhizi* reduce el rendimiento del cultivo desde un 25 hasta un 80 %. El uso de variedades resistentes es la estrategia más rentable para el manejo de esta enfermedad. El objetivo del presente estudio fue determinar las características patogénicas de poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, con la finalidad de encontrar resistencia eficiente a dicho patógeno en germoplasma de soya. Para evaluar los perfiles patogénicos de cuatro poblaciones de *P. pachyrhizi*, colectadas en el noreste de México durante el 2015, se utilizaron 12 diferenciales de soya portando 0 - 3 genes

**Abstract.** In Mexico, the Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*, reduces soybean yield by 25 % to 80 %. The use of resistant cultivars is the most cost-effective strategy for management of this disease. The objective of this study was to determine the pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in Mexico in order to look for effective resistance in soybean germplasm. Using 12 soybean differentials carrying 0-3 resistance genes, the pathogenic profiles of four *P. pachyrhizi* populations sampled in northeastern Mexico in 2015, were evaluated. Three of the populations had similar pathogenic characteristics. Cluster analysis supported the distinction by the location of two clusters of Mexican *P. pachyrhizi* populations apart, in the dendrogram of South American and Japanese rust populations. This indicates a large variation in the soybean rust populations in Mexico. In addition, no soybean differential carrying a single resistance gene showed resistance to all the four Mexican populations; however, the differential carrying three genes was resistant to all the *P. pachyrhizi* populations. Therefore, introducing multiple



de resistencia. Tres poblaciones mostraron características patogénicas similares. El análisis clúster diferenció dos grupos en las poblaciones de *P. pachyrhizi* de México, los cuales se asociaron con la localidad de muestreo. El dendrograma no incluyó poblaciones de roya de Sudamérica y Japón en dichos grupos. Lo cual indicó una gran variación en las poblaciones de roya asiática de México. Por otro lado, ningún diferencial de soya portando un solo gen de resistencia fue resistente a las cuatro poblaciones mexicanas de roya; pero el diferencial con tres genes mostró resistencia a todas las muestras de *P. pachyrhizi*. Por lo tanto, el uso de germoplasma con múltiples genes de resistencia será útil para desarrollar variedades de soya resistentes a la roya asiática en México.

**Palabras clave:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, diferenciales de soya, piramidación de genes, patogenicidad

La roya asiática de la soya (ASR) causada por el patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, es una de las principales amenazas para la producción de dicha oleaginosa en los trópicos y subtropicos. En México, las pérdidas de rendimiento por la ASR oscilan entre el 25 y el 80 % (Terán-Vargas *et al.*, 2007), lo que hace necesario el uso del control químico (Yañez-López *et al.*, 2015). El estado de Tamaulipas, en el noreste de México, produce la mayor parte de soya en el país, aunque también posee el período más largo con condiciones climáticas favorables, para la infección del cultivo por la ASR (Yañez-López *et al.*, 2015). Dado que todas las variedades comerciales de soya que actualmente se utilizan en México son susceptibles a la ASR, el costo por la aplicación de fungicidas es elevado.

El uso de variedades de soya resistentes a la ASR se considera la estrategia más rentable para

resistencia genes in soybean breeding programs will be useful to develop rust-resistant cultivars in Mexico.

**Key words:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, differentials, gene pyramiding, pathogenicity

Asian soybean rust (ASR) caused by the pathogen *Phakopsora pachyrhizi*, is a major threat to soybean in the tropics and subtropics. In Mexico, yield losses caused by ASR range from 25 % to 80 % (Terán-Vargas *et al.*, 2007) making chemical control necessary (Yañez-López *et al.*, 2015). Tamaulipas in northeastern Mexico, has the highest soybean production in the country, but it also has the longest period with favorable weather conditions for ASR infection (Yañez-López *et al.*, 2015). Since all soybean commercial cultivars currently used in Mexico are susceptible to ASR, the cost of chemical control is high.

The use of resistant soybean cultivars to ASR is considered to be the most cost-effective strategy for disease management (Hartman *et al.*, 2005). Although seven ASR resistance genes have been reported, namely *Rpp* (resistance to *P. pachyrhizi*) *1* to *Rpp6* and *Rpp1-b*, they cannot be used for breeding without knowing which gene is effective against a given ASR population in a target region. Thus, pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in South American countries have been examined by the use of a differential soybean cultivar set (Akamatsu *et al.*, 2013; 2017). From the results, a breeding scheme for developing resistant cultivars has been implemented in South America, using a highly resistant soybean line carrying multiple resistance genes (Yamanaka *et al.*, 2013; 2015).

In Mexico, there are few reports on resistance to ASR in soybean germplasm (Peña-del-Río *et al.*,

el manejo de la enfermedad (Hartman *et al.*, 2005). Aunque se han reportado siete genes de resistencia a la ASR, identificados como *Rpp* (resistencia a *P. pachyrhizi*) 1 a *Rpp6* y *Rpp1-b*, no se pueden utilizar sin saber cuál gen es efectivo contra poblaciones específicas de ASR en cierta región. Así, las características patogénicas de poblaciones de *P. pachyrhizi* en países sudamericanos se han examinado mediante un conjunto de diferenciales de soya (Akamatsu *et al.*, 2013, 2017). A partir de los resultados, se ha implementado en Sudamérica un esquema de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades resistentes, utilizando una línea de soya que porta múltiples genes *Rpp* (Yamanaka *et al.*, 2013, 2015).

En México existen pocos reportes sobre germoplasma de soya con resistencia a la ASR (Peñadel-Río *et al.*, 2014). Debido a que se tiene poco conocimiento sobre cuáles genes *Rpp* confieren resistencia a poblaciones específicas de *P. pachyrhizi*, la incorporación de éstos no ha sido considerada en los programas de mejoramiento genético de soya. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las características patogénicas de poblaciones de *P. pachyrhizi* de México.

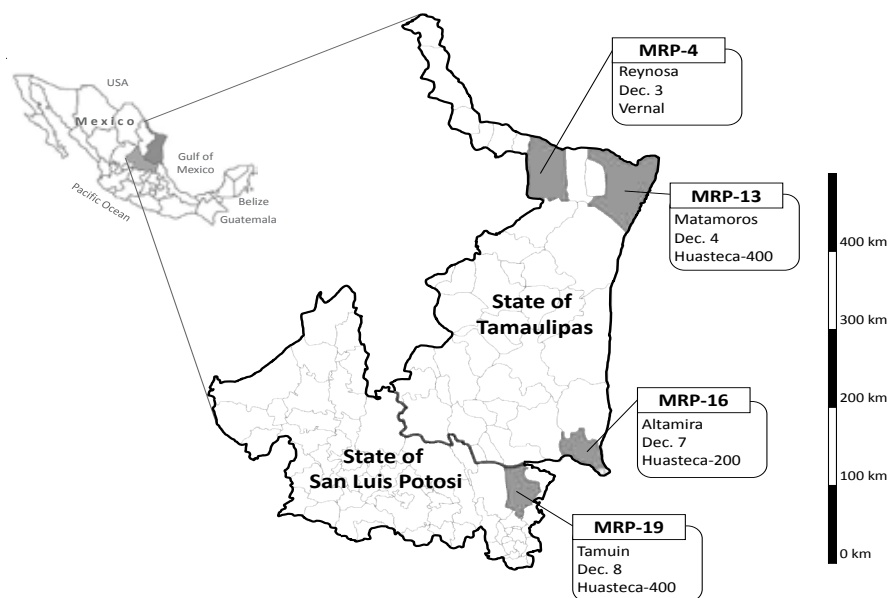
Durante el ciclo primavera-verano 2015, se colectaron en el noreste de México cuatro poblaciones de *P. pachyrhizi* en parcelas de soya no tratadas con fungicidas (Figura 1). Tres muestras se colectaron en los municipios de Reynosa, Matamoros y Altamira en el estado de Tamaulipas. En San Luis Potosí se colectó una población en el municipio de Tamuín. Las poblaciones se codificaron como MRP (población mexicana de roya asiática) -4, MRP-13, MRP-16 y MRP-19, respectivamente. En cada sitio de muestreo se recogieron varias hojas infectadas con ASR y se colocaron en una bolsa de plástico. Posteriormente se transfirieron a cajas de Petri y las hojas se cubrieron con algodón esterilizado y humedecido con agua destilada. Las muestras de

2014). Because little is known about which *Rpp* genes confer resistance to specific *P. pachyrhizi* populations, the incorporation of resistance genes in soybean has not been considered in breeding programs. Thus, the aim of this study was to determine the pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in Mexico.

During the 2015 soybean growing season, four *P. pachyrhizi* populations were sampled in fungicide-untreated soybean fields in northeastern Mexico (Figure 1). Three were sampled in the municipalities of Reynosa, Matamoros, and Altamira in the State of Tamaulipas. In the State of San Luis Potosí, one population was sampled in the municipality of Tamuín. They were coded as MRP (Mexican Asian Soybean Rust Population)-4, MRP-13, MRP-16, and MRP-19, respectively. At each site, several ASR-infected leaves were collected and placed in a plastic bag. Then, they were placed on Petri dishes and the leafstalks were covered with sterilized cotton moistened with distilled water. These samples were exported to Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Japan, under import permit 27Y935. After arrival, urediniospores on leaflets were collected and suspended in 2 or 3 mL of 0.04% Tween 20 solution. The urediniospore suspensions ( $10\text{--}25 \times 10^4$  spores/mL) were inoculated on susceptible cultivar BRS184 for multiplication according to Yamanaka *et al.* (2016). The multiplied urediniospores were used for the following experimental inoculations.

In this study, 12 soybean differentials were used (Yamanaka *et al.*, 2016) (Table 1); ten carry one of the ASR-resistance genes: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6*, or *Rpp1-b*; No6-12-1 carries *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5*; and BRS154 is the susceptible control.

Plants were grown in a growth chamber at 24 °C under a 14-h light period of approximately 19,000–23,000 lux provided by fluorescent lamps. The first



**Figura 1.** Localidades de México en donde se colectaron las poblaciones de *Phakopsora pachyrhizi* durante el 2015. En las etiquetas se indica el municipio, la fecha de muestreo y la variedad hospedera.  
**Figure 1.** Locations where *Phakopsora pachyrhizi* populations were collected in Mexico in 2015. Labels indicate municipality, sampling date, and host cultivar.

ASR se exportaron al Centro Internacional de Investigación en Ciencias Agrícolas de Japón (JIRCAS), bajo el permiso de importación 27Y935. Una vez en Japón, se aislaron las urediniosporas y se suspendieron en 2 ó 3 mL de solución Tween 20 al 0.04 %. La variedad BRS184, susceptible a ASR, se inoculó con las suspensiones de urediniosporas ( $10\text{-}25 \times 10^4$  esporas/mL) para su multiplicación (Yamanaka *et al.*, 2016). Las urediniosporas multiplicadas se utilizaron para las inoculaciones experimentales.

En este estudio se utilizaron 12 diferenciales de soya (Yamanaka *et al.*, 2016) (Cuadro 1); diez portan un solo gen de resistencia a ASR: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* o *Rpp1-b*; No6-12-1 porta tres genes: *Rpp2*, *Rpp4* y *Rpp5*; y BRS-154 fue el testigo susceptible.

Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento a 24 °C bajo un fotoperiodo de 14 h,

trifoliate leaflets were detached, inoculated with a urediniospore suspension ( $5 \times 10^4$  spores/mL), placed in Petri dishes, and incubated in a growth chamber at 21 °C under a 12-h light photoperiod of approximately 3,000 lux provided by fluorescent lamps. Fourteen days after inoculation, the rust sporulation level (SL) was visually assessed as nil (0), low (1), moderate (2), or high (3). Then, the urediniospores were removed with a paint brush, and the average number of uredinia per lesion (NoU) was determined microscopically in 30 lesions. The reaction type of each differential was classified as resistant (R), intermediate (IM), or susceptible (S), according to values of SL and NoU. This criterion and the SL standard are mentioned in Yamanaka *et al.* (2016).

The results were compared with those of 145 South American (Argentina, Brazil, and Paraguay), and eight Japanese ASR pathogens (Akamatsu *et*

**Cuadro 1** Reacciones de 12 diferenciales de soya a cuatro poblaciones de *Phakopsora pachyrhizi* colectadas en el noreste de México durante el 2015. Las frecuencias de reacciones resistentes a poblaciones de *P. pachyrhizi* de México, Sudamérica y Japón en los 12 diferenciales de soya también se incluyen en este cuadro.

**Table 1.** Reactions of 12 soybean differentials to four *Phakopsora pachyrhizi* populations collected in northeastern Mexico in 2015. The frequency of the resistant reaction to Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* populations in 12 soybean differentials is also included in this table.

| ID No. | Soybean differentials |                      |                       | Mexican <i>Phakopsora pachyrhizi</i> population |        |        |        | Frequency of resistant reaction <sup>§</sup> |               |         |
|--------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------------------------|--------|--------|--------|----------------------------------------------|---------------|---------|
|        | Genotype              | Alternative          | Resistance gene       | MRP-4                                           | MRP-13 | MRP-16 | MRP-19 | Mexico                                       | South America | Japan   |
| RDV1   | PI 200492             | Komata               | <i>Rpp1</i>           | S                                               | R      | S      | IM     | 25.0 %                                       | 4.3 %         | 100.0 % |
| RDV2   | PI 587886             | Bai Dou              | <i>Rpp1</i>           | S                                               | S      | S      | S      | 0.0 %                                        | 12.1 %        | 25.0 %  |
| RDV3   | PI 230970             | No. 3                | <i>Rpp2</i>           | IM                                              | S      | S      | S      | 0.0 %                                        | 23.7 %        | 50.0 %  |
| RDV4   | PI 462312             | Ankur                | <i>Rpp3</i>           | R                                               | R      | S      | R      | 75.0 %                                       | 45.0 %        | 100.0 % |
| RDV5   | PI 416764             | Akasaya              | <i>Rpp3</i>           | R                                               | R      | IM     | R      | 75.0 %                                       | 32.8 %        | 100.0 % |
| RDV6   | PI 459025             | Bing Nan             | <i>Rpp4</i>           | S                                               | IM     | S      | S      | 0.0 %                                        | 50.7 %        | 87.5 %  |
| RDV7   | PI 200526             | Shiranui             | <i>Rpp5</i>           | R                                               | R      | S      | R      | 75.0 %                                       | 76.1 %        | 100.0 % |
| RDV8   | PI 567102B            | MARIF 2767           | <i>Rpp6</i>           | R                                               | R      | S      | IM     | 50.0 %                                       | 66.7 %        | 100.0 % |
| RDV9   | PI 587880A            | Huang Dou            | <i>Rpp1-b</i>         | S                                               | S      | R      | S      | 25.0 %                                       | 83.8 %        | 100.0 % |
| RDV10  | PI 594767A            | Zhao Ping<br>Hei Dou | <i>Rpp1-b</i>         | S                                               | S      | S      | S      | 0.0 %                                        | 86.5 %        | 100.0 % |
| RDV11  | BRS154                | -                    | -                     | S                                               | S      | S      | S      | 0.0 %                                        | 0.0 %         | 0.0 %   |
| RDV12  | No6-12-1              | -                    | <i>Rpp2+Rpp4+Rpp5</i> | R                                               | R      | R      | R      | 100.0 %                                      | 97.8 %        | 100.0 % |

<sup>§</sup>Los datos de las poblaciones de Sudamérica fueron tomados de los reportes de Akamatsu *et al.* (2013; 2017), y los de las poblaciones de Japón de Yamanaka *et al.* (2015) y Yamaoka *et al.* (2014). S = Susceptible; IM = Intermedia; R = Resistente / <sup>§</sup>Data of South American populations were used from the reports by Akamatsu *et al.* (2013; 2017), and that of Japanese populations by Yamanaka *et al.* (2015) and Yamaoka *et al.* (2014). S = Susceptible; IM = Intermediate; R = Resistant

aproximadamente 19,000-23,000 lux proporcionados por lámparas fluorescentes. Los primeros folíolos trifoliados se separaron de las plantas, se inocularon con la suspensión de urediniosporas ( $5 \times 10^4$  esporas/mL), se colocaron en cajas de Petri y se incubaron en una cámara de crecimiento a 21 °C bajo un fotoperíodo de 12 h, aproximadamente 3,000 lux proporcionados por lámparas fluorescentes. Catorce días después de la inoculación, el nivel de esporulación de la roya (SL) se evaluó visualmente como nulo (0), bajo (1), moderado (2) o alto (3). Enseguida se retiraron las urediniosporas con un pincel y se determinó el número promedio de uredinias por lesión (NoU) en 30 lesiones. El tipo de reacción en cada diferencial se clasificó como resistente (R), intermedio (IM) o susceptible

*al.*, 2013, 2017; Yamaoka *et al.*, 2014), in which the data were obtained using the same soybean differentials. The reactions were changed to numerical scores: R=0, IM=1, and S=2. Distance matrices were prepared by calculating Euclidian distances between samples in R v. 3.0.1 software (<https://www.r-project.org>), and input into a hierarchical clustering function, which constructed a dendrogram based on the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Population MRP-19 caused a resistant reaction in differential PI 462312, PI 416764, PI 200526, and No6-12-1 (Table 1); MRP-4 had similar effect on those differentials and in addition in PI 567102B. MRP-13 caused a resistant reaction in the same differentials as MRP-4, and in addition in PI

(S), de acuerdo con los valores de SL y NoU. Estos criterios, así como el procedimiento para determinar el SL se mencionan en Yamanaka *et al.* (2016).

Los resultados fueron comparados con los obtenidos de 145 poblaciones de ASR procedentes de países sudamericanos (Argentina, Brasil y Paraguay) y ocho de Japón (Akamatsu *et al.*, 2013, 2017; Yamaoka *et al.*, 2014), en donde se utilizaron los mismos diferenciales de soya. Las reacciones se convirtieron a valores numéricos: R=0, IM=1 y S=2. Se prepararon matrices de distancia, calculando las distancias Euclidianas entre muestras con el software R v. 3.0.1 (<https://www.r-project.org>), y se sometieron a una función de agrupación jerárquica, que construyó un dendrograma basado en el método de grupo de pares no ponderado, utilizando la media aritmética (UPGMA).

La población MRP-19 causó reacciones resistentes en los diferenciales PI 462312, PI 416764, PI 200526 y No6-12-1 (Cuadro 1); MRP-4 tuvo un efecto similar sobre los mismos diferenciales y además en PI 567102B. Los diferenciales que fueron resistentes a MRP-4 y PI 200492 fueron resistentes a MRP-13, mientras que MRP-16 causó reacciones de resistencia sólo en PI 587880A y No6-12-1. Aunque las poblaciones MRP-13, -4 y -19 produjeron reacciones similares sobre los diferenciales, éstas mostraron algunas diferencias en sus patrones patogénicos: MRP-4 y -13 generaron lesiones distintas en los diferenciales PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*) y PI 459025 (*Rpp4*).

MRP-4 produjo menos de 30 lesiones en PI 200492 (*Rpp1*), PI 416764 (*Rpp3*) y No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*); mostró solamente cinco lesiones en PI 200492, pero estas lesiones produjeron altos niveles de uredinia con abundantes urediniosporas (NoU = 4.2, SL = 3), dando como resultado el fenotipo S. Por el contrario, en PI 200492 la población MRP-13 produjo menores niveles de uredinia y de urediniosporas (NoU=0.8, SL=1), mostrando

200492, while MRP-16 caused a resistant reaction in PI 587880A and No6-12-1. Although populations MRP-13, -4, and -19 showed similar behavior on differentials, there were some differences in their pathogenic patterns. Populations MRP-4 and -13 produced different lesion types on differentials PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*), and PI 459025 (*Rpp4*).

MRP-4 produced less than 30 lesions on PI 200492 (*Rpp1*), PI 416764 (*Rpp3*), and No6-12-1 (*Rpp2+Rpp4+Rpp5*). It produced only five lesions on PI 200492, but these lesions had many uredinia with abundant urediniospores (NoU=4.2, SL=3), giving S phenotype. Conversely, MRP-13 produced fewer uredinia and less urediniospores (NoU=0.8, SL=1), giving R phenotype to PI 200492. S and IM phenotypes were observed on PI 230970 and PI 459025 by MRP-13 inoculation, respectively; while IM and S phenotypes were observed on these differentials by MRP-4 inoculation, respectively. MRP-19 caused the same reactions on most differentials as MRP-4 and -13, but it caused an intermediate reaction on PI 567102B (*Rpp6*), which was resistant to MRP-4 and -13. This population also showed a different reaction on PI 200492 from MRP-4 and -13 (Table 1). As a result, MRP-13, -4, and -19 showed rather similar pathogenic patterns on the 12 soybean differentials. Aside from the differential pathogenicity, MRP-16 was the most virulent to the differentials. It caused a susceptible reaction in nine differentials, while in PI 416764 (*Rpp3*) it was intermediate, and resistant in PI 587880A (*Rpp1-b*) and No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*). MRP-16 produced few uredinia and urediniospores on PI 587880A (NoU=1.0, SL=0.8), and did not sporulate in No6-12-1 (NoU=0.0, SL=0.0).

The UPGMA dendrogram revealed that MRP-4, -13, and -19 made a single cluster distantly from MRP-16; these two clusters of Mexican

el fenotipo R. Fenotipos S e IM se observaron en PI 230970 y PI 459025 con la inoculación de MRP-13, respectivamente; mientras que fenotipos IM y S se registraron en los mismos diferenciales con la inoculación de MRP-4, respectivamente. MRP-19 provocó las mismas reacciones que MRP-4 y -13 en la mayoría de los diferenciales, pero la reacción fue intermedia en PI 567102B (*Rpp6*), el cual fue resistente a MRP-4 y -13. Esta población también mostró reacciones diferentes en PI 200492 en comparación con MRP-4 y -13 (Tabla 1). Por lo tanto, MRP-13, -4 y -19 tuvieron perfiles patogénicos muy similares en los 12 diferenciales de soya. MRP-16 fue la población más virulenta. Ésta produjo reacciones susceptibles en nueve diferenciales, mientras que en PI 416764 (*Rpp3*) fueron intermedias y en PI 587880A (*Rpp1-b*) y No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*) resistentes. MRP-16 produjo pocas uredinias y urediniosporas en PI 587880A (NoU = 1.0, SL = 0.8) y no esporuló en No6-12-1 (NoU = 0.0, SL = 0.0).

El dendrograma UPGMA reveló que MRP-4, -13 y -19 formaron un grupo distante de MRP-16; estos grupos no incluyeron poblaciones de *P. pachyrhizi* de Sudamérica y Japón (Figura 2). MRP-16, población altamente virulenta, se agrupó en el conjunto principal de muestras sudamericanas, mientras que el grupo formado por MRP-4, -13 y -19 se localizó distantemente, aunque algunas poblaciones de Japón y Paraguay formaron un grupo aparte.

Los perfiles patogénicos de las poblaciones MRP-4, -13 y -19 no fueron idénticos pero mostraron similitudes (Cuadro 1). Las semejanzas en la patogenicidad de MRP-4 y -13 podrían explicarse por la proximidad de los lugares de muestreo; ambas poblaciones se colectaron en el norte de Tamaulipas, aproximadamente a 80 km de distancia entre cada sitio. MRP-19, que causó reacciones similares a MRP-4 y -13 en la mayoría de los diferenciales,

*P. pachyrhizi* populations did not contain any populations from South America and Japan (Figure 2). The highly virulent MRP-16 belonged to the major cluster of South American samples, while the MRP-4, -13, and -19 cluster was located distantly from the South American samples even though there were some Japanese and Paraguayan samples which made a cluster outside of them.

MRP-4, -13, and -19 showed not identical but similar pathogenic profiles (Table 1). Similarities in pathogenicity between MRP-4 and -13 could be due to the proximity of the sampling locations; both were collected in northern Tamaulipas about 80 km apart. MRP-19, which caused similar responses as MRP-4 and -13 in most differentials was collected in the State of San Luis Potosi (Huasteca region), approximately 450 km from the sampling sites of MRP-4 and -13, but 75 km from that of MRP-16. It was expected that the pathogenicity of MRP-19 would be similar to that of MRP-16, however, it was not the case (Table 1, Figure 2). This means that geographical differentiation in pathogenicity is rather limited in Mexican ASR pathogen within a small region in Mexico, unlike *P. pachyrhizi* populations collected in a small area in Japan which showed six races (Yamaoka *et al.*, 2014). MRP-16 showed the highest virulence among the four Mexican *P. pachyrhizi* populations. Uredinia and urediniospores were observed except in differential No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*), which it indicates that the MRP-16 population includes at least one race which is virulent to any *Rpp* gene that the differentials carry. According to these observations, Mexican ASR pathogen has high pathogenic diversity and strong virulence to resistant soybean differentials.

Frequencies of resistant reactions observed in soybean differentials by the inoculations of Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* populations show a clear difference between

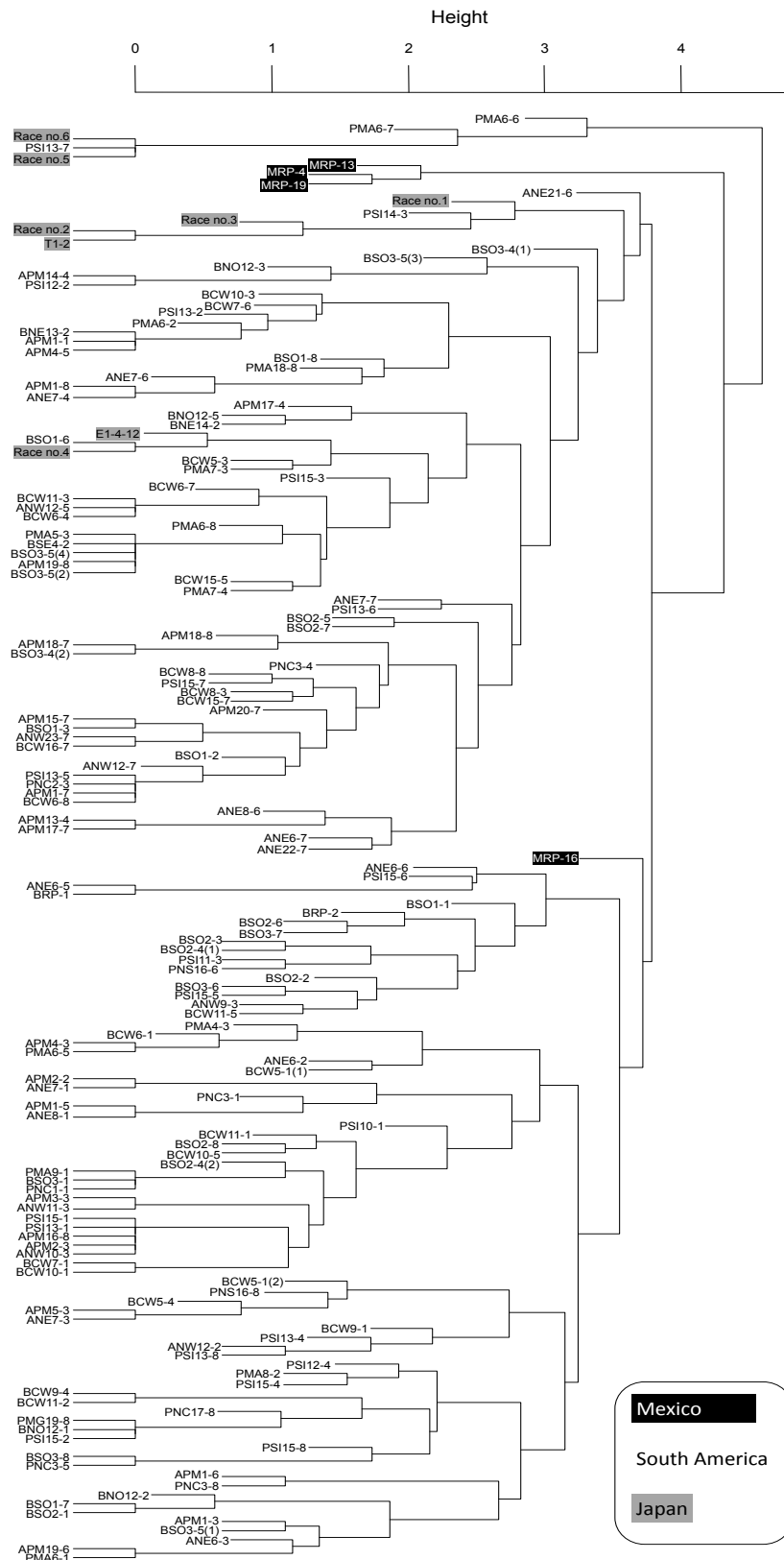


Figura 2. Dendrograma UPGMA que presenta las relaciones entre cuatro poblaciones mexicanas de *Phakopsora pachyrhizi*, 145 de Sudamérica y ocho de Japón, el cual se basa en la patogenicidad mostrada sobre 12 diferenciales de soja. Las poblaciones de México y Japón están coloreadas de negro y gris, respectivamente. Las poblaciones de Sudamérica están etiquetadas con ‘A’ para Argentina, ‘B’ para Brasil y ‘P’ para Paraguay. Los datos de las poblaciones de Sudamérica fueron tomados de los reportes de Akamatsu *et al.* (2013; 2017), y los de las poblaciones de Japón de Yamanaka *et al.* (2015) y Yamaoka *et al.* (2014).

Figure 2. UPGMA dendrogram of the relationships among four Mexican, 145 South American, and eight Japanese *Phakopsora pachyrhizi* populations based on pathogenicity on 12 soybean differentials. Mexican and Japanese populations are colored with black and gray, respectively. South American populations are labeled as ‘A’ for Argentina, ‘B’ for Brazil, and ‘P’ for Paraguay. Data of South American populations were used from the reports by Akamatsu *et al.* (2013; 2017), and those from Japan by Yamanaka *et al.* (2015) and Yamaoka *et al.* (2014).

se colectó en el estado de San Luis Potosí (región Huasteca), aproximadamente a 450 km de los sitios de muestreo de MRP-4 y -13, pero a 75 km del sitio de colecta de MRP-16. Se esperaría que la patogenicidad de MRP-19 fuera parecida a la de MRP-16, sin embargo no fue el caso (Cuadro 1, Figura 2). Esto significa que, considerando la diferenciación geográfica, la patogenicidad de las poblaciones mexicanas de ASR se encuentra limitada a pequeñas regiones, a diferencia de las poblaciones de *P. pachyrhizi* colectadas en una área reducida de Japón, en donde se identificaron seis razas (Yamaoka *et al.*, 2014). MRP-16 presentó la mayor virulencia de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*. Se observaron uredinias y urediniosporas en todos los diferenciales, excepto en No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*), indicando que MRP-16 incluye al menos una raza que es virulenta a cualquier gen *Rpp* de los diferenciales. De acuerdo con estas observaciones, la ASR en México presenta alta diversidad patogénica y es fuertemente virulenta a los diferenciales de soya evaluados.

Las frecuencias de las reacciones resistentes en los diferenciales que portan el gen *Rpp1-b* con la inoculación de los patógenos de *P. pachyrhizi* de México, Sudamérica y Japón, muestran una clara diferencia entre las poblaciones mexicanas y las poblaciones procedentes de las otras dos regiones. *Rpp1-b* de los diferenciales PI 587880A y PI 594767A fue resistente a > 80 % de las poblaciones de ASR de Japón y Sudamérica. Por el contrario, fue menos eficiente contra las poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, ya que PI 587880A fue susceptible a tres de las cuatro poblaciones y PI 594767A fue susceptible a todas (Cuadro 1). Otra diferencia significativa entre las poblaciones mexicanas, sudamericanas y japonesas de *P. pachyrhizi* se detectó en PI 459025: hubo reacciones resistentes en aproximadamente el 50 y el 90 % de las poblaciones de Sudamérica y Japón, respectivamente;

Mexican and the other two regional populations in *Rpp1-b* carrying differentials. *Rpp1-b* conferred PI 587880A and PI 594767A resistance to >80 % of ASR populations from Japan and South America. In contrast, it was less effective against Mexican *P. pachyrhizi* populations, since PI 587880A was susceptible to three of the four populations and PI 594767A was susceptible to all (Table 1). Another significant difference among Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* population was detected in PI 459025: a resistant reaction was detected in about 50 % and 90 % of South American and Japanese *P. pachyrhizi* populations, respectively; however, resistant reaction was not observed by the inoculation with Mexican *P. pachyrhizi* populations.

The ineffectiveness of *Rpp1-b* detected in Mexico was previously observed in the USA (Li, 2009; Walker *et al.*, 2014). The pathogenic similarity between the ASR populations from Mexico and the USA is also observed in *Rpp3*; it caused resistance reactions to most of the ASR pathogens (Walker *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2015). On the other hand, *Rpp5* (PI 200526) showed a geographical difference between Mexico and USA, conferring resistance to three of the four Mexican *P. pachyrhizi* populations, as well as to all Japanese and most South American *P. pachyrhizi* populations (Table 1), but its susceptibility to 24 USA *P. pachyrhizi* populations was reported (Paul *et al.*, 2015). Therefore, the virulence of Mexican pathogen to *Rpp5*, like that of South American and Japanese pathogens, is different from those from the USA.

Most *P. pachyrhizi* populations in South America are virulent to *Rpp1* (PI 200492 and PI 587886). In contrast, Japanese ASR populations were avirulent to these differentials (Yamanaka *et al.*, 2010; Yamaoka *et al.*, 2014). In the USA, *Rpp1* (PI 200492) was resistant in most cases (Li, 2009;



sin embargo, con las poblaciones mexicanas no se observó resistencia.

La ineficiencia de *Rpp1-b* detectada en México se observó previamente en Estados Unidos (Li, 2009; Walker *et al.*, 2014). La similitud patogénica entre las poblaciones de ASR de México y Estados Unidos también se observa en *Rpp3*; ya que fue resistente a la mayoría de los patógenos de ASR (Walker *et al.*, 2014, Paul *et al.*, 2015). Por otro lado, *Rpp5* (PI 200526) mostró diferencias geográficas entre México y Estados Unidos, confiriendo resistencia a tres de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, así como a todas las poblaciones japonesas y a la mayoría de las sudamericanas; sin embargo, Paul *et al.* (2015) informó sobre su susceptibilidad a 24 poblaciones estadounidenses de ASR. Por lo tanto, la virulencia del patógeno en México a *Rpp5*, al igual que la del patógeno en Sudamérica y Japón, es diferente a la del patógeno en Estados Unidos.

La mayoría de las poblaciones de *P. pachyrhizi* en Sudamérica son virulentas a *Rpp1* (PI 200492 y PI 587886). Mientras que las poblaciones de Japón no provocaron síntomas en estos diferenciales (Yamanaka *et al.*, 2010; Yamaoka *et al.*, 2014). En Estados Unidos, *Rpp1* (PI 200492) fue resistente en la mayoría de los casos (Li, 2009; Li *et al.*, 2012; Twizeyimana y Hartman, 2012; Walker *et al.*, 2014), pero en México, PI 200492 fue resistente a MRP-13, intermedia a MRP-19 y susceptible a MRP-4 y -16. Dado que MRP-4 produjo sólo pocas lesiones, es probable que la mayoría de las reacciones fueron de inmunidad, o que una raza dominante en MRP-4 fue asintomática en PI 200492. En este sentido, las poblaciones mexicanas de ASR evaluadas son moderadamente virulentas a *Rpp1* (PI 200492), características que son diferentes a las de Sudamérica, Estados Unidos y Japón. En general, las poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* presentan características patogénicas diferentes en comparación con las poblaciones de dichas regiones..

Li *et al.*, 2012; Twizeyimana and Hartman, 2012; Walker *et al.*, 2014), but in Mexico, PI 200492 was resistant to MRP-13, intermediate to MRP-19, and susceptible to MRP-4 and -16. Since MRP-4 produced only few lesions, suggesting that most reactions might have been of immunity, or that a dominant race in MRP-4 might be avirulent to PI 200492. The tested Mexican ASR populations, therefore, are moderately virulent to *Rpp1* (PI 200492) and the characteristics are different from those in South America, the USA, and Japan. Overall, Mexican *P. pachyrhizi* populations may have different characteristics from the pathogens from those regions.

Genes *Rpp2* (PI 230970), *Rpp1* (PI 587886), *Rpp4* (PI 459025), and *Rpp1-b* (PI 594767A) are useless for conferring resistance to ASR in Mexican soybean cultivars, since none conferred resistance to the four MRPs. In addition, *Rpp1* (PI 200492) and *Rpp1-b* (PI 587880A) conferred adequate resistance to only one of the four populations (Table 1), therefore, they would have a very limited use for soybean breeding in Mexico. Peña-del-Río *et al.* (2014) identified 23 genotypes with low susceptibility to the Mexican *P. pachyrhizi* population in 2007; two (PI 230970 and PI 417125) carried the *Rpp2* gene. Thus, *Rpp2* may have become ineffective against ASR in Mexico from 2007 to 2015.

Since *Rpp3* (PI 462312 and PI 416764) and *Rpp5* (PI 200526) conferred resistance to three of the populations, and *Rpp6* (PI 567102B) to two (Table 1), they could be useful as sources of resistance in soybean breeding in Mexico. However, it would be risky to use these genes singly, as none of the differentials carrying single *Rpp* genes showed resistance to all four Mexican populations. Only No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) was resistant to the four populations, and remained free of uredinia and urediniospore production, indicating that gene pyramiding (Yamanaka *et al.*, 2015) may confer to

Los genes *Rpp2* (PI 230970), *Rpp1* (PI 587886), *Rpp4* (PI 459025) y *Rpp1-b* (PI 594767A) no son útiles para conferir resistencia a la ASR en las variedades mexicanas de soya, ya que ninguno mostró resistencia a las cuatro MRPs. Además, *Rpp1* (PI 200492) y *Rpp1-b* (PI 587880A) confirieron resistencia a una de las cuatro poblaciones solamente (Cuadro 1), por lo tanto, su uso en la generación de variedades mexicanas de soya resistentes a ASR sería muy limitado. Peña-del-Río *et al.* (2014) identificaron 23 genotipos de soya con baja susceptibilidad a poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* en 2007; dos (PI 230970 y PI 417125) portando el gen *Rpp2*. Por lo que se sugiere que en México, *Rpp2* ha mostrado ineficiencia contra ASR en el periodo de 2007 a 2015.

Considerando que *Rpp3* (PI 462312 y PI 416764) y *Rpp5* (PI 200526) son resistentes a tres de las poblaciones, y *Rpp6* (PI 567102B) a dos (Tabla 1), podrían utilizarse como fuentes de resistencia en México. Sin embargo, el uso de estos genes por separado constituye un riesgo, ya que ninguno de los diferenciales que portan un solo gen *Rpp*, mostraron resistencia a las cuatro poblaciones mexicanas de ASR. Solamente No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) fue resistente a las cuatro muestras del patógeno, no produciendo uredinias ni urediniosporas, lo que indica que la pirimidación de genes (Yamanaka *et al.*, 2015), puede conferir alto nivel de resistencia a un espectro amplio de razas de *P. pachyrhizi* en México.

## CONCLUSIONES

Una de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* mostró alta virulencia en los diferenciales de soya resistentes y su patogenicidad fue completamente diferente a la de las otras tres. La patogenicidad de las poblaciones mexicanas de ASR

soybeans not only resistance to a broad range of *P. pachyrhizi* races in Mexico but also a high level of resistance.

## CONCLUSIONS

One of four Mexican *P. pachyrhizi* populations used in this study showed high virulence on resistant soybean differentials and quite different pathogenicity from the other three. Pathogenicity of Mexican populations was different from South American and Japanese ones which indicates that there should be highly virulent and diverse *P. pachyrhizi* races in Mexico. Gene-pyramiding such as the combination of *Rpp2*+*Rpp4*+*Rpp5*, is necessary to confer adequate and stable ASR resistance to soybean cultivars in Mexico.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) for providing seeds of the single-gene differential varieties. We are deeply grateful to Dr. Héctor Cortinas-Escobar and M.C. Nicolás Maldonado-Moreno (INIFAP), and to Ing. Iván Ausencio Delgado-Robles (CESAVETAM, Altamira) for their help during collection of ASR samples in Mexico. We are also deeply grateful to Mses. Yukie Muraki, and Midori Hasegawa (JIRCAS) for their technical assistance.

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

fue diferente a la de las poblaciones de Sudamérica y Japón, indicando que puede haber razas de *P. pachyrhizi* altamente virulentas y diversas en México. La pirimidación de genes, como es el caso de la combinación de *Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*, es necesaria

para conferir resistencia estable a ASR en las variedades de soya en México.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (Embrapa) por proporcionar la semilla de los diferenciales de soya que portan un solo gen. Expresamos nuestro profundo agradecimiento al Dr. Héctor Cortinas-Escobar y al M.C. Nicolás Maldonado-Moreno (INIFAP), y al Ing. Iván Ausencio Delgado-Robles (CESAVETAM, Altamira) por su ayuda durante la colecta de muestras de ASR en México. También muchas gracias a las Sritas. Yukie Muraki y Midori Hasegawa (JIRCAS) por su asistencia técnica.

#### LITERATURA CITADA

- Akamatsu H., Yamanaka N., Soares R.M., Ivancovich A.J.G., Lavilla M.A., Bogado A.N., Morel G., Scholz R., Yamaoka Y., and Kato M. 2017. Pathogenic variation of South American *Phakopsora pachyrhizi* populations isolated from soybeans from 2010 to 2015. *Japan Agricultural Research Quarterly* (in press).
- Akamatsu H., Yamanaka N., Yamaoka Y., Soares R.M., Morel W., Ivancovich A.J.G., Bogado A.N., Kato M., Yori-nori J.T., and Suenaga K. 2013. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of General Plant Pathology* 79:28–40. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-012-0421-7>
- Hartman G.L., Miles M.R., and Frederick R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease* 89:664–666. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Hartman G.L., Miles M.R., and Frederick R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease* 89:664–666. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Li S. 2009. Reaction of soybean rust-resistant lines identified in Paraguay to Mississippi isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Crop Science* 49:887–894. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0305>
- Li S., Smith J.R., Ray J.D., and Frederick R.D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics* 125:133–142. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1821-y>
- Paul C., Frederick R.D., Hill C.B., Hartman G.L., and Walker D.R. 2015. Comparison of pathogenic variation among *Phakopsora pachyrhizi* isolates collected from the United States and international locations, and identification of soybean genotypes resistant to the US isolates. *Plant Disease* 99:1059–1069. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0989-RE>
- Peña-del-Río M.L.Á., Maldonado-Moreno N., and Díaz-Franco A. 2014. Reaction of germplasm to *Phakopsora pachyrhizi* in the field. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:225–227.
- Terán-Vargas AP, Ascencio-Luciano G, Maldonado-Moreno N, and Ávila-Valdez J. 2007. La roya asiática de la soya en México. Tamaulipas, Mexico. CIRNE-INIFAP. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/818>
- Twizeyimana M., and Hartman G.L. 2012. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean in the United States from 2006 to 2009. *Plant Disease* 96:75–81. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0379>
- Walker D.R., Harris D.K., King Z.R., Li Z., Boerma H.R., Buckley J.B., Shipe E.R., Mueller J.D., Weaver D.B., Sikora E.J., Moore S.H., Hartman G.L., Miles M.R., Harris D.K., Wright D.L., Marois J.J., and Nelson R.L. 2014. Evaluation of soybean germplasm accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* populations in the southeastern United States, 2009–2012. *Crop Science* 54:1673–1689. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2013.08.0513>
- Yamanaka N., Yamaoka Y., Kato M., Lemos N.G., Passianotto A., dos Santos J.V.M., Benitez E.R., Abdelnoor R.V., Soares R.M., and Suenaga K. 2010. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. *Tropical Plant Pathology* 35:153–162. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-567620100003>
- Yamanaka N., Lemos N.G., Uno M., Akamatsu H., Yamaoka Y., Abdelnoor R.V., Braccini A.L., and Suenaga K. 2013. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three *Rpp* genes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13:75–82. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332013000100009>
- Yamanaka N., Morishita M., Mori T., Lemos N.G., Hossain M.M., Akamatsu H., Kato M., and Yamaoka Y. 2015. Multiple *Rpp*-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. *Tropical Plant Pathology* 40:283–290. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-015-0038-4>
- Yamanaka N., Kato M., Akamatsu H., and Yamaoka Y. 2016. Laboratory manual for studies on soybean rust resistance. [www.jircas.affrc.go.jp/english/manual/soybean\\_rust/soybean\\_rust.html](http://www.jircas.affrc.go.jp/english/manual/soybean_rust/soybean_rust.html). (Accessed on February, 2016).
- Yamaoka Y., Yamanaka N., Akamatsu H., and Suenaga K. 2014. Pathogenic races of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* collected in Tsukuba and vicinity in Ibaraki, Japan. *Journal of General Plant Pathology* 80:184–188. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-014-0507-5>
- Yañez-López R., Hernández-Zul M.I., Quijano-Carranza J.A., Terán-Vargas A.P., Pérez-Moreno L., Díaz-Padilla G., and Rico-García, E. 2015. Potential distribution zones for soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2:291–302. <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v2n6/v2n6a5.pdf>