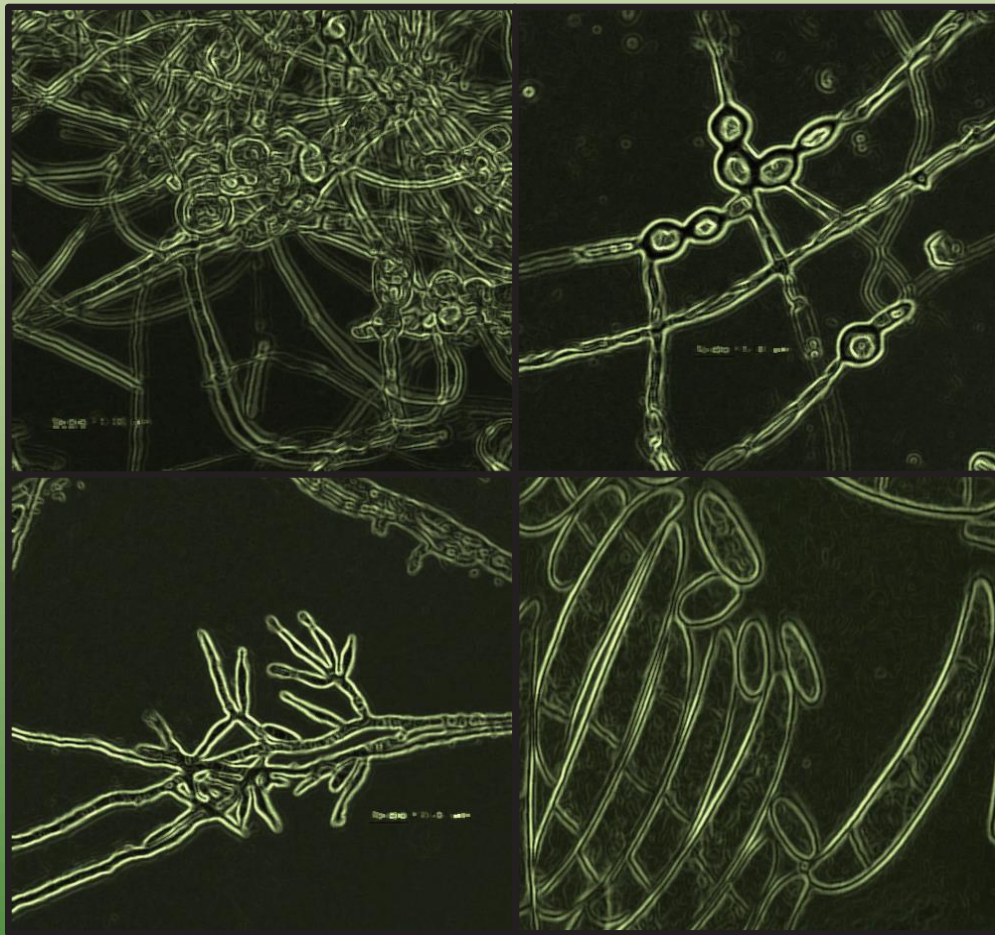


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 37, NÚMERO 1, Enero 2019



**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

Ing. Yanet Hidalgo Clavijo

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.

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

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

Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza, CONACyT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Colegio de Postgraduados

Dra. Liliana Carolina Córdova Albores, Universidad de La Salle Bajío

Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza, Colegio de Postgraduados

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, UASLP-CONACYT

Dr. Jesús Gaudencio Aquino Martínez, ICAMEX

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

Dr. Jesus Ricardo Sánchez Pale, UAEM

Dr. José Luciano Morales García, UMSNH

Dr. Hernán García Ruíz, UNL, USA

Dr. Raúl Allende Molar, CIAD

Dr. Cristiano Souza Lima, Universidade Federal do Ceará

Dr. José María Tun Suárez, Tecnológico Nacional de México.

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM

Portada: Superior de izquierda a derecha: Morfología de clamidosporas de *F. oxysporum* y *F. brachygibbosum*.

Inferior de izquierda a derecha: Polifálides y monofálides de *F. brachygibbosum* y macroconidios y microconidios de *F. falciforme*.

Original: Ing. Miguel Ángel Guerra Camacho pág. 24.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Induced resistance to *Puccinia sorghi* and tar spot complex (*Phyllachora maydis* and others) in maize (*Zea mays*)* Inducción de resistencia a *Puccinia sorghi* y complejo mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y otros) en maíz (*Zea mays*). 1
Díaz-Morales F, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Mendoza-Castillo MC.

Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México* Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México. 16
Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Meza-Moller AC, Guzmán-Ortíz JM.

Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to Wheat Blast disease* Evaluación de trigos sintéticos hexaploides para resistencia a la enfermedad Piricularia o Brusone. 35
Cazal-Martínez CC, Chávez AR, Reyes-Caballero YM, Kohli MM, Pérez-Estigarribia PE.

Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex* Respuesta de genotipos de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez. 50
Vallejo-Gutiérrez AJ, Mejía-Carranza J, García Velasco R, Ramírez-Gerardo MG.

Applied regional epidemiology to the inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, México* Epidemiología regional aplicada a la caracterización inductiva y pronóstico de la mancha gris del agave azul (*Cercospora agavicola*) en Jalisco, México. 71
Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC, Rubio-Cortés R.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN * REVIEW ARTICLES

A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction* Un nuevo enfoque molecular en el estudio de la interacción parásito-hospedero. 95
Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR.

Biological, anaerobic and reductive soil disinfestation to the soil for control of harmful organisms to plants* Desinfestación biológica, anaerobia y reductiva al suelo para el control de organismos dañinos a plantas. 115
Samaniego-Gaxiola JF, Chew-Madinaveitia Y, Gaytán-Mascorro A, Pedroza-Sandoval A.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds* Evaluación de la transmisión de begomovirus por semilla de jamaica y malezas asociadas. 135

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J, Ramírez-Rojas S, Gutiérrez-Gallegos JA.

Performance of native accessions of *Carica papaya* inoculated with PRSV-p using *Aphis nerii** Comportamiento de accesiones nativas de *Carica papaya* inoculadas con PRSV-p mediante *Aphis nerii*. 147

Flores-Bautista R, Ávila-Reséndiz C, Villanueva-Jiménez JA, Nava-Díaz C, Becerra-Leor EN.

Fusarium sambucinum* Fuckel causal agent of fruit rot of manzano chilli pepper (*Capsicum pubescens*) in Mexico *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. 159

Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Tlatilpa-Santamaría IF and Nieto-Angel D.

The Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma is present in *Citrus spp* in Hidalgo state, Mexico* El Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma está presente en *Citrus spp* en Hidalgo, México. 170

Martínez-Bustamante VI, Hernández-Juárez C, Hernández Vázquez Y, López-Buenfil JA, Blanco-Rodríguez E, Arroyo-Cruz E, Mora-Aguilera G.

REPORTES FITOPATOLÓGICOS * PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS

First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico* Primer reporte de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en Michoacán, México. 185

Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA, Ochoa-Martínez DL.

First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico* Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México. 193

Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN, de los Santos-Villalobos S.

Induced resistance to *Puccinia sorghi* and tar spot complex (*Phyllachora maydis* and others) in maize (*Zea mays*)

Inducción de resistencia a *Puccinia sorghi* y complejo mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y otros) en maíz (*Zea mays*)

Federico Díaz Morales, Carlos De León García de Alba*, Cristian Nava Díaz, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; María del Carmen Mendoza Castillo, Posgrado en Genética, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México.
*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 18 de Julio, 2018.

Aceptado: 25 de Septiembre, 2018.

Díaz-Morales F, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Mendoza-Castillo MC. 2018. Induced resistance to *Puccinia sorghi* and tar spot complex (*Phyllachora maydis* and others) in maize (*Zea mays*). Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 1-15.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1807-6

Primera publicación DOI: 16 de Octubre, 2018.

First DOI publication: October 16, 2018.

Resumen. Para demostrar la eficiencia de productos inductores de la resistencia a enfermedades en maíz, en 2016 y 2017 se establecieron ensayos en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Toluca, con el híbrido de maíz comercial BG1384W, donde se estudió la eficiencia de seis agroquímicos como inductores de resistencia, incluyendo Fosetil-Al, Acibenzolar-S-metil, *Bacillus subtilis*, Tebuconazole + Trifloxystrobin, Proteína Harpin y Clothianidin + *Bacillus firmus*, para controlar la roya común (*Puccinia sorghi* Schw.) y el complejo de

Abstract. In order to prove the efficiency of products reported to induce disease resistance in crops, in 2016 and 2017, trials were established in the Experimental Station of the Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Toluca, with the commercial hybrid maize BG1384W. The products evaluated were Fosetyl-Al, Acibenzolar-S-metil, *Bacillus subtilis*, Trifloxystrobin + Tebuconazole, Harpin Protein and Clothianidin + *Bacillus firmus*. Efficiency of disease resistance inducers was studied in the control of common rust (*Puccinia sorghi* Schw.), and tar spot complex (*Phyllachora maydis* Maubl. and others), in two methods of application (soil and foliar application), and three dosages (recommended commercially, half of the recommended one, and recommended plus 50%) for each chemical. Agronomic data was recorded in a yield trial and disease severity for each disease. In 2016, severity was not affected by none of the products evaluated but Fosetyl-Al and Acibenzolar-S-metil increased grain yield. In 2017, Serenade decreased tar spot severity while Fosetyl-Al increased grain yield.

la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl. y otros), con dos formas de aplicación (al suelo y foliar) y tres dosis (comercial recomendada, mitad de la recomendada y recomendada más 50%) para cada agroquímico. Se registraron datos agronómicos en un ensayo de rendimiento y la severidad de las mencionadas enfermedades. En 2016, la severidad no fue afectada por ninguno de los agroquímicos, aunque se incrementó el rendimiento con las aplicaciones de Fosetil-Al y Acibenzolar-S-metil. En 2017, *Bacillus subtilis* disminuyó la severidad de la roya, mientras que Fosetil-Al redujo la severidad del complejo mancha de asfalto, pero mostró el rendimiento más bajo.

Palabras clave: inductores, resistencia, maíz, Fosetil-Al, *Bacillus subtilis*

El maíz es el cultivo más importante de México, desde el punto de vista alimenticio, industrial, político y social (Saint y López, 1997). En 2017, la superficie cosechada en el país fue de 1 144 590 ha, con un rendimiento de grano promedio de 6.477 t/ha (SIAP, SAGARPA, 2017). El maíz tiene varios problemas fitosanitarios, destacando entre los más importantes el carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), que afecta la espiga y la mazorca, el carbón común (*Ustilago maydis*) que afecta principalmente a la mazorca, la roya común (*Puccinia sorghi* Schwein) y el complejo mancha de asfalto (CMA) (*Phyllachora maydis* Maubl. y otros) que atacan al follaje (CIMMYT, 2005). El CMA se reportó por primera vez en México por Maublanc (1904); posteriormente, se determinó que el CMA es causado por varios hongos, donde *P. maydis* es el primero que se establece para luego llegar *Monographella maydis* Müller y Samuels y por último, dentro de los estromas de *P. maydis* se asienta el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. (Hock *et al.*, 1992). Esta enfermedad

Key words: inducers, resistance, maize, Fosetil-Al, *Bacillus subtilis*

Maize is the most important crop in Mexico, from food, industrial, political and social points of view (Saint and López, 1997). In 2017, the area planted with maize in the country was 1 144 590 ha, with an average grain yield of 6.477 t/ha (SIAP, SAGARPA, 2017). Maize has several phytosanitary problems, some of the most important of which are head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), which affects the tassel and ear, common smut (*Ustilago maydis*) which affects mainly the ear, common rust (*Puccinia sorghi* Schwein) and the tar spot complex (TSC) (*Phyllachora maydis* Maubl. and others), which affects the leaves (CIMMYT, 2005). The TSC was first reported in Mexico by Maublanc (1904); the TSC was later determined to be caused by several fungi, where *P. maydis* is the first to be established, followed by *Monographella maydis* Müller and Samuels, and finally, inside the stromas of *P. maydis*, the hyperparasite *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. settles (Hock *et al.*, 1992). This disease may cause losses of up to 100% (Martínez and Espinosa, 2014). Common rust is widely distributed in subtropical and temperate climates with a high relative humidity (CIMMYT, 2005).

It is necessary to use plant disease control alternatives which have been implemented to control diseases in other pathosystems, especially in profitable crops, such as vegetable crops. There are few studies on resistance induction on grasses. Plant treatments with several agents, including virulent or avirulent plant pathogens, non-pathogens, plant extracts, and synthetic chemicals, may induce resistance to the attack of pathogens (Walters and Fountaine, 2009). Induction of resistance is defined as the increase in the expression of natural defense mechanisms of plants that leads them to protect themselves from diseases and insects that include

puede causar pérdidas hasta del 100% (Martínez y Espinosa, 2014). La roya está ampliamente distribuida en climas subtropicales y templados con alta humedad relativa (CIMMYT, 2005).

Es necesario utilizar alternativas de control de enfermedades de plantas que se han venido implementando para controlar enfermedades en otros patosistemas, especialmente en cultivos remunerativos como los hortícolas. En gramíneas, existen pocos estudios sobre inducción de resistencia. El tratamiento de plantas con varios agentes, incluyendo fitopatógenos virulentos o avirulentos, no patógenos, extractos de plantas y químicos sintéticos, pueden inducir resistencia al ataque de patógenos (Walters y Fountaine, 2009). La inducción de resistencia se define como el incremento de la expresión de mecanismos de defensa natural de las plantas que las incita a protegerse de enfermedades e insectos que incluyen tanto respuestas locales como sistémicas (Riveros, 2001; Edreva, 2004) que van desde las barreras físicas hasta las reacciones bioquímicas que alertan las células entre sí, para producir sustancias tóxicas que eliminan o inhiben la colonización por parte de la plaga (Riveros, 2001). Esta resistencia se incrementa cuando se estimula apropiadamente por factores exógenos (Choudhary *et al.*, 2007) sin alteración del genoma de la planta (Kilian *et al.*, 2000).

La resistencia inducida puede desencadenarse tanto por la pre-inoculación con agentes patógenos, no patógenos, simbiosis y saprófitos, o bien por la aplicación de determinados inductores abióticos, como el ácido salicílico o los metabolitos microbianos que estimulan a la planta para producir sustancias naturales de defensa contra patógenos (Quintero y Castaño, 2012). Cuando éstos son reconocidos por moléculas endógenas, tienen la función de activar o aumentar el nivel de resistencia de las plantas, tanto a nivel local o en puntos distantes al sitio de infección, así como de participar de otras

both local and systemic responses (Riveros, 2001; Edreva, 2004), which range from physical barriers to the biochemical reactions with which cells alert each other in order to produce toxic substances that eliminate or inhibit the pest colonization (Riveros, 2001). This resistance increases when an adequate stimulus is provided by exogenous factors (Choudhary *et al.*, 2007) without altering the plant genome (Kilian *et al.*, 2000).

Induced resistance may be triggered by pre-inoculation with pathogenic, non-pathogenic, symbiotic and saprophytic agents or with the use of certain abiotic inducers, such as salicylic acid or microbial metabolites which stimulate the plant to produce natural defense substances against pathogens (Quintero and Castaño, 2012). When these are recognized by endogenous molecules they activate or increase the levels of resistance of the plant, both locally or in distal points of the place of infection, as well as to participate in other physiological activities (Schreiber and Desveaux, 2008). The interest in molecules that stimulate the plant's natural mechanisms started during their participation in the control of pathogens and pests, since they have the potential to reduce and/or avoid the risk of emergence of pathogen populations or chemical-resistant pests, partially counteracting chemical damages caused by pesticides, and cause an increase in harvest yields (Guimarães *et al.*, 2008).

The first resistance-activating chemical, Probenazole, was registered in Japan in 1975 as Oryzmate[®], and since then many other activators have been developed, such as Acibenzolar-S-methyl (ASM), registered as Actigard[®] (Syngenta), Harpin Protein as Messenger[®] (Plant Health Care), and others (Walters *et al.*, 2013). In strawberry plants, Fosetyl-Al[®] (Bayer) induced resistance by reducing the severity of the crown rot (*Phytophthora cactorum*) and root rot (*P. fragariae*) (Eikemo

actividades fisiológicas (Schreiber y Desveaux, 2008). El interés en las moléculas estimuladoras de los mecanismos naturales de defensa de la planta, surgió a partir de su intervención en el control de patógenos y plagas, ya que presentan el potencial de disminuir y/o evitar el riesgo de emergencia de poblaciones de patógenos o plagas resistentes a productos químicos, contrarrestar parcialmente los daños químicos ocasionados por los plaguicidas y causar un incremento del rendimiento de las cosechas (Guimarães *et al.*, 2008).

El primer químico activador de resistencia, Probenazole, se registró en Japón en 1975, como Oryzemat[®] y desde entonces muchos otros activadores han sido desarrollados, como el Acibenzolar-S-metil (ASM), registrado como Actigard[®] (Syngenta), Proteína Harpin como Messenger[®] (Plant Health Care), entre otros (Walters *et al.*, 2013). En plantas de fresa, Fosetil-Al[®] (Bayer) indujo resistencia al disminuir la severidad de la pudrición de la corona (*Phytophthora cactorum*) y la pudrición de las raíces (*P. fragariae*) (Eikemo *et al.*, 2003) y en tubérculos de papa mostró una mayor acumulación e incremento de las enzimas β -1,3-glucanasas y proteasas, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Andreu *et al.*, 2006). El ASM, originalmente comercializado para el control de la cenicilla polvorienta (*Oidium* sp.) en trigo y cebada (Gorlach *et al.*, 1996), en la actualidad se utiliza para inducir resistencia contra un extenso rango de fitopatógenos, como roya (*Uromyces viciaefabae*) y quemadura por ascochyta (*Ascochyta fabae*) en haba, en condiciones de campo e invernadero (Sillero *et al.*, 2012). En el cultivo de pera, redujo la severidad de la roña (*Venturia nashicola*) con una eficiencia en el control de 42% (Faize *et al.*, 2004) y en plátano Dominico-Hartón (Musa AAB) fue eficiente al reducir la severidad de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y amarilla (*M. musicola*) en 80% (Márquez y Castaño, 2007). La mezcla de Tebuconazole[®] con

et al., 2003), and in potato tubers, it displayed a greater accumulation and increase of enzymes β -1,3-glucanases and proteases, phytoalexins and phenolic compounds (Andreu *et al.*, 2006). ASM, originally commercialized to control powdery mildew (*Oidium* sp.) in wheat and barley (Gorlach *et al.*, 1996), is currently used to induce resistance to a wide range of plant pathogens, such as rust (*Uromyces viciaefabae*) and ascochyta blight (*Ascochyta fabae*) in broadbeans, under field and greenhouse conditions (Sillero *et al.*, 2012). In pear plantations, it reduced blight severity (*Venturia nashicola*) with a control efficiency of 42% (Faize *et al.*, 2004), and in Dominico-Hartón bananas (Musa AAB) it was efficient in the control of the black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*), and yellow Sigatoka (*M. musicola*) by 80% (Márquez and Castaño, 2007). Mixing Tebuconazole[®] with Trifloxystrobin[®], the combination of a triazole and a strobilurin, produced an increase in yield related to the control (Couretot *et al.*, 2013). The application of resistance inducers in Dominico-Hartón seedlings against Sigatoka, including Propiconazol[®], in the group of the triazoles, has proved to reduce the size of lesions and low severity rates for this disease (Mogollón *et al.*, 2011), due to the inhibition of the demethylation of the C-14 of the lanosterol, a precursor of ergosterol of the pathogen's cell membrane (Köller, 1992).

Species of the *Bacillus* genus are considered microbial factors producing various biologically active molecules, some of which are potential inhibitors of fungal growth (Schallmeyer *et al.*, 2004). *Bacillus subtilis* is extremely tolerant to environmental stresses, including soil factors and long-term storage (Brannen and Kenney, 1997). Strain QTS 713 of *B. subtilis* is antagonistic to many phytopathogenic fungi, with an effect on competition for nutrients, exclusion of the site, colonization, and the union of bacteria to the fungus.

Trifloxystrobin[®], combinación de un triazol y una estrobilurina, generaron incremento en rendimiento respecto al testigo (Couretot *et al.*, 2013). La aplicación de inductores de resistencia en plántulas de Dominico-Hartón contra Sigatoka, incluyendo Propiconazol[®], del grupo de los triazoles, demostró reducir el tamaño de las lesiones y bajos índices de severidad de esta enfermedad (Mogollón *et al.*, 2011), debido a la inhibición de la demetilación del C-14 del lanosterol, un precursor del ergosterol de la membrana celular del patógeno (Köller, 1992).

Las especies en el género *Bacillus* son consideradas factores microbianos para la producción de varias moléculas biológicamente activas, algunas potencialmente inhibidoras del crecimiento de hongos (Schallmey *et al.*, 2004). *Bacillus subtilis* es extremadamente tolerante a estreses ambientales, incluyendo factores del suelo y almacenamiento a largo plazo (Brannen y Kenney, 1997). La cepa QTS 713 de *B. subtilis*, es antagonista de muchos hongos fitopatógenos, con efecto en la competencia por nutrientes, la exclusión del sitio, colonización y la unión de las bacterias al hongo. También, puede detener la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos, interrumpiendo el crecimiento del tubo germinativo e inhibiendo la adhesión del patógeno a la hoja (EPA, 2006), debido a compuestos que muestran actividad fungicida. AgraQuest, reporta que la cepa QST 713 de *B. subtilis* induce resistencia sistémica de las plantas contra bacterias fitopatógenas. Otra especie importante del género *Bacillus* es *B. firmus*, reportada para el control de nemátodos, un proceso basado en varias interacciones, ya sea de la bacteria con los nemátodos o a través del hospedante, pero aún no se entienden completamente dichas interacciones supuestamente

It can also stop the germination of phytopathogenic fungi, interrupting the growth of the germ tube and inhibiting the adhesion of the pathogen to the leaf (EPA, 2006), due to compounds that display fungicidal activity. AgraQuest reports that strain QST 713 of *B. subtilis* induces systematic resistance of plants against phytopathogenic bacteria. Another important species of the *Bacillus* species is *B. firmus*, reported for the control of nematodes, a process based on several interactions of the bacteria with the nematodes or through the host, although there is still not a clear understanding of this interactions, allegedly based on several mechanisms that include enzyme action, degradation of root exudates and production of the phytohormone indol-acetic acid (EFSA, 2012). This microorganism, combined with Clothianidin, is effective against a variety of species, including a range of insect species (Coleóptera, Thysanóptera, Lepidóptera and Diptera).

The Harpin Protein was discovered by Wei *et al.* (1992), as an elicitor of the response of hypersensitivity caused by *Erwinia amylovora*. Currently, the product Messenger[®] of the company Planth Health, based on the Harpin Protein, activates a natural defense mechanism in the plant, known as systemic acquired resistance (SAR). Dong *et al.* (1999), reported that Harpin elicited a systemic resistance to *Peronospora parasítica* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in wild *Arabidopsis thaliana* plants. Based on this, the aim of this study was to evaluate agrochemicals reported as inducers of resistance to diseases, and to obtain preliminary information on the resistance-inducing effect in maize against common rust and the tar spot complex.

basadas en varios mecanismos que comprenden acción enzimática, degradación de exudados de raíz y producción de la fitohormona ácido indol-acético (EFSA, 2012). Este microorganismo, combinado con Clotianidin, es efectivo contra una variedad de especies de insectos (Coleóptera, Thysanóptera, Lepidóptera y Díptera).

La Proteína Harpin fue descubierta por Wei *et al.* (1992), como elicitor de la respuesta de hipersensibilidad provocada por *Erwinia amylovora*. Actualmente, el producto Messenger® de la empresa Planth Health, con base en la Proteína Harpin, activa un mecanismo natural de defensa en las plantas, referido como resistencia sistémica adquirida (EPA). Dong *et al.* (1999), reportaron que Harpin elicito resistencia sistémica a *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar agroquímicos reportados como inductores de resistencia a enfermedades y obtener información preliminar del efecto inductor de resistencia en maíz contra la roya común y el complejo mancha de asfalto.

MATERIALES Y METODOS

El primer ensayo se sembró en el Campo Experimental de El Cerrillo, de la Universidad Autónoma del Estado de México (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O), el 7 de abril de 2016. Se utilizó un diseño experimental de parcelas sub-subdivididas, en donde las parcelas mayores incluyeron seis agroquímicos (Aliette, Actigard, Poncho Votivo, Serenade, Messenger y Consist Max) y un testigo absoluto. Como subparcelas se incluyeron dos métodos de aplicación (foliar y al suelo), haciendo la aplicación al suelo con aspersión al fondo del surco al momento de la siembra y la aplicación foliar

MATERIALS AND METHODS

The first trial was planted in the El Cerrillo Experimental Field, of the Autonomous University of the State of Mexico (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" W), on April 7, 2016. A split split plot experimental design was used, in which main plots included six agrochemicals (Aliette, Actigard, Poncho Votivo, Serenade, Messenger and Consist Max) and one absolute control. As subplots, two application methods were included (foliar and on the soil), applying onto the soil by spraying the bottom of the furrow when planting, and foliar application was by spraying the plant 50 days after its emergence. Split splitplots consisted of 3 doses of the products: 1. Dose recommended on the product label, 2. Low dose, with 50% of the recommended dose, and 3. High dose, with the recommended dose plus 50% of this dose (Table 1). The experimental unit consisted of two 3 m long rows, 0.80 m between rows, with an area of 4.8 m² and three repetitions. The maize seed used was of the commercial hybrid BG1384W (Biogene). The control treatments consisted of only water. The infection was of a natural incidence.

The second planting cycle (April 5th, 2017) was set up in the same Experimental Field. Due to a low plant emergence due to an attack of the corn seed worm (*Hylemia* sp.), the trial was entirely replanted on May 10th, repeating the same experimental design. In order to register the severity of the diseases, scales were used for common rust (*Puccinia sorghi*) and the tar spot complex (*Phyllachora maydis* and others). In rust and tar spot, severity was estimated using a visual scale of 1-5, where: 1=Resistant (with pustules in 10% of the foliar area), 2=Moderately resistant (pustules in 20-30% of the foliar area), 3=Moderately susceptible (pustules in 40-50 % of the foliar area), 4=Susceptible (pustules in 60-70% of the foliar area) and 5=Very susceptible

se hizo vía aspersión a los 50 días de emergida la planta. Las sub-subparcelas consistieron de 3 dosis de los productos: 1. dosis recomendada en la etiqueta del producto, 2. dosis baja con 50% de la dosis recomendada y, 3. dosis alta con la dosis recomendada más 50% de ésta (Cuadro 1). La unidad experimental fue de dos surcos de 3.0 m de largo y 0.80 m entre surcos, con un área de 4.8 m² y tres repeticiones. Se utilizó semilla del híbrido comercial de maíz BG1384W (Biogene). Los tratamientos testigos consistieron de agua solamente. La infección fue de incidencia natural.

El segundo ciclo de siembra (5 de abril de 2017), se estableció en el mismo Campo Experimental. Debido a una baja emergencia de plantas por al ataque del gusano de la semilla de maíz (*Hylemia* sp.), el ensayo se sembró en su totalidad el 10 de mayo, repitiendo el mismo diseño experimental. Para registrar la severidad de las enfermedades, se emplearon escalas para roya común (*Puccinia sorghi*) y el complejo mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y otros). En roya y mancha de asfalto, la severidad se estimó usando una escala visual de 1-5, donde: 1=Resistente (con pústulas en 10% del área foliar), 2=Moderadamente resistente (pústulas en 20-30% del área foliar), 3=Moderadamente susceptible (pústulas en 40-50 % del área foliar), 4=Susceptible (pústulas en 60-70% del área foliar) y 5=Muy susceptible (pústulas en 100% del

(pustules in 100% of the foliar area). Agronomic data were collected from a yield trial (CIMMYT, 1985; IBPGR, 1991), including days at 50% of male and female flowering, plant and ear height, plant and ear aspect, number of healthy and rotten ears, weight of fresh grain at harvest adjusted to 15% humidity to obtain grain yield per hectare. The variables registered were placed under an analysis of variance (ANOVA) and values obtained were placed under a Tukey test.

RESULTS AND DISCUSSION

Planting cycle TO-2016. Acibenzolar-S-methyl and Tebuconazole + Trifloxystrobin and *Bacillus subtilis* delayed female flowering, whereas plots treated with Fosetil-Al and Cloatianidin + *Bacillus firmus* showed an acceleration in female flowering (Table 2). Male flowering was uniform throughout the experimental units. The difference in days between male and female flowering was of two days, which, according to López (1991), a minimal difference between pollen emission and the appearance of silks guarantee a good pollination and grain filling. On the other hand, for ASI (Anthesis-silking interval), Fosetil-Al showed the lowest value, which, according to Uribebarrea *et al.* (2002), is a desirable characteristic, since a

Cuadro 1. Agroquímicos y dosis utilizadas en las evaluaciones TO-2016 y TO-201.
Table 1. Agrochemicals and doses used in evaluations TO-2016 and TO-201.

Ingred. activo	Nombre comercial	Baja (B)	Dosis Media (M)	Alta (A)
1. Fosetil-Al 80%	Aliette	625 g/ha	1250 g/ha	1875 g/ha
2. Acibenzolar-S-metil 500 g/l	Actigard	30 g/ha	60 g/ha	90 g/ha
3. Trifloxystrobin + tebuconazole	Consist Max	125 mL/ha	250 mL/ha	375 mL/ha
4. Cloatianidin 500 g/l + <i>Bacillus firmus</i>	Poncho Votivo	40 mL/ha	80 mL/ha	120 mL/ha
5. <i>Bacillus subtilis</i> 1 x 10 ⁹ UFC/g	Serenade	2.5 L/ha	5 L/ha	7.5 L/ha
6. Proteína Harpin 3%	Messenger	75 g/ha	150 g/ha	225 g/ha
7. Testigo		-----	-----	-----

área foliar). Se colectaron datos agronómicos de un ensayo de rendimiento (CIMMYT, 1985; IBPGR, 1991), incluyendo días a 50% de floración masculina y femenina, altura de planta y mazorca, aspecto de planta y de mazorca, número de mazorcas sanas y podridas, peso de grano fresco en cosecha ajustado a 15% de humedad para obtener rendimiento de grano por hectárea. Las variables registradas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANAVA) y los valores obtenidos se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ciclo de siembra TO-2016. Acibenzolar-s-metil y Tebuconazole + Trifloxystrobin y *Bacillus subtilis* retrasaron la floración femenina, en cambio las parcelas tratadas con Fosetil-Al y Cloatianidin + *Bacillus firmus* mostraron una aceleración en la floración femenina (Cuadro 2). La floración masculina fue uniforme en las unidades experimentales. La diferencia en días entre floración masculina y femenina fue de dos días, lo que, de acuerdo con López (1991), un desfase mínimo entre la emisión de polen y la aparición de los estigmas garantizan una buena polinización y el buen llenado de grano. Mientras que para ASI (Anthesis-silking interval), Fosetil-Al mostró el valor más bajo que, de acuerdo a Uribebarrea *et al.* (2002), es una característica deseable ya que un valor alto de ASI provoca reducción del rendimiento debido a fallas en la polinización de los estigmas.

Las parcelas tratadas con Fosetil-Al mostraron un incremento estadísticamente significativo en altura de planta y mazorca, mientras que la Proteína Harpin las disminuyó. Para el balance de planta, todos los agroquímicos tuvieron los valores de 0.50, valor deseable en el cultivo para tener un balance adecuado de planta para evitar el acame.

high ASI value causes the reduction of yield, due to erratic silk pollination.

Plots treated with Fosetil-Al showed a statistically significant increase in plant and ear height, whereas the Harpin Protein reduced them. For the plant balance, all agrochemicals had values of 0.50, a desirable value in the crop to obtain an adequate balance to avoid lodging.

For the ear aspect, there were no statistical differences. Between treatments, the control (untreated plots) showed the lowest number of rotten ears, while plots treated with Fosetil-Al had the highest number of rotten ears. Regardless of this, Fosetil-Al and Acibenzolar-S-metil showed a statistically higher yield with 5.7 and 5.9 t ha⁻¹, respectively. The lowest yield obtained was with the Harpin Protein.

Based on the scale of severity used to evaluate the damage caused by the common rust and TSC, the plants displayed a lower severity of these two foliar diseases. For TSC, the product Clothianidin + *Bacillus firmus* y Fosetyl-Al showed the highest severity with 1.6 (Table 2) in comparison with the average of 1.4 and the control with 1.2. Likewise for rust severity, plants from plots treated with Clothianidin + *Bacillus firmus*, statistically had a higher severity value (1.3), compared with the average of 1.2 and the control of 1.0. Table 2 shows that, despite this observation, the plots treated with Clothianidin + *Bacillus firmus* had a higher yield in comparison to the control, which has a lower disease severity value. This may be attributed to the characteristics of *Bacillus*, given that these organisms contribute to the productivity of crops, since they are located in the rhizosphere and colonize the roots of plants, promoting the growth of rhizobacteria that contribute to a greater absorption of nutrients (Schallmeyer *et al.*, (2004).

Cuadro 2. Separación de medias de agroquímicos, vía de aplicación y dosis por el método Tukey ($\alpha=0.05$) para la variable características agronómicas y severidad de las enfermedades. TO-2016.**Table 2. Separation of measurements of agrochemicals, means of application and doses using Tukey's test ($\alpha=0.05$) for the variable of agricultural characteristics and disease severity. TO-2016.**

	FM	FF	RFM	AIP	AIM	BMP	AsM	MP	RG	SCMA	SR
Aliette	108.2 a*	109.4 b*	1.0 b*	178.7 a*	94.0 a*	0.5 ab*	1.9 a*	1.1 a*	5.7 a	1.6 a*	1.2 ab*
Testigo	108.2 a	110.2 ab	1.0 a	165.2 abc	78.0 bc	0.4 c	2.2 a	0.1 b	4.7 abc	1.2 b	1.0 b
Serenade	108.4 a	110.2 a	1.0 a	159.0 bc	81.5 abc	0.5 abc	2.2 a	0.3 ab	4.7 abc	1.3 ab	1.1 ab
Poncho Votivo	108.0 a	109.4 b	1.0 a	174.4 ab	87.1 abc	0.5 bc	2.3 a	0.7 ab	5.6 ab	1.6 a	1.3 a
Messenger	108.4 a	110.0 ab	1.0 a	153.3 c	74.5 c	0.5 bc	2.5 a	0.4 ab	3.3 c	1.3 ab	1.1 ab
Actigard	108.4 a	110.3 a	1.0 a	171.9 abc	88.3 ab	0.5 abc	2.4 a	0.7 ab	5.9 a	1.3 ab	1.3 ab
Consist Max	108.4 a	110.3 a	1.0 a	154.3 c	84.7 abc	0.5 a	2.5 a	0.5 ab	3.4 bc	1.4 ab	1.2 ab
Suelo	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.3 a	83.2 a	0.5 a	2.2 a	0.5 a	4.6 a	1.3 a	1.2 a
Foliar	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.1 a	84.9 a	0.5 a	2.4 a	0.6 a	5.0 a	1.4 a	1.2 a
Alta	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.4 a	86.65 a	0.5 a	2.2 a	0.6 a	4.8 a	1.4 a	1.1 b
Media	108.2 a	109.9 a	1.0 a	164.1 a	82.09 a	0.5 a	2.4 a	0.6 a	4.9 a	1.4 a	1.2 ab
Baja	108.4 a	110.0 a	1.0 a	166.1 a	86.65 a	0.5 a	2.3 a	0.4 a	4.7 a	1.4 a	1.23 a
CV	0.6	0.7	0.7	6.8	13.4	11.7	23.7	118.8	27.4	22.7	21.2
Media	108.3	109.9	1.0	165.2	84.0	0.5	2.3	0.5	4.8	1.4	1.2

*Valores seguidos de la misma letra no son diferentes entre ellos / Values followed by the same letter display no differences with one another.

FM=días a 50% de floración masculina, FF=días a 50% de floración femenina, RFM=relación floración femenina/masculino, AIP=altura de planta, AIM=altura de mazorca, BMP=balance de mazorca/planta, AsM=aspecto de mazorca, MP=mazorcas podridas, RG=rendimiento de grano ajustado, SCMA=severidad de complejo mancha de asfalto, SR=severidad de roya común / FM=days to 50% of male flowering, FF=days to 50% of female flowering, RFM= female/male flowering ratio, AIP=plant height, AIM=ear height, BMP=ear/plant balance, AsM=ear aspect, MP=rotten ears, RG=yield of grain, adjusted, SCMA=severity of tar spot complex, SR=severity of common rust.

En aspecto de mazorca, estadísticamente no hubo diferencias. Se observó que entre los tratamientos, el testigo (parcelas sin tratar) presentó el valor más bajo de número de mazorcas podridas, mientras que las parcelas tratadas con Fosetil-Al presentaron el mayor número de mazorcas podridas. A pesar de esto, Fosetil-Al y Acibenzolar-S-metil mostraron un rendimiento estadísticamente más alto con 5.7 y 5.9 t ha⁻¹, respectivamente. El rendimiento más bajo se obtuvo con la Proteína Harpin.

En base a la escala de severidad utilizada para evaluar daño por roya común y el CMA, las plantas mostraron menor severidad por estas dos enfermedades foliares. Para CMA, el producto Clotianidin

Planting cycle TO-2017. Fosetil-Al was found to accelerate flowering, while Acibenzolar-S-methyl and Trifloxystrobin + Tebuconazole delayed it (Table 3). For the variable female/male flowering, it was found that agrochemicals, means of application and dose had the same effect, indicating a minimum difference between pollen emission and the appearance of silks, which guarantee an adequate grain (López, 1991). Acibenzolar-S-methyl registered the greatest plant height with 173.5 cm, followed by Tebuconazole + Trifloxystrobin with 172.3 cm., and *Bacillus subtilis* presented the lowest plant height with 152.4 cm. However, there was no significant difference in ear height. In plant balance, Tebuconazole + Trifloxystrobin

+ *Bacillus firmus* y Fosetil-Al mostraron la mayor severidad de 1.6 (Cuadro 2) comparado con la media de 1.4 y el testigo con 1.2. De igual manera, para la severidad de la roya, las plantas de las parcelas tratadas con Clotianidin + *Bacillus firmus* tuvieron, estadísticamente, un valor de severidad más alto (1.3), comparado con la media de 1.2 y el testigo de 1.0. El Cuadro 2 muestra que, a pesar de esta observación, las parcelas tratadas con Clotianidin + *Bacillus firmus* tuvieron mayor rendimiento comparado con el testigo que tuvo el valor menor de severidad. Esto se puede atribuir a las características de *Bacillus*, dado que estos organismos contribuyen a la productividad de los cultivos al localizarse en la rizósfera y colonizar las raíces de las plantas promoviendo el crecimiento de rizobacterias que contribuyen a una mayor absorción de nutrientes Schallmeyer *et al.* (2004).

Ciclo de siembra TO-2017. Se determinó que Fosetil-Al aceleró la floración, mientras que Acibenzolar-S-metil y Trifloxystrobin + Tebuconazole la retrasaron (Cuadro 3). Para la variable relación de floración femenina/masculina se obtuvo que tanto para agroquímicos, vía de aplicación y dosis, tuvieron el mismo efecto, indicando un desfase mínimo entre la emisión de polen y la aparición de los estigmas, garantizando el buen llenado del grano (López, 1991). Acibenzolar-S-metil registró la mayor altura de planta con 173.5 cm, seguido de Tebuconazole + Trifloxystrobin con 172.3 cm., mientras que *Bacillus subtilis* presentó la menor altura con 152.4 cm. Sin embargo, no presentaron diferencia significativa en altura de mazorca. En el balance de planta, Tebuconazole + Trifloxystrobin y Acibenzolar-S-metil tuvieron el valor deseable de 0.5.

El aspecto de plantas se vio afectado de manera negativa con el fungicida Fosetil-Al, en cambio las plantas de las parcelas no tratadas presentaron el mejor aspecto. En aspecto de mazorcas, éste fue igual en todas las parcelas a pesar de que algunas

and Acibenzolar-S-metil had the desirable plant balance value of 0.5.

Plant aspect was negatively affected with the fungicide Fosetil-Al and plants from the untreated plots had the best aspect. Ear aspect was equal in all plots, despite some of them having desirable or undesirable aspects. This coincides with Guimarães *et al.* (2008), who reported that the use of inducers may lead to physiological effects, as in the case of Acibenzolar-S-methyl applied on cotton plants that presented a reduction in plant height, dry and fresh weight of stems, due to the activation of the resistance imposing a demand of energy in the plants (Dietrich *et al.*, 2005), and a reduction of metabolites for growth and other important physiological processes (Heil *et al.*, 2002).

The highest grain yield was obtained with Tebuconazole + Trifloxystrobin (5.7 t ha⁻¹), and the lowest, with Fosetil-Al (3.6 t ha⁻¹). The results for yield with the Tebuconazole + Trifloxystrobin treatment coincide with reports by Couretot *et al.* (2013), who mention that the mixture of triazoles and estrobilurines increases yield.

For this cycle, two evaluations were done for the severity of *P. sorghi*, in which, as in the first cycle, averages indicate that plants of the plot range from moderately resistant to resistant (Table 3). In the first evaluation, Serenade® (*Bacillus subtilis*) reduced the severity of rust, which coincides with reports by the company AgraQuest, who indicate that *B. subtilis* induces the natural resistance of plants. Also, Maget and Peypoux (1994) mention that compounds called Iturines, produced by this organism, display activity against plant pathogenic fungi. Various reports indicate that this bacteria can stop germination of the pathogen's spores by interrupting the growth of the germinative tube and inhibiting the union of the pathogen with the plant leaf (EPA, 2006).

In the second rust evaluation, there were no significant differences in the severities of the plants

Cuadro 3. Separación de medias de tratamientos, vía de aplicación y dosis por el método Tukey ($\alpha=0.05$) para la variable características agronómicas y severidad de las enfermedades. TO-2017.**Table 3. Separation of averages of treatments, means of application and doses using Tukey's test ($\alpha=0.05$) for the variable of agricultural characteristics and disease severity. TO-2017.**

Factor	FM	FF	RFM	AIP	AIM	BMP	AsP	AsM	MP	RG	SCMA	SR1	SR2
Aliette	103.4 a	104.2 a	1.0 a	152.6 a	68.8 a	0.4 a	2.6 a	3.6 a	0.7 a	3.6 b	1.9 b	1.6 ab	1.9 a
Testigo	103.0 ab	104.3 a	1.0 a	171.0 a	78.9 a	0.4 a	1.9 b	2.5 a	1.2 a	5.3 ab	2.7 a	1.5 ab	1.8 a
Serenade	102.9 ab	104.0 a	1.0 a	152.4 a	67.7 a	0.4 a	2.3 ab	3.2 a	0.9 a	4.3 ab	2.2 ab	1.4 b	1.9 a
Poncho Votivo	102.8 ab	103.9 a	1.0 a	160.7 a	70.9 a	0.4 a	2.1 ab	2.9 a	1.1 a	4.8 ab	2.1 ab	1.7 ab	1.8 a
Messenger	102.7 ab	103.6 a	1.0 a	155.9 a	69.7 a	0.4 a	2.1 ab	3.2 a	1.1 a	5.2 ab	2.4 ab	1.6 ab	1.8 a
Actigard	102.5 b	103.9 a	1.0 a	173.5 a	80.5 a	0.5 a	2.1 ab	2.9 a	1.2 a	5.3 ab	2.6 ab	2.0 a*	2.0 a
Consist Max	102.4 b	104.0 a	1.0 a	172.3 a	80.3 a	0.5 a	2.1 ab	2.6 a	1.0 a	5.7 a	2.5 ab	1.8 ab	1.9 a
Suelo	102.9 a	104.0 a	1.0 a	164.7 a	74.7 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	1.0 a	4.8 a	2.4 a	1.7 a	1.9 a
Foliar	102.7 a	103.9 a	1.0 a	161.2 a	72.9 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	1.0 a	5.0 a	2.3 a	1.6 a	1.8 a
Alta	102.9 a	103.9 a	1.0 a	159.9 a	72.2 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	0.9 a	4.9 a	2.3 a	1.7 a	1.9 a
Media	102.8 a	104.0 a	1.0 a	166.3 a	75.7 a	0.4 a	2.1 a	2.9 a	1.3 a	5.0 a	2.5 a	1.6 a	1.9 a
Baja	102.7 a	104.0 a	1.0 a	161.7 a	73.5 a	0.4 a	2.2 a	3.1 a	0.9 a	4.7 a	2.3 a	1.7 a	1.7 a
CV	0.9	0.9	0.9	9.6	16.3	11.3	24.7	26.8	107.9	22.3	27.8	25.7	30.1
Media	102.8	104.0	1.0	162.6	73.8	0.4	2.2	3.0	1.0	4.9	2.3	1.7	1.9

*Valores seguidos de la misma letra no son diferentes entre ellos / Values followed by the same letter display no differences with one another.

FM=días a 50% de floración masculina, FF=días a 50% de floración femenina, RFM=relación floración femenino/masculino, AIP=altura de planta, AIM=altura de mazorca, BMP=balance de mazorca/planta, AsP=aspecto de planta, AsM=aspecto de mazorca, MP=mazorcas podridas, RG=rendimiento de grano ajustado, SCMA=severidad de complejo mancha de asfalto, SR=severidad de roya común primera evaluación, SR2=severidad de roya común segunda evaluación / FM=days to 50% of male flowering, FF= days to 50% of female flowering, RFM= female/male flowering ratio, AIP=plant height, AIM=ear height, BMP=ear/plant balance, AsP=plant aspect, AsM=ear aspect, MP=rotten ears, RG=yield of grain, adjusted, SCMA= severity of tar spot complex, SR=severity of common rust, first evaluation, SR2= severity of common rust, second evaluation.

tuvieran o no plantas con aspecto deseable. Esto concuerda con Guimarães *et al.* (2008), quienes reportan que la utilización de inductores puede conducir a efectos fisiológicos, como sucedió al aplicar Acibenzolar-S-metil en plantas de algodón que presentaron una reducción de altura de planta, peso fresco y seco de brotes, debido a que la activación de la resistencia impone demanda de energía de la planta (Dietrich *et al.*, 2005) y reducción de metabolitos para el crecimiento y otros procesos fisiológicos importantes (Heil *et al.*, 2002).

El mayor rendimiento de grano se obtuvo con Tebuconazole + Trifloxystrobin (5.7 t ha⁻¹) y el menor con Fosetil-Al (3.6 t ha⁻¹). Los resultados

treated; however, Serenade® (*Bacillus subtilis*), which gave the lowest severity value in the first evaluation, is found in the same statistical group with the other products. In order to maintain the previously observed effect it may be necessary to make a second application, as mentioned by Rohilla *et al.* (2001), who point out that the degree of protection provided by the application of a fungicide, whether on the ground or foliar, decreases with time. There are also various reports of resistance elicitors which do not provide a significant control of the disease when compared to the control (Mogollón and Castaño, 2011) since, in the field, the expression of induced resistance

obtenidos en rendimiento con el tratamiento de Tebuconazole + Trifloxystrobin coinciden con lo reportado por Couretot *et al.* (2013) quienes mencionan que la mezcla de triazoles y estrobilurinas incrementa el rendimiento.

Para éste ciclo, se realizaron dos evaluaciones de la severidad de *P. sorghi*, las que, al igual que en el primer ciclo, las medias indican que las plantas de las parcelas van de moderadamente resistentes a resistentes (Cuadro 3). En la primera evaluación, Serenade® (*Bacillus subtilis*) redujo la severidad de la roya, lo que coincide con lo reportado por la compañía AgraQuest quienes indican que *B. subtilis* induce resistencia natural de las plantas. También, Maget y Peypoux (1994) mencionan que compuestos denominados Iturines, generados por éste organismo, muestran actividad contra muchos hongos fitopatógenos. Diversos reportes indican que esta bacteria puede detener la germinación de las esporas de los patógenos al interrumpir el crecimiento del tubo germinativo e inhibir la unión del patógeno a la hoja de la planta (EPA, 2006).

En la segunda evaluación de roya, no se encontraron diferencias en las severidades de las plantas tratadas, sin embargo, Serenade® (*Bacillus subtilis*), que en la primera evaluación resultó con el menor valor de severidad, se encuentra en el mismo grupo estadístico con los otros productos. Posiblemente, para mantener el efecto previamente observado sea necesario realizar otra aplicación, tal como mencionan Rohilla *et al.* (2001), quienes indican que el grado de protección que proporciona la aplicación de un fungicida, ya sea al suelo o foliar, disminuye con el tiempo. También, existen varios reportes de elicitors de resistencia que no proporcionan un control significativo de la enfermedad comparado con el testigo (Mogollón y Castaño, 2011) debido a que, en campo, la expresión de la resistencia inducida está influenciada por el ambiente, el genotipo y la nutrición (Walters *et al.*, 2005).

is influenced by the environment, genotype and nutrition (Walters *et al.*, 2005).

Fosetil-Al showed a higher efficiency by reducing the severity of the TSC, presenting the lowest value in comparison to the control, which had the highest value for severity (Table 3). The active ingredient of this product is reported as a resistance inducer in several crops, including strawberry, since it reduces the severity of crown rot (*P. cactorum*), root rot (*P. fragariae*) (Eikemo *et al.*, 2003), and in potato tubers, when applying it to control *P. infestans*, where it showed a greater accumulation and increase of enzymes β -1,3-glucanases, proteases, phytoalexins and phenolic compounds (Andreu *et al.*, 2006), related with plant defenses. Although Fosetil-Al displayed the lowest TSC severity value, it did not increase grain yield. Guimarães *et al.* (2008), mention that inducing resistance in plants may have physiological effects, since the activation of resistance imposes high demands of energy on the plant (Dietrich *et al.*, 2005) and a reduction of metabolites for growth and other important plant processes (Heil and Baldwin., 2002).

CONCLUSIONS

Both diseases in which resistance inducers were evaluated were present in both planting cycles. In the TO-16 cycle, none of the agrochemicals reduced the severity of rust and TSC, although Tebuconazole + Trifloxystrobin increased grain yield. For cycle TO-2017, Serenade proved to be the best agrochemical in reducing the severity of *P. sorghi*, while Fosetil-Al showed the best effect on reducing the severity of the TSC, but Tebuconazole + Trifloxystrobin induced a higher grain yield. The disease severities were not affected by the application method. There were significant

Fosetil-Al mostró mayor eficiencia al disminuir la severidad del complejo mancha de asfalto presentando el valor más bajo, comparado con el testigo que tuvo el valor más alto de severidad (Cuadro 3). El ingrediente activo de éste producto está reportado como inductor de resistencia en varios cultivos incluyendo fresa, al disminuir la severidad de la pudrición de la corona (*P. cactorum*) y pudrición de raíces (*P. fragariae*) (Eikemo *et al.*, 2003) y en tubérculos de papa, al aplicarlo para el control de *P. infestans*, en donde mostró una mayor acumulación e incremento de las enzimas β -1,3-glucanasas, proteasas, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Andreu *et al.*, 2006), relacionadas con defensas de las plantas. Aunque Fosetil-Al mostró el valor más bajo de severidad de CMA, no aumentó el rendimiento en grano. Guimarães *et al.* (2008), mencionan que inducir resistencia en plantas puede tener costos fisiológicos debido a que la activación de la resistencia impone altas demandas de energía a la planta (Dietrich *et al.*, 2005) y reducción de metabolitos para el crecimiento y otros procesos importantes para la planta (Heil y Baldwin., 2002).

CONCLUSIONES

Las dos enfermedades en que se evaluaron los inductores de resistencia se presentaron en los dos ciclos de siembra. En el ciclo TO-2016, ninguno de los agroquímicos redujo la severidad de la roya y mancha de asfalto, pero el Tebuconazole + Trifloxystrobin incrementaron el rendimiento de grano. Para el ciclo TO-2017, Serenade mostró ser el mejor agroquímico para reducir la severidad de *P. sorghi*, mientras que Fosetil-Al mostró el mejor efecto en reducción de la severidad del CMA, pero Tebuconazole + Trifloxystrobin indujo un mayor rendimiento de grano. La severidad de las enfermedades no se vio afectada por el método de aplicación. Hubo diferencias significativas entre dosis

differences between doses, since the severity of rust decreased when using high doses of agrochemicals.

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

ya que la severidad de la roya disminuyó al utilizar dosis altas de los agroquímicos.

## LITERATURA CITADA

- Andreu BA, Guevara GM, Wolski E, Daleo G, and Caldiz D. 2006. Enhancement of the natural disease resistance of potatoes by chemicals. *Pest Management Science* 62:162-170.
- Brannen PM, and Kenney DS. 1997. Kodiak®-a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:169-171.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 1985. Managing trials and reporting data for CIMMYT's international maize testing program, Mexico, D.F. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/697/13201.pdf>
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2005. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf>
- Choudhary DK, Prakash A, and Johri BN. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* 47:289-297.
- Couretot L, Parisi L, Hirsch M, Suarez ML, Magnone G. y Ferraris G. 2013. Principales enfermedades del cultivo de maíz en las últimas campañas y su manejo. 7 p. Disponible en línea: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_pergamino\\_principales\\_enfermedades\\_del\\_cultivo\\_d.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_pergamino_principales_enfermedades_del_cultivo_d.pdf)
- Dietrich R, Ploss K, and Heil M. 2005. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant, Cell and Environment* 28:211-222.
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, and Beer SV. 1999. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal* 20(2):207-215. Disponible en línea: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-313x.1999.00595.x>
- Edreva A. 2004. A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of cell and Molecular Biology* 3:61-69. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/a974/c0471debbd5b0d53d70a59923d842e4f50.pdf>
- Eikemo H, Stensvand A, and Tronsmo AM. 2003. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 87(4):345-

350. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS.2003.87.4.345>
- Environmental Protection Agency (EPA). 2006. *Bacillus subtilis* Strain 713 (006479) Biopesticide. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_006479.html](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006479.html) (consulta, mayo 2018)
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus firmus* I-1582. EFSA Journal 10:2868.
- Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, and Ishii H. 2004. Acibenzolans-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology* 94:604-612.
- Guimarães BMA, Laranjeira D, and Barbosa RS. 2008. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. *Summa Phytopathologica* 34:338-342.
- Gorlach J, Volrath S, Knauf F, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, and Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Heil M, and Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7:61-67.
- Hock J, Dittrich U, Renfro BL, and Kranz J. 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia* 117:157-161.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1991. Descriptors for maize. International Maize and Wheat Improvement Center. México City. 88p. Disponible en línea: [https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/104.pdf](https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/104.pdf)
- Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, and Hain R. 2000. FZB24 *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 53:72-93.
- Köller W. 1992. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. p.119-206. In: Koller W. Target Sites of Fungicide Action. CRC Press. Boca Raton, Florida. 328 p. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Or1HDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT183&dq=Antifungal+agents+with+target+sites+in+sterol+functions+and+biosynthesis&ots=8UcS3RIWfM&sig=bIHRbeUnQw9H9FMY8VYLDwSRluQ#v=onepage&q=Antifungal%20agents%20with%20target%20sites%20in%20sterol%20functions%20and%20biosynthesis&f=false>
- López L. 1991. Cultivos herbáceos “Cereales”. Vol I. Ediciones Mundi-Prensa. España. 539 p.
- Maget DR, and Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of poreforming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87:151-174.
- Martínez SJ y Espinosa PN. 2014. Sugerencias para el control del “complejo mancha de asfalto” del maíz en la Frailesca, Chiapas. Folleto para productores No. 13. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo experimental centro de Chiapas Ocozocoautla, Chiapas, México. 15 p. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/271586181\\_Sugerencias\\_para\\_el\\_control\\_del\\_complejo\\_mancha\\_de\\_asfalto\\_del\\_maiz\\_en\\_La\\_Frailesca\\_Chiapas](https://www.researchgate.net/publication/271586181_Sugerencias_para_el_control_del_complejo_mancha_de_asfalto_del_maiz_en_La_Frailesca_Chiapas) DOI:10.13140/2.1.3799.5842
- Márquez C, Castaño ZJ. 2007. Inducción de resistencia a sigatocas en plántulas de plátano Dominico-Hartón. *Agroonomía* 15(2):49-57. Disponible en línea: [https://kipdf.com/inducccion-de-resistencia-a-sigatocas-en-plantulas-de-platano-dominico-harton\\_5afd547d8ead0e41128b4633.html](https://kipdf.com/inducccion-de-resistencia-a-sigatocas-en-plantulas-de-platano-dominico-harton_5afd547d8ead0e41128b4633.html)
- Maublanc, A. 1904. Especies nouvelles de champignons inferiurs. *Bulletin de la Société Mycologique de France*. 20(2):70-74. Disponible en línea: <https://ia800703.us.archive.org/0/items/mobot31753002525548/mobot31753002525548.pdf>
- Mogollón OA y Castaño ZJ. 2011. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano dominico hartón (*Musa balbisiana* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 35:463-472.
- Quintero VC y Castaño ZJ. 2012. Evaluación de inductores de resistencia para el manejo de nematodos fitoparásitos en plántulas de plátano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 36:575-586.
- Riveros AS. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Manejo integrado de plagas 61: 4-11. Disponible en línea: [www.sidalc.net/REPDOCA/A2124E/A2124E.PDF](http://www.sidalc.net/REPDOCA/A2124E/A2124E.PDF)
- Rohilla R, Singh US, and Singh RL. 2001. Mode of action of Acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest Management. Science* 58:63-69.
- Saint G y López PMA. 1997. Producción de maíz y políticas agrícolas en Centro América y México CIMMYT. San José, Costa Rica. 39p. Disponible en línea: [libcatalog.cimmyt.org/Download/cim/64574.pdf](http://libcatalog.cimmyt.org/Download/cim/64574.pdf)
- SIAP-SAGARPA. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesca- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/datos-estadisticos-de-la-produccion-agricola-generada-a-nivel-nacional/resource/91fb244e-4f49-4c97-9f6d-eae06a4fdb74> (consultado, mayo 2018).
- Schallmeyer M, Singh A, and Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50:1-17.
- Schreiber K, and Desveaux D. 2008. Message in a bottle: Chemical biology of induced resistance in plants. *The Plant Pathology Journal* 24:245-268.
- Sillero JC, Rojas MM, Avila CM, and Rubiales D. 2012. Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection* 34:65-69.
- Uribelarrea M, Cárcova J, Otegui ME, and Westgate ME. 2002. Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize. *Crop Science* 42:1910-1918.
- Walters DR, Walsh D, Newton A, and Lyon G. 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *The American Phytopathological Society* 95:1368-1373.

Walters DR, and Fountaine JM. 2009. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science* 147:523–535.

Walters DR, Ratsep J, and Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64:1263-1280.

Wei Z, Laby R, Zumoff C, Bauer D, Ho SY, Collmer A, and Beer S. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.

# Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México

## Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México

María Eugenia Rentería-Martínez, Miguel Ángel Guerra-Camacho, Andrés Ochoa-Meza, Sergio Francisco Moreno-Salazar\*, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Carretera Hermosillo-Bahía Kino Km 21, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. Amparo del Carmen Meza-Moller, Universidad Estatal de Sonora, Avenida Ley Federal del Trabajo S/N, Colonia Apolo, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Juan Manuel Guzmán-Ortíz, Departamento de Investigaciones Científicas y tecnológicas, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio S/N, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. \*Autor para correspondencia: [sergio.moreno@unison.mx](mailto:sergio.moreno@unison.mx)

Recibido: 04 de Agosto, 2018.

Aceptado: 21 de Septiembre, 2018.

Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Meza-Moller AC and Guzmán-Ortíz JM. 2018. Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 16-34.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-1

Primera publicación DOI: 18 Octubre, 2018.

First publication DOI: October 18, 2018.

**Resumen.** Recientemente se ha identificado a *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* como causantes de marchitez y muerte en plantas de sandía en Sonora, México. Debido a la escasa información morfológica acerca de *F. brachygibbosum* y con el fin de establecer las

**Abstract.** *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* have been recently identified as the cause of wilt and death in watermelon plants in Sonora, Mexico. Because of the scarce morphological information about *F. brachygibbosum* and in order to establish the distinctive macroscopic and microscopic characteristics among the species, the present study described four morphotypes of *F. brachygibbosum* and their comparison with three of *F. falciforme* and two of *F. oxysporum*. The categorization of morphotypes was based on the form of growth, mycelial tonalities and color developed in potato dextrose agar from 32 pathogenic *Fusarium* isolates in watermelon. The four morphotypes of *F. brachygibbosum* presented thick walled single and double chlamydospores, intercalary and terminal. Short monophialides and scarce polyphialides; macroconidia with apical slightly hook shaped cells

características macroscópicas y microscópicas distintivas entre las especies, en el presente trabajo se realizó la descripción de cuatro morfotipos *F. brachygibbosum* y su comparación con tres de *F. falciforme* y dos de *F. oxysporum*. La categorización de los morfotipos se realizó, con base en la forma de crecimiento, tonalidades del micelio y el color desarrollado en agar-dextrosa-papa, a partir de 32 aislados de *Fusarium* patogénicos en sandía. Los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* presentaron clamidosporas sencillas o dobles, de pared gruesa, intercalares y terminales. Monofialides cortas y escasas polifialides. Macroconidios con células apicales en ligera forma de gancho y células basales con forma típica o ligera forma de pie. El mayor grosor de paredes fue distintivo en las clamidosporas de *F. brachygibbosum*. La morfología de los macroconidios fue diferente en las tres especies. Una característica distintiva en los morfotipos de *F. falciforme* fueron las monofialides largas y delgadas; mientras que en los de *F. oxysporum* fue la ausencia de septos en los microconidios. El tamaño de los macroconidios y microconidios fue significativamente diferente entre los morfotipos, pero no entre las especies.

**Palabras clave:** marchitez, macroconidios, microconidios, clamidosporas, polifialides.

El género *Fusarium* comprende muchas especies de hongos filamentosos ampliamente distribuidos a nivel mundial. Varios miembros de este género pueden causar enfermedades en plantas, animales y humanos. Diferentes especies de *Fusarium* causan enfermedades en algunos de los más importantes cultivos, como arroz, maíz, trigo, frijol, soya, calabaza, melón y sandía, entre otros (Smith, 2007).

El cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) genera alrededor de 300 millones de dólares anuales

and basal cells with a typical or slight foot shape. The greater thickness of the walls was distinctive in chlamydospores of *F. brachygibbosum*. The morphology of the macroconidia was different in the three species. A distinctive characteristic of *F. falciforme* morphotypes was the long and thin monophialides while in those of *F. oxysporum* was the absence of septa in the microconidia. The size of macroconidia and microconidia was significantly different among the morphotypes but not within the species.

**Key words:** wilting, macroconidia, microconidia, chlamydospores, polyphialides.

The genus *Fusarium* includes many filamentous fungi that are widely distributed all over the world. Several members of this genus cause diseases in plants, animals and humans. Different *Fusarium* species cause diseases in some of the most important crops, such as rice, maize, wheat, beans, soybeans, squash, melon and watermelon, among others (Smith, 2007).

Watermelon (*Citrullus lanatus*) production in Mexico generates around US \$300 million per year and the main watermelon producer is the state of Sonora. The economic benefits of watermelon cropping in Sonora exceed US \$30 million a year (SIAP, 2017). However, watermelon fields in the state are frequently threatened by several fungal diseases.

Most research studies point to *Fusarium oxysporum* and *F. solani* as the main causes of death of watermelon plants by wilt and root rot. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* is considered the most important of the fungi that cause wilt in watermelon crops worldwide (Egel and Martyn, 2007; Zhou *et al.*, 2010; Turóczy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (races 1 and 2) is another species that causes

en México y el estado de Sonora es su principal productor. La derrama económica por el cultivo de sandía en Sonora supera los 30 millones de dólares al año (SIAP, 2017). Sin embargo, frecuentemente los plantíos de sandía, en este estado, se ven amenazados por diversas enfermedades de origen fúngico.

La mayoría de los trabajos señalan a *Fusarium oxysporum* y *F. solani* como los principales responsables de la muerte por marchitez y pudrición de raíz, en plantas de sandía. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* es considerado el más importante de los hongos causantes de marchitez en los cultivos de sandía alrededor del mundo (Egel y Martyn, 2007; Zhou *et al.*, 2010; Turóczy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, razas 1 y 2, es otra especie causante de marchitez en plantas de sandía, aunque su prevalencia es menos reconocida. La raza 2 solamente afecta a los frutos causando una pudrición seca; la raza 1 afecta tanto a frutos maduros como a plantas causando pudrición seca y pudrición cortical del tallo, respectivamente (Boughalleb *et al.*, 2005; Mehl y Epstein, 2007).

Recientemente, Rentería-Martínez *et al.* (2018), identificaron a *Fusarium falciforme* (perteneciente al complejo de especies de *Fusarium solani*), *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*, además de *Rhizoctonia solani* y *Ceratobasidium* sp., como los hongos asociados a marchitez y pudrición de raíz en plantas de sandía cultivadas en Sonora, México.

*Fusarium brachygibbosum* ha sido identificado como patógeno en leguminosas (Tan *et al.*, 2011), en plantas de palma datilera (Al-Sadi *et al.*, 2012), *Euphorbia larica* (Al-Mahmooli *et al.*, 2013), *Nerium oleander* (Mirhosseini *et al.*, 2014), *Striga hermonthica* (Rna *et al.*, 2014), plantas medicinales (Gashgari *et al.*, 2016), almendro (Stack *et al.*, 2017), maíz (Shan *et al.*, 2017), olivo (Trabelsi *et al.*, 2017), girasol (Xia *et al.*, 2018) y remolacha azucarera (Cao *et al.*, 2018). En estos reportes, la

wilt in watermelon plants, although with lower prevalence. Race 2 affects only watermelon fruit, in which it causes dry rot, but race 1 affects both mature fruits and plants, in which it causes dry rot and cortical stem rot, respectively (Boughalleb *et al.*, 2005; Mehl and Epstein, 2007).

Recently, Rentería-Martínez *et al.* (2018) identified *Fusarium falciforme* (belonging to *Fusarium solani* species complex), *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*, as well as *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp., as fungi associated with wilt and root rot in watermelon plants grown in Sonora, Mexico.

*Fusarium brachygibbosum* has been identified as a pathogen in legumes (Tan *et al.*, 2011), date palm plants (Al-Sadi *et al.*, 2012), *Euphorbia larica* (Al-Mahmooli *et al.*, 2013), *Nerium oleander* (Mirhosseini *et al.*, 2014), *Striga hermonthica* (Rna *et al.*, 2014), medicinal plants (Gashgari *et al.*, 2016), almond trees (Stack *et al.*, 2017), maize (Shan *et al.*, 2017), olive trees (Trabelsi *et al.*, 2017), sunflower (Xia *et al.*, 2018) and sugar beet (Cao *et al.*, 2018). According to these reports, *F. brachygibbosum* was identified through molecular techniques, and only a brief morphological description was included using the morphotype reported by Padwick (1945) as a reference in all the cases, but without considering the diversity of morphotypes of the specie.

According to Leslie *et al.* (2001), the different shapes of the macroconidia are essential for identifying many *Fusarium* species, but there are other useful traits that could be used to distinguish the species of a genus. Traditionally, *Fusarium* species have been identified based on their morphological characteristics, such as the shape and size of macro- and microconidia, and the absence or presence and shape of chlamydospores. The appearance, shape and pigmentation of the colonies, as well as their growth rates in different

identificación de la especie se realizó mediante técnicas moleculares y solo se incluyó una somera descripción morfológica, tomando como referencia, en todos los casos, al morfotipo reportado por Padwick (1945), sin considerar la diversidad de morfotipos existente en la especie.

De acuerdo con Leslie *et al.* (2001), las diferencias en la forma de los macroconidios son fundamentales para la identificación de muchas especies de *Fusarium*, pero además hay otros caracteres útiles para diferenciar entre las especies de un género. Tradicionalmente la identificación de las especies de *Fusarium* se realiza en base a características morfológicas, tales como: forma y tamaño de macro y microconidios, la ausencia o presencia y forma de las clamidosporas. La apariencia, forma y pigmentación de las colonias, así como las velocidades de crecimiento en diferentes medios, también son tomadas en consideración (Leslie y Summerell, 2006; Ismail *et al.*, 2015). Esto resalta la importancia de conocer que caracteres morfológicos son los que pueden ayudar en la identificación de las especies de *Fusarium* causantes de muerte en plantas de sandía en Sonora.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar y comparar la variabilidad morfológica entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* encontrados como agentes causales de marchitez en plantas de sandía cultivadas en Sonora, México, con el fin de establecer las características macroscópicas y microscópicas distintivas entre las especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los sitios y la metodología de muestreo de las plantas sintomáticas, el aislamiento y obtención de cultivos monospóricos, la extracción de ADN, la identificación molecular y las pruebas patogenicidad

media, are also taken into consideration (Leslie and Summerell, 2006; Ismail *et al.*, 2015). These findings highlight the importance of knowing which morphological traits can help identify the *Fusarium* species that cause watermelon plants to die in Sonora.

Based on the above, the objective of this study was to analyze and compare the morphological variability among *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes identified as being the causal agents of wilt in watermelon plants grown in Sonora, Mexico, in order to establish the distinctive macro- and microscopic characteristics of these species.

## MATERIALS AND METHODS

The sites and methodology used to sample plants showing symptoms, isolation, monosporic cultures, DNA extraction, as well as to do the molecular identification and conduct pathogenicity tests on the isolates following Koch's postulates, were described and published by Rentería-Martínez *et al.* (2018). A total of 25 *Fusarium falciforme* isolates, five *F. brachygibbosum* isolates, and two *F. oxysporum* isolates were identified.

**Morphotype classification.** Morphotypes of each species were established based on the type of growth, mycelium color and culture medium pigmentation. Assessments were conducted on one isolate that was representative of each morphotype.

**Morphology and growth rate of the colonies.** The macroscopic characteristics of the colonies (mycelium growth rate, color of the colony and pigmentation) were evaluated in potato-dextrose-agar (PDA) medium. The growth rate of each isolate was determined by taking a disk 8 mm

de los aislados en cumplimiento con los postulados de Koch se describieron y publicaron por Rentería-Martínez *et al.* (2018). En total se identificaron 25 aislados de *Fusarium falciforme*, cinco de *F. brachygibbosum* y dos *F. oxysporum*.

**Clasificación de morfotipos.** Los morfotipos de cada especie se establecieron con base en el tipo de crecimiento, coloración del micelio y pigmentación del medio de cultivo. Las determinaciones se realizaron en un aislado representativo de cada morfotipo.

**Morfología y velocidad de crecimiento de las colonias.** Las características macroscópicas de las colonias (tasa de crecimiento del micelio, color de la colonia y pigmentación) se evaluaron en medio PDA. La tasa de crecimiento de cada aislado se determinó tomando un disco de 8 mm de diámetro de colonias de 7 días de desarrollo en PDA y colocándolo al centro de otra placa con PDA. Las placas se incubaron a 27 °C y se midió diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares hasta que el cultivo cubrió completamente la placa. Se evaluaron cinco repeticiones por cada aislado. Se registró la morfología de las colonias y la pigmentación aérea del micelio (Nelson *et al.*, 1983).

**Análisis de las características microscópicas.** Los diferentes morfotipos se cultivaron en agar hojas de clavel (CLA), de acuerdo con Fisher *et al.* (1982). Para promover la formación de clamidosporas, se utilizó agar de suelo (SA), según Klotz *et al.* (1988). Los cultivos en CLA y SA se incubaron en las mismas condiciones: 25 °C, 12 h luz /12 h oscuridad durante dos semanas.

Las preparaciones microscópicas en portaobjetos se examinaron con un microscopio de luz compuesto (VELAB™). Para observar y medir el tamaño de los conidios, filídes y clamidosporas

in diameter containing 7-day-old colonies in PDA and placing it in the middle of another dish containing PDA. The dishes were incubated at 27 °C and the colony's diameter was measured in two perpendicular directions every day until the dish was completely covered by the culture. Five replicates of each isolate were evaluated. The morphology of the colonies and the aerial pigmentation of the mycelium were recorded (Nelson *et al.*, 1983).

**Analysis of microscopic characteristics.** The different morphotypes were cultured in carnation leaf agar (CLA), according to the method of Fisher *et al.* (1982). To promote the formation of chlamydospores, soil-agar (SA) was used, according to the method of Klotz *et al.* (1988). The CLA and SA cultures were incubated under the same conditions: 25 °C, 12 h light/12 h darkness for two weeks.

Microscopic preparations on slides were observed using a compound light microscope (VELAB™). To observe and measure the size of the conidia, phialides and chlamydospores, pictures were taken at 40X and 100X, which were then analyzed using TSView software, version 6.2.4.5. The length and width of 50 macroconidia and 50 microconidia randomly selected from each isolate were measured.

**Statistical analysis.** Data on macroconidial and microconidial length and width were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and media separation using Tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ) and the JMP program v5.0.1a.

## RESULTS

**Morphotype classification and growth rate.** The 25 *F. falciforme* isolates were grouped in three



se tomaron fotografías a 40X y 100X, luego se analizaron utilizando el software TSVIEW, versión 6.2.4.5. Se midió la longitud y el ancho de cincuenta macroconidios y cincuenta microconidios seleccionados al azar de cada aislado.

**Análisis estadístico.** Los datos de longitud y ancho de macroconidios y microconidios fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ), utilizando el programa JMP v5.0.1a.

## RESULTADOS

**Clasificación de morfotipos y velocidad de crecimiento.** Los 25 aislados de *F. falciforme* se agruparon en tres morfotipos (Ff-14, Ff-49 y Ff-50), los cinco aislados de *F. brachygibbosum* en cuatro (Fb-8, Fb-9, Fb-41 y Fb-67) y los dos de *F. oxysporum* en uno (Fo-38). En el Cuadro 1 se presentan las velocidades de crecimiento y las características macroscópicas observadas en los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* en PDA. La Figura 1 evidencia la presencia de los cuatro morfotipos patogénicos de *F. brachygibbosum*, encontrados en los campos de sandía en Sonora.

**Características microscópicas.** En el Cuadro 2 se resume la morfología de las clamidosporas y las células conidiógenas observada en los aislados representativos de cada morfotipo en las tres especies. En todos los casos se observaron clamidosporas redondas intercalares y terminales, principalmente sencillas y dobles; sin embargo, el mayor grosor en la pared de las clamidosporas de los morfotipos de *F. brachygibbosum* (Figura 2A) parece ser una característica que lo diferencia de *F. falciforme* y *F. oxysporum* (Figura 2B-C). En lo referente a las células conidiógenas, los morfotipos de *F. falciforme*

morfotipos (Ff-14, Ff-49 and Ff-50), the five *F. brachygibbosum* isolates in four morphotypes (Fb-8, Fb-9, Fb-41 and Fb-67), and the two *F. oxysporum* isolates in one morphotype (Fo-38). Table 1 shows the growth rates and macroscopic characteristics observed in *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes grown in PDA. Figure 1 shows the presence of the four *F. brachygibbosum* pathogenic morphotypes found in watermelon fields in Sonora.

**Microscopic characteristics.** Table 2 summarizes the chlamydospores morphology and conidiogenic cells observed in isolates representative of each morphotype in the three species. In all cases, spherical, intercalary and terminal chlamydospores were observed, mainly singly and in pairs; however, the walls of the chlamydospores of *F. brachygibbosum* morphotypes (Figure 2A) are thicker, which seems to be a characteristic that distinguishes them from those of *F. falciforme* and *F. oxysporum* (Figure 2B-C). Regarding conidiogenic cells, *F. falciforme* morphotypes (Figure 2B) differ from the others because their monophialides are longer and thinner.

Table 3 shows a morphological description of the macroconidia and microconidia of isolates that are representative of each morphotype. There were some differences among the three species. The four *F. brachygibbosum* morphotypes had thin, straight macroconidia with three to five septa, the cells in the middle were slightly wide and the intermediate cells were curved towards the basal part. The apical cells were slightly hook-shaped, while the basal cells had a typical shape or were slightly foot-shaped (Figure 3). *F. falciforme* macroconidia were wide and straight, or slightly curved, but the ventral and dorsal planes were parallel along most of their length, the apical cells were rounded, while the basal cells were straight and cylindrical with

**Cuadro 1. Velocidad de crecimiento en PDA y características macroscópicas de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía.**  
**Table 1. Growth rate on PDA and macroscopic characteristics of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes pathogenic to watermelon.**

|                          | Velocidad de crecimiento <sup>x</sup> | Morfología de las colonias                                                                                                       | Pigmentación <sup>y</sup>                                                                                                   |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                       |                                                                                                                                  |                                                                                                                             |
| Fb-8                     | 4.9                                   | Micelio aéreo, veloso de color blanco, tornándose amarillo y rosa con esporodoquios amarillos después de 2 semanas.              | Café claro, con manchas café oscuro alrededor de los esporodoquios.                                                         |
| Fb-9                     | 4.2                                   | Micelio aéreo, veloso de color amarillo, con esporodoquios color café después de 2 semanas.                                      | Amarillo-naranja con el centro café rojizo en forma de estrella. Con manchas café oscuras alrededor de los esporodoquios.   |
| Fb-41                    | 4.8                                   | Micelio aéreo, veloso de color café claro, con esporodoquios café después de 2 semanas.                                          | Centro café oscuro con anillos concéntricos menos café hacia afuera. Con manchas café claro alrededor de los esporodoquios. |
| Fb-67                    | 4.6                                   | Micelio aéreo, veloso de color blanco al inicio. Tornándose rosa con el desarrollo esporodoquios amarillos después de 2 semanas. | Rojo intenso brillante en todo el fondo de la caja.                                                                         |
| <i>F. falciforme</i>     |                                       |                                                                                                                                  |                                                                                                                             |
| Ff-14                    | 4.1                                   | Micelio postrado de color beige. Crecimiento en anillos concéntricos, sin formación de esporodoquios.                            | Café claro con halos café oscuros debido al crecimiento en forma de anillo.                                                 |
| Ff-49                    | 3.6                                   | Micelio postrado de color beige, sin formación de esporodoquios.                                                                 | Café claro.                                                                                                                 |
| Ff-50                    | 3.9                                   | Micelio postrado de color blanco, sin formación de esporodoquios.                                                                | Beige muy claro, cubriendo toda la caja.                                                                                    |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                       |                                                                                                                                  |                                                                                                                             |
| Fo-38                    | 3.4                                   | Micelio veloso de color blanco, el cual se torna púrpura después de una semana. Sin formación de esporodoquios.                  | Púrpura en toda la caja.                                                                                                    |

<sup>x</sup> mm/día / mm/day.

<sup>y</sup> Fondo de la caja Petri / Bottom of the Petri dish.

(Figura 2B) se distinguen de los demás, por tener monofialides más largas y delgadas.

En el Cuadro 3 se presenta la descripción morfológica de los macroconidios y microconidios de los aislados representativos de cada morfotipo. Se observaron algunas diferencias entre las tres especies. Los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* presentaron macroconidios delgados y rectos, con tres a cinco septos, las células del centro ligeramen-

a barely trimmed or round end (Figure 4B). The shape of *F. oxysporum* macroconidia was similar to that of *F. brachygibbosum* macroconidia, but their basal cells were pointed and lower in number, with a barely visible foot shape (Figure 4C).

*F. brachygibbosum* microconidia were oval, sometimes ovoid, usually with one septum, rarely with two or none. *F. oxysporum* microconidia were elliptical, oval and kidney-shaped with no septa. *F.*

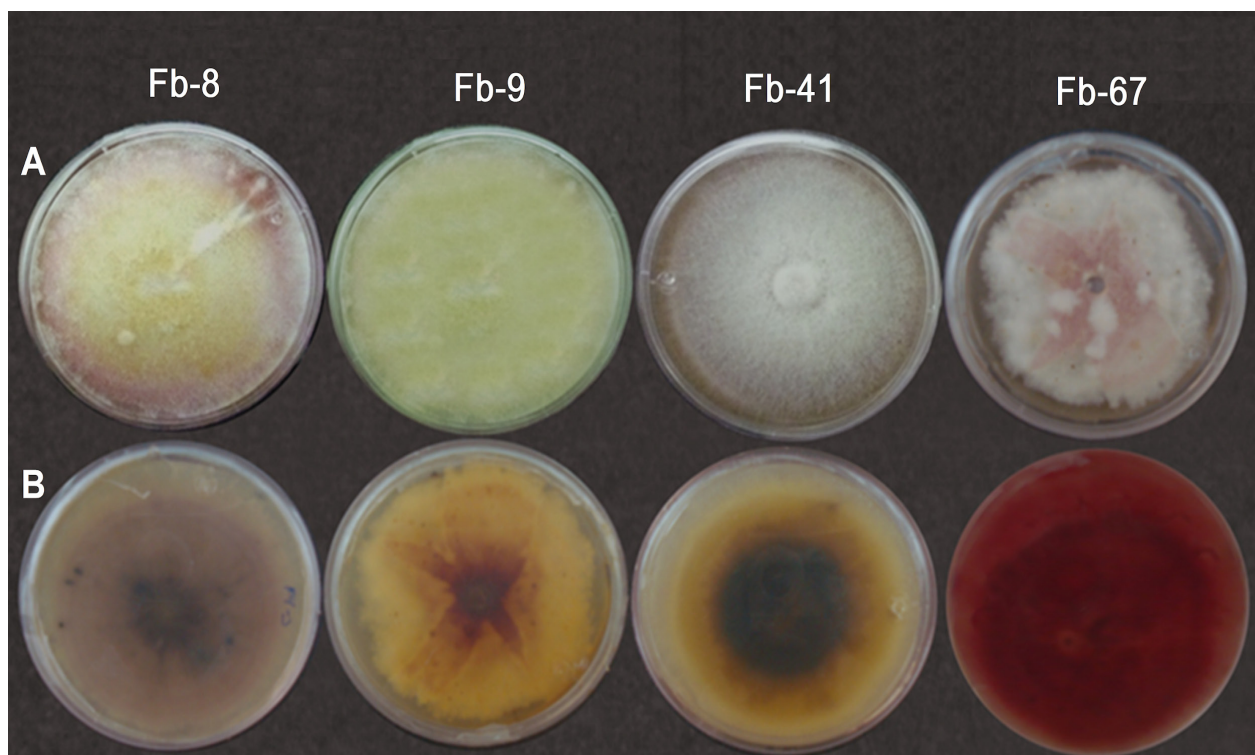


Figura 1. Características morfológicas de las colonias de los 4 morfotipos de *Fusarium brachygibbosum* en PDA. A = Frente  
B = Fondo

Figure 1. Morphological characteristics of colonies of four *Fusarium brachygibbosum* morphotypes grown in PDA. A = Front B = bottom.

Cuadro 2. Morfología de clamidosporas y células conidiógenas en los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía, desarrollados en CLA.

Table 2. Morphology of chlamydo spores and conidiogenous cells *F. brachygibbosum* morphotypes, and isolates that were representative of *F. falciforme* and *F. oxysporum* grown in CLA.

|                          | Forma de las clamidosporas                                                      | Tipo de células conidiógenas                                  |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                                                                 |                                                               |
| Fb-8                     | Dobles. Intercalares y terminales. Pared gruesa.                                | Monofiálides cortas. Algunas polifiálides cortas.             |
| Fb-9                     | Sencillas. Intercalares. Pared gruesa.                                          | Monofiálides cortas. Algunas polifiálides cortas.             |
| Fb-41                    | Sencillas. Intercalares. Pared gruesa.                                          | Monofiálides cortas. Algunas polifiálides cortas.             |
| Fb-67                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared gruesa.                    | Monofiálides cortas. Algunas polifiálides cortas.             |
| <i>F. falciforme</i>     |                                                                                 |                                                               |
| Ff-14                    | Sencillas, dobles y en cadena. Intercalares y terminales. Pared mediana.        | Monofiálides muy largas y algunas cortas. Pocas polifiálides. |
| Ff-49                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared de grosor medio o delgado. | Monofiálides muy largas y algunas cortas. Pocas polifiálides. |
| Ff-50                    | Sencillas y dobles. Terminales. Pared de grosor medio o delgado.                | Monofiálides muy largas abundantes. Pocas polifiálides.       |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                                                                 |                                                               |
| Fo-38                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared de grosor medio o delgado. | Monofiálides cortas y escasa presencia de polifiálides.       |

te anchas centro y las intermedias curvadas hacia la parte basal. Las células apicales tuvieron ligera forma de gancho y las células basales la forma típica o ligera forma de pie (Figura 3). Los macroconidios de *F. falciforme* fueron anchos y rectos

*falciforme* had oval, ellipsoid and kidney-shaped microconidia with a truncated basal part, and some of them were pyriform and fusiform with one or two septa, or none (Table 3, Figure 4 D-F). Due to shape variability, it was not possible to observe

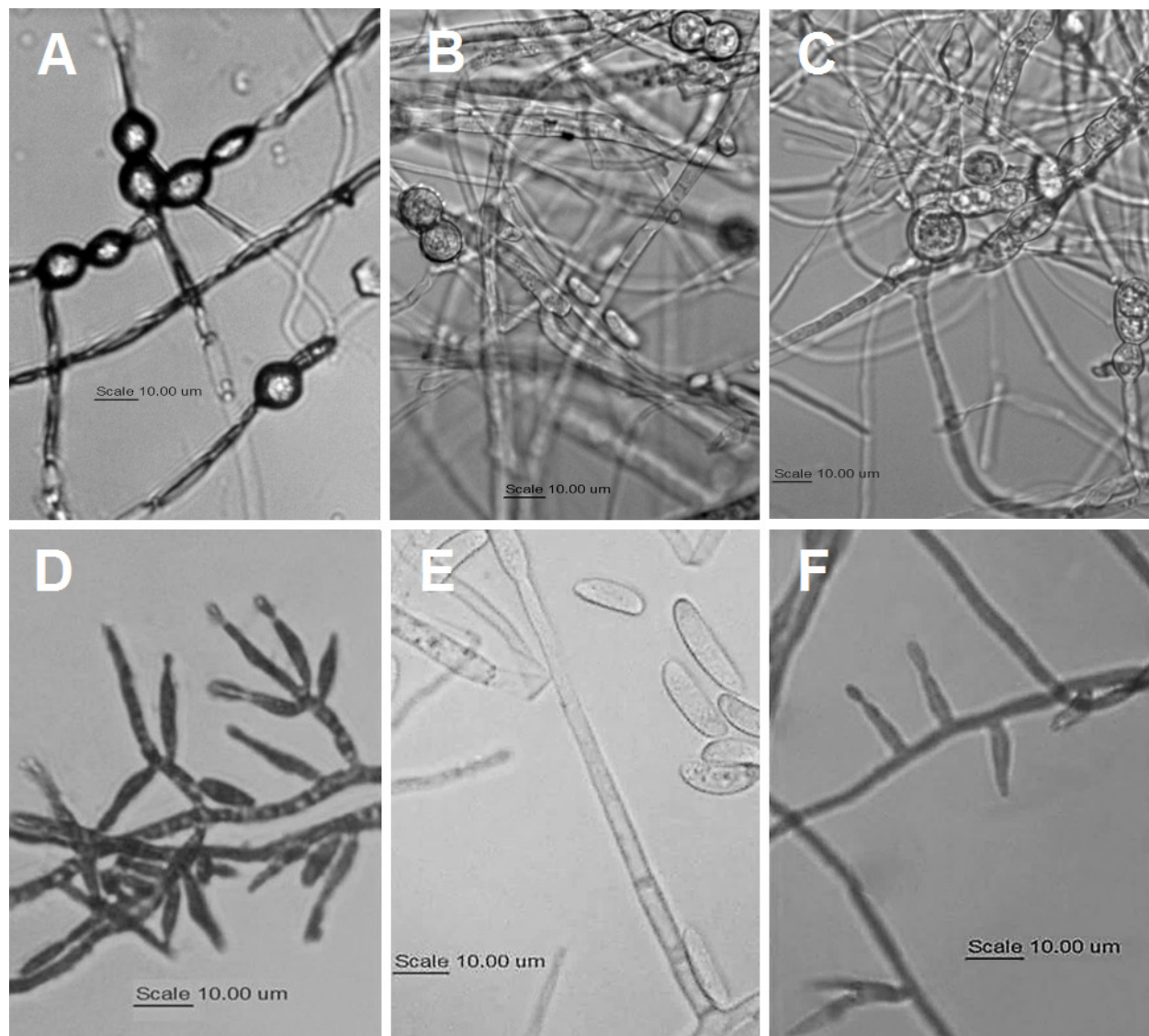


Figura 2. A-C: Morfología de clamidosporas. A = *F. brachygibbosum*, B = *F. falciforme* y C = *F. oxysporum*. D-F: Morfología de células conidiógenas. D = polifialídes y monofialídes de *F. brachygibbosum*, E = monofialíde de *F. falciforme* y F = monofialídes de *F. oxysporum*.

Figure 2. A-C: Morphology of chlamydospores of A = *F. brachygibbosum*; B = *F. falciforme*; and C = *F. oxysporum*. D-F: Morphology of conidiogenous cells: D = polyphialides and monophialides of *F. brachygibbosum*, E = monophialides of *F. falciforme*, and F = monophialides of *F. oxysporum*.

o ligeramente curvados, pero con el plano ventral y dorsal paralelos en la mayor parte de su longitud, sus células apicales fueron redondeadas y las basales rectas y cilíndricas con el extremo apenas

differences among macroconidia from different species, and only the absence of septa in all *F. oxysporum* (Figure 4F) microconidia observed seems to be a distinctive trait.

**Cuadro 3. Morfología de macroconidios y microconidios de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía, desarrollados en CLA.**

**Table 3. Morphology of macroconidia and microconidia of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes pathogenic to watermelon grown in CLA.**

|                          | Forma de macroconidios                                                                                                                                                                                                                                   | Forma de microconidios                                                                                 |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Fb-8                     | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con ligera forma de pie. Tres o cuatro septos.                                            | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-9                     | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con típica forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-41                    | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con típica forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-67                    | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con ligera forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| <i>F. falciforme</i>     |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Ff-14                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados o redondeados. Con tres a seis septos. | Ovales, elipsoides, reniformes y fusiformes. Con la parte basal truncada. Con ningún o con un septo.   |
| Ff-49                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados. Con tres a seis septos.               | Ovales, elipsoides y reniformes. Con cero, uno o dos septos.                                           |
| Ff-50                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados. Con cuatro a seis septos.             | Ovales, elipsoides, reniformes y ocasionalmente piriformes. Con cero, uno y ocasionalmente dos septos. |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Fo-38                    | Cortas a medianas y esbeltas. Rectas o ligeramente curvadas. Células apicales cónicas con ligera forma de gancho y células basales en forma puntiaguda. Tres o cuatro septos.                                                                            | Ovales típicas, elípticas y forma de riñón. Sin septos.                                                |

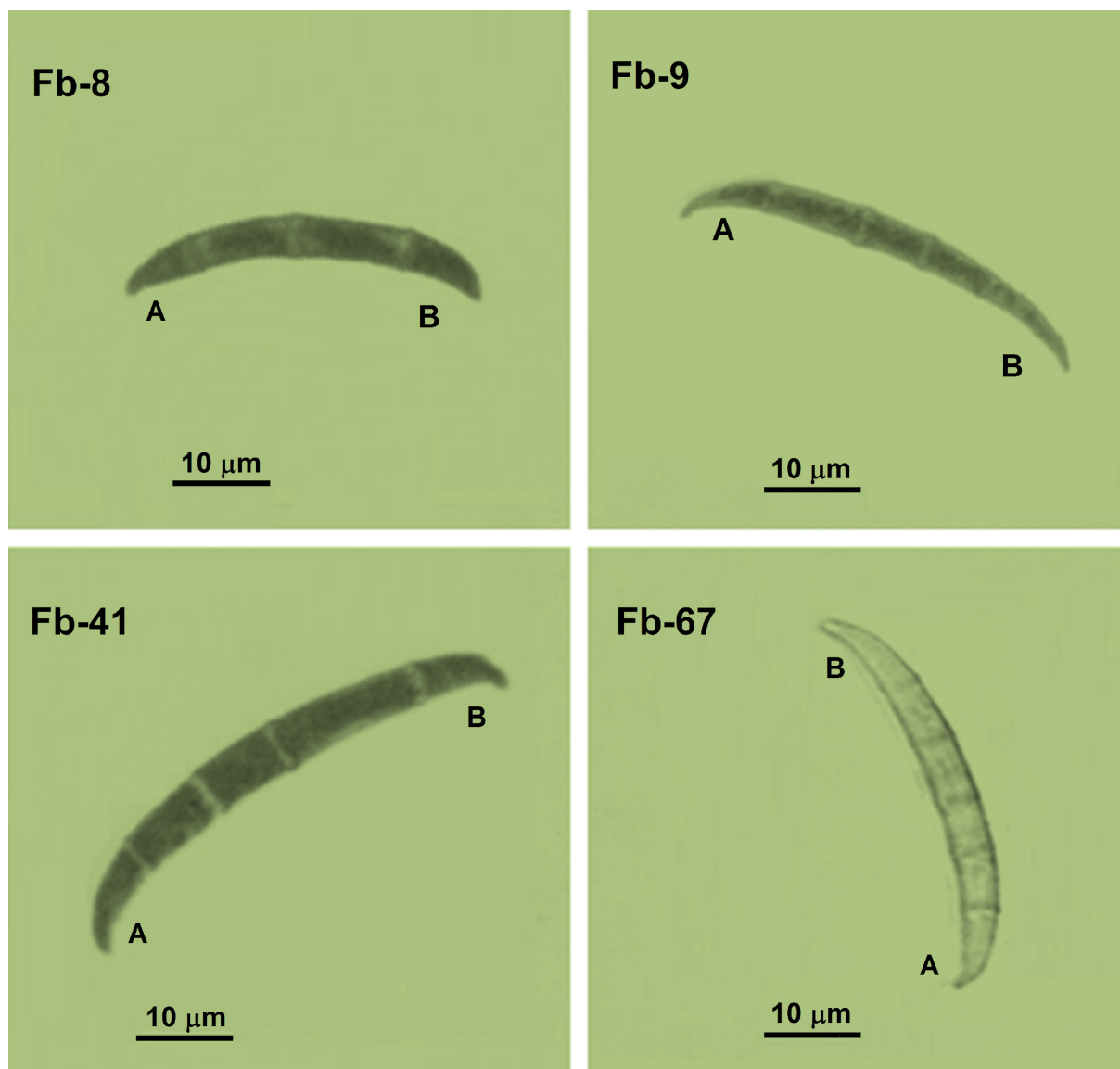
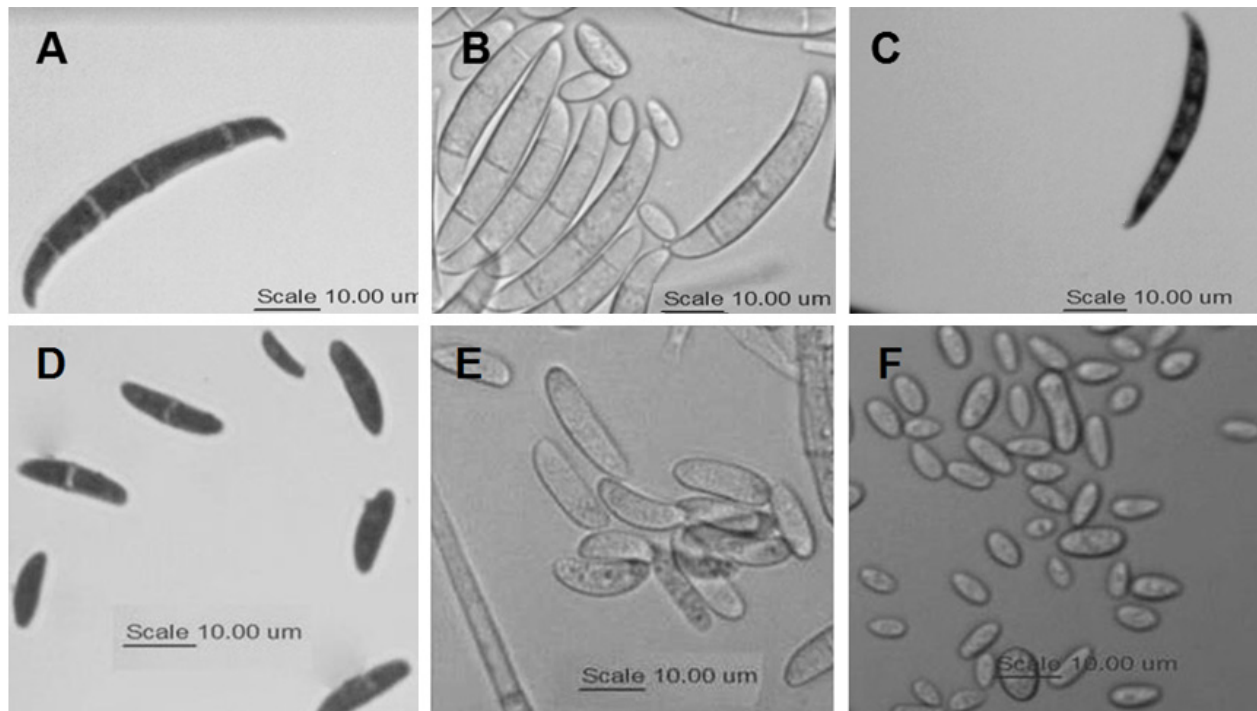


Figura 3. Morfología de las macroconidios de los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum*. A = células apicales con forma ligera de gancho y B = células basales con ligera forma de pie (Fb-8 y Fb-67) y típica forma de pie (Fb-9 y FB-41).  
Figure 3. Morphology of macroconidia of four *F. brachygibbosum* morphotypes. A = slightly hook-shaped apical cells; and B = slightly foot-shaped basal cells (Fb-8 and Fb-67) and typical foot-shaped cells (Fb-9 and FB-41).

recortado o redondeado (Figura 4B). La forma de los macroconidios de *F. oxysporum* fue parecida a la de *F. brachygibbosum*, pero con células basales puntiagudas y en menor cantidad con forma de pie apenas visible (Figura 4C).

Table 4 shows the average length and width of the macroconidia, according to the number of septa and the average of 50 cells. The statistical analysis detected significant differences in the average length and width of the macroconidia among the isolates,



**Figura 4. Morfología de macroconidios y microconidios de las tres especies de *Fusarium* patógenas de sandía. A = macroconidios de *F. brachygibbosum*, B = macroconidios de *F. falciforme* y C) macroconidios de *F. oxysporum*. D = microconidios de *F. brachygibbosum*, E = microconidios de *F. falciforme* y F) microconidios de *F. oxysporum*.**

**Figure 4. Morphology of macroconidia and microconidia of three *Fusarium* species pathogenic to watermelon. A = macroconidia of *F. brachygibbosum*, B = macroconidia of *F. falciforme*, and C) macroconidia of *F. oxysporum*. D = macroconidia of *F. brachygibbosum*, E = microconidia of *F. falciforme*, and F) microconidia of *F. oxysporum*.**

Los microconidios de *F. brachygibbosum* fueron ovales y ocasionalmente ovoides, por lo general con un septo, rara vez con dos o ninguno. Los de *F. oxysporum* fueron ovales elípticos y en forma de riñón sin septos. *F. falciforme* presentó microconidios con la parte basal trunca, ovales, elipsoides y reniformes, con algunos piriformes y fusiformes, con ninguno, uno o dos septos (Cuadro 3, Figura 4 D-F). La variabilidad de formas no permitió observar diferencias en los microconidios de las diferentes especies; solo la ausencia de septos en todos los microconidios observados en *F. oxysporum* (Figura 4F) parece ser un rasgo distintivo.

but due to the variability in size within the species, it was not possible to observe the differences between them. Macroconidia with Fb-8 and Fb-9 morphotypes had no significant size differences compared to *F. oxysporum* Fo-38 morphotypes. No significant differences were detected in the size of Fb-41, Fo-39 and Ff-49 macroconidia, nor among Fb-67, Ff-50 and Ff-14 macroconidia.

Table 5 shows the average length and width of the macroconidia, according to the number of septa and the average of 50 cells. In general, significant differences were detected in the size of the macroconidia among isolates but not among

**Cuadro 4. Tamaño de macroconidios de aislados de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía, desarrollados en CLA, de acuerdo con su número de septos.**  
**Table 4. Size of macroconidia of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* isolates pathogenic to watermelon grown in CLA, according to the number of septa.**

|                          | Tamaño de macroconidios (µm) <sup>x</sup> |             |              |             |              |             |              |             |                       |              |
|--------------------------|-------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------|--------------|
|                          | 3                                         |             | 4            |             | 5            |             | 6            |             | Promedio <sup>y</sup> |              |
|                          | Largo                                     | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo                 | Ancho        |
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                           |             |              |             |              |             |              |             |                       |              |
| Fb-8                     | 30.74 ± 4.49                              | 3.29 ± 0.35 | 35.13 ± 3.79 | 3.18 ± 0.35 | -            | -           | -            | -           | 31.45 ± 4.09F         | 3.28 ± 0.35E |
| Fb-9                     | 34.16 ± 3.72                              | 3.58 ± 0.52 | 38.98 ± 2.16 | 4.04 ± 0.30 | 42.34 ± 2.93 | 3.54 ± 0.13 | -            | -           | 35.52 ± 4.35 E        | 3.65 ± 0.51D |
| Fb-41                    | 35.52 ± 4.49                              | 3.70 ± 0.55 | 38.25 ± 5.08 | 3.85 ± 0.64 | 39.46 ± 9.50 | 4.13 ± 0.51 | -            | -           | 37.04 ± 5.33DE        | 3.80 ± 0.59D |
| Fb-67                    | 40.01 ± 7.19                              | 4.28 ± 0.37 | 45.04 ± 5.65 | 4.32 ± 0.47 | 50.08 ± 1.54 | 4.61 ± 0.28 | -            | -           | 43.04 ± 6.97AB        | 4.33 ± 0.42C |
| <i>F. falciforme</i>     |                                           |             |              |             |              |             |              |             |                       |              |
| Ff-14                    | 40.11 ± 0.65                              | 4.69 ± 0.11 | 43.55 ± 1.16 | 5.03 ± 0.10 | 45.90 ± 0.68 | 5.35 ± 0.08 | 47.3 ± 0.23  | 5.64 ± 0.10 | 44.04 ± 0.82A         | 5.13 ± 0.10A |
| Ff-49                    | 37.60 ± 1.59                              | 4.47 ± 0.28 | 39.10 ± 1.46 | 4.82 ± 0.20 | 40.67 ± 1.30 | 4.69 ± 0.42 | 43.30 ± 1.55 | 5.07 ± 0.36 | 39.90 ± 1.45CD        | 4.77 ± 0.29B |
| Ff-50                    | -                                         | -           | 38.74 ± 0.57 | 3.80 ± 0.16 | 41.04 ± 0.92 | 3.74 ± 0.10 | 43.45 ± 0.62 | 3.88 ± 0.06 | 40.56 ± 0.71BCD       | 3.83 ± 0.12D |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                           |             |              |             |              |             |              |             |                       |              |
| Fo-38                    | 32.22 ± 3.07                              | 3.32 ± 0.47 | 35.48 ± 2.84 | 3.26 ± 0.31 | -            | -           | -            | -           | 33.26 ± 3.00E         | 3.30 ± 0.42E |

<sup>x</sup> Media ± SD. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) / Means ± SD. Different letters indicate a significant difference (p< 0.05).

<sup>y</sup> Promedio de 50 células (Average of 50 cells) / Average of 50 cells.

- No se observaron suficientes células para su medición (No observed sufficient cells to measure) / Not enough cells observed.



En el Cuadro 4 se observan las medias de largo y ancho de los macroconidios de acuerdo con el número de septos y el promedio de 50 células. El análisis estadístico permitió detectar diferencias significativas en el largo y ancho promedio de los macroconidios entre los aislados; sin embargo, la variabilidad de tamaños dentro de las especies no permitió establecer diferencias entre ellas. Los macroconidios de los morfotipos Fb-8 y Fb-9 no mostraron diferencias significativas en tamaño con respecto a los morfotipos Fo-38 de *F. oxysporum*. No se detectó diferencia significativa entre el tamaño de los macroconidios de Fb-41, Fo-39 y Ff-49. Tampoco se observó diferencia significativa entre Fb-67, Ff-50 y Ff-14.

El Cuadro 5 presentan las medias de largo y ancho de los microconidios de acuerdo con el número de septos y el promedio de 50 células. Se detectaron diferencias significativas en el tamaño de los microconidios entre los aislados en general, pero no entre especies. Los morfotipos Fb-41, Fb-67 y Fb-9 presentaron los microconidios de mayor longitud, mientras que Fb-8 fue el de menor tamaño.

## DISCUSIÓN

Padwick (1945) describió que *F. brachygibbosum* crece en PDA desarrollando abundante micelio aéreo, blanco, con tonos rosados y medio de color rojo-sangre. Con microconidios típicos de forma ovoide a fusiforme, o ligeramente curvados cuando son septados, con ninguno, uno, dos o tres septos. Macroconidios dispersos finamente en la superficie del agar, hiperbólicamente curvados, células centrales anchas y de 0 a 5 septos. Células del ápice afiladas y células basales ligeramente afiladas con forma de pie típica. Clamidosporas terminales e intercalares, simples y en cadenas; generalmente unicelulares y globosas, ocasionalmente de 2

species. The Fb-41, Fb-67 and Fb-9 morphotypes had the longest microconidia, while Fb-8 had the shortest.

## DISCUSSION

Padwick (1945) stated that *F. brachygibbosum* grows in PDA and develops an abundance of aerial white mycelia, pinkish tone, and blood-red color in the agar; its microconidia are typically ovoid to fusiform, or slightly curved when they have septa, with one, two, three or no septa. Hyperbolically curved macroconidia are finely dispersed over the agar surface; they have wide central cells and 0-5 septa. Sharp apical cells and slightly sharp basal cells have a typical foot-like shape; terminal and intercalary chlamydospores, single or in chains, are usually unicellular and globose, occasionally with two smooth and granular cells. This description is in agreement with the four *F. brachygibbosum* morphotypes that were found in this study, but the color of the colony and the medium coincides only with the color of Fb-67 and not with the color of Fb-8, Fb-9 and Fb-41.

In general, the type of mycelium, the color of the colonies and the culture medium, as well as the morphology of the macro- and microconidia observed in the most recent *F. brachygibbosum* studies (Al-Sadi *et al.*, 2012; Mirhosseini *et al.*, 2014; Renteria-Martinez *et al.*, 2015; Stack *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018) correspond to the morphotype described by Padwick (1945). All these studies found white colonies that turned yellow with pink or orange tones, and stained the PDA medium bright red. When they were grown in CLA, the macroconidia had thick walls, a bulky center and slightly curved ends (attenuated hook), and a typical foot-like or slightly foot-shaped basal cell; most of them had 4-5 septa.

**Cuadro 5. Tamaño de microconidios de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía, desarrollados en CLA, de acuerdo con su número de septos.**  
**Table 5. Size of microconidia of *F. brachygibbosum* isolates pathogenic to watermelon and pathogenic isolates that were representative of *F. solani* and *F. oxysporum* grown in CLA, according to the number of septa.**

|                          | Tamaño de microconidios (µm) <sup>x</sup> |             |              |             |              |             | Promedio <sup>y</sup> |               |
|--------------------------|-------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------|---------------|
|                          | 0                                         |             | 1            |             | 2            |             | Largo                 | Ancho         |
|                          | Largo                                     | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo        | Ancho       |                       |               |
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                           |             |              |             |              |             |                       |               |
| Fb-8                     | -                                         | -           | 13.79 ± 1.84 | 3.95 ± 0.46 | -            | -           | 13.79 ± 1.84b         | 3.95 ± 0.46C  |
| Fb-9                     | -                                         | -           | 7.15 ± 0.43  | 2.40 ± 0.64 | -            | -           | 7.15 ± 0.43b          | 2.40 ± 0.64A  |
| Fb-41                    | -                                         | -           | 18.78 ± 2.92 | 3.81 ± 0.47 | -            | -           | 18.78 ± 2.92a         | 3.81 ± 0.47A  |
| Fb-67                    | -                                         | -           | 17.73 ± 3.67 | 3.91 ± 2.53 | -            | -           | 17.73 ± 3.67a         | 3.91 ± 2.53A  |
| <i>F. falciforme</i>     |                                           |             |              |             |              |             |                       |               |
| Ff-14                    | 11.42 ± 2.29                              | 3.21 ± 0.34 | 11.06 ± 2.39 | 3.15 ± 0.35 | -            | -           | 11.18 ± 2.36c         | 3.17 ± 0.35A  |
| Ff-49                    | 9.41 ± 0.86                               | 2.94 ± 0.63 | 10.61 ± 0.88 | 3.85 ± 0.51 | 11.18 ± 1.02 | 4.91 ± 0.47 | 10.29 ± 0.89cd        | 3.73 ± 0.55AB |
| Ff-50                    | 10.26 ± 1.10                              | 3.68 ± 0.53 | 11.99 ± 0.45 | 4.18 ± 0.25 | -            | -           | 11.17 ± 0.75c         | 3.95 ± 0.38A  |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                           |             |              |             |              |             |                       |               |
| Fo-38                    | 8.56 ± 1.40                               | 3.05 ± 0.56 | -            | -           | -            | -           | 8.56 ± 1.40de         | 3.05 ± 0.56BC |

<sup>x</sup> Media ± SD. Letras diferentes indican diferencia significativa (p < 0.05) / Means ± SD. Different letters indicate a significant difference (p < 0.05).

<sup>y</sup> Promedio de 50 células (Average of 50 cells) / Average of 50 cells.

-No se observaron suficientes células para su medición (No observed sufficient cells to measure) / Not enough cells observed.

células, lisas, granulares. Esta descripción concuerda con los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* encontrados en el presente trabajo; sin embargo, el color de las colonias y del medio solo concuerda con lo observado en Fb-67 y no con Fb-8, Fb-9 y Fb-41.

En general el tipo de micelio, el color de las colonias, color del medio de cultivo y la morfología de los macroconidios y microconidios, observados en los trabajos más recientes sobre *F. brachygibbosum* (Al-Sadi *et al.*, 2012; Mirhosseini *et al.*, 2014; Renteria-Martinez *et al.*, 2015; Stack *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018), corresponden al morfotipo descrito por Padwick (1945). En todos estos estudios se registraron colonias blancas que se tornan amarillo claro con tonos rosa o naranja y el medio PDA teñido en rojo brillante. El crecimiento en CLA permitió observar macroconidios de paredes gruesas, un centro abultado con extremos ligeramente curvados (gancho atenuado) y una célula basal típica en forma de pie o ligeramente en forma de pie, en su mayoría con 4 a 5 septos.

El morfotipo de *F. oxysporum* desarrolló un micelio aéreo blanco que se tornó purpura después de una semana en PDA, similar a lo descrito por Kleczewski y Egel (2011) acerca de *F. oxysporum* f.sp. *niveum* raza 1, aunque sin formación de esporodocios. Al cultivarse en CLA, las características de clamidosporas, células conidiógenas, macroconidios y microconidios correspondieron a lo señalado por Leslie y Summerell (2006), para la especie.

El tipo de crecimiento de las colonias en PDA permite distinguir entre los morfotipos de *F. brachygibbosum* (aéreo) y los de *F. falciforme* (postrado). La presencia de monofialides largas y delgadas, mostradas en los morfotipos *F. falciforme* (Summerbell y Schroers., 2002), es una característica que permite diferenciarlos de *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*, los cuales desarrollaron monofialides más cortas. La forma de los macroconidios de

The *F. oxysporum* morphotype developed white aerial mycelium that turned purple after a week in PDA, a result similar to that described by Kleczewski and Egel (2011) regarding *F. oxysporum* f.sp. *niveum* race 1, but with no sporodochia formation. When cultured in CLA, the characteristics of the chlamydo spores, conidiogenic cells, macroconidia and microconidia were in agreement with the results obtained by Leslie and Summerell (2006) for the species.

The type of growth colonies in PDA makes it possible to distinguish between *F. brachygibbosum* (aerial) and *F. falciforme* (prostrate) morphotypes. The presence of long and thin monophialides observed in *F. falciforme* morphotypes (Summerbell and Schroers, 2002) is a characteristic that allows differentiating them from *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*, which develop shorter monophialides. The shape of *F. falciforme* macroconidia is another trait that distinguishes it from the other species. Similar to the results obtained by Chehri *et al.* (2015), macroconidia of this species were polyseptate, wide and straight or slightly curved, with round apical cells and basal cells with slightly trimmed ends.

The color developed in the agar, the type of conidiogenic cells, as well as macroconidial morphology and size, can cause *F. brachygibbosum* to be mistakenly identified as *F. oxysporum*, which is more common in most of the crops in Sonora, but the morphology of the chlamydo spores, specifically the thickness of their walls, may be a distinctive characteristic that allows differentiating the two species. The morphology of *F. brachygibbosum* chlamydo spores is in agreement with the results obtained by Cao *et al.* (2018). Another characteristic that differs among these species is the lack of septa in *F. oxysporum* microconidia, while *F. brachygibbosum* had mostly microconidia with one septum.

*F. falciforme* es otro rasgo que lo distingue de las otras especies. Similar a lo reportado por Chehri *et al.* (2015) los macroconidios de esta especie fueron poliseptados, anchos y rectos o ligeramente curvados, con células apicales redondeadas y células basales con extremos apenas recortados.

La coloración desarrollada en el agar, el tipo de células conidiógenas, además de la morfología y tamaño de los macroconidios pueden hacer que *F. brachygibbosum* sea identificado erróneamente como *F. oxysporum*, que es más común en la mayoría de los cultivos de la región; pero la morfología de las clamidosporas, específicamente el grosor de la pared, puede ser una característica distintiva que permita diferenciar entre las dos especies. La morfología de las clamidosporas de *F. brachygibbosum* correspondió con lo observado por Cao *et al.* (2018). Otra característica diferente entre estas especies fue la ausencia de septos en los microconidios de *F. oxysporum*, mientras que en *F. brachygibbosum* predominaron los de un septo.

La variabilidad en el tamaño de macroconidios y microconidios entre los morfotipos de una misma especie, no permitió diferenciar entre las tres especies de *Fusarium*.

Se han reportado diferentes tamaños en los conidios de *F. brachygibbosum* (Xia *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2017; Mirhosseini *et al.*, 2014; Al-Mahmooli *et al.*, 2013;), en la mayoría de los casos de menor tamaño a los observados en el presente trabajo. El tamaño de los macroconidios de *F. falciforme* fue similar a lo reportado por Chehri *et al.* (2015). Por su parte, la morfología y tamaño de los macroconidios de *F. oxysporum* concordaron con lo señalado por Chehri *et al.* (2011).

## CONCLUSIONES

Algunas características, tales como: el grosor de paredes en las clamidosporas, la morfología de los

The variability in macroconidia and microconidia size among morphotypes of the same species did not allow differentiating among the *Fusarium* species.

*F. brachygibbosum* conidia of different sizes have been reported (Xia *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2017; Mirhosseini *et al.*, 2014; Al-Mahmooli *et al.*, 2013) and, in most cases, they have been shorter than the ones observed in this study. The size of *F. falciforme* macroconidia was similar to the size reported by Chehri *et al.* (2015). Also, the morphology and size of *F. oxysporum* macroconidia were in agreement with the results obtained by Chehri *et al.* (2011).

## CONCLUSIONS

Some characteristics, such as the thickness of chlamydospore walls, macroconidia morphology, type of conidiogenic cells and the presence or absence of septa in microconidia can be distinctive and useful for identifying *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* that are pathogenic to watermelon plants grown in Sonora, Mexico. However, the identified morphologies need to be corroborated through molecular analysis.

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

macroconidios, el tipo de células conidiógenas y la presencia o ausencia de septos en microconidios pueden ser distintivas y de utilidad en la identificación de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum*, patógenas en plantas de sandía en cultivos localizados en Sonora, México. No obstante, es necesario que la identificación morfológica sea corroborada con un análisis molecular.

LITERATURA CITADA

- Al-Mahmooli IH, Al-Bahri YS, Al-Sadi AM and Deadman ML. 2013. First report of *Euphorbia larica* dieback caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Disease* 97(5): 687. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0828-PDN>
- Al-Sadi AM, Al-Jabri AH, Al-Mazroui SS and Al-Mahmooli IH. 2012. Characterization and pathogenicity of fungi and oomycetes associated with root diseases of date palms in Oman. *Crop Protection* 37(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.01>
- Boughalleb N, Armenogol J and Mahjoub, ME. 2005. Detection of races 1 and 2 of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and their distribution in watermelon fields in Tunisia. *Journal of Phytopathology* 153:162-168. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00947.x>
- Cao S, Yang N, Zhao C, Liu J, Han C and Wu X. 2018. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. *Journal of General Plant Pathology* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0792-5>
- Chehri K, Salleh B, Yli-Mattila T, Reddy KRN, Abbasi S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*.18(4):341-351. [doi:10.1016/j.sjbs.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.007).
- Chehri K, Salleh B and Zakaria L. 2015. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial ecology*. 69(3): 457-471. DOI 10.1007/s00248-014-0494-2
- Egel DS and Martyn RD. 2007. *Fusarium* wilt of watermelon and other cucurbits. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0122-01
- Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA and Nelson PE. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72:151-153. DOI: 10.1094/Phyto-72-151
- Gashgari R, Gherbawy Y, Ameen F and Alsharari S. 2016. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9(1): e26157. DOI: 10.5812/jjm.26157
- Ismail MA, Abdel-Hafez SI, Hussein N A and Abdel-Hameed NA. 2015. Contributions to the genus *Fusarium* in Egypt with dichotomous keys for identification of species. 1st ed. Tmkarpiński Publisher Suchy Las, Poland. 179 pp. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/Mady_Ismail/publication/321344925_FUSARIUM_IN_EGYPT_WITH_DICHOTOMOUS_KEYS_FOR_IDENTIFICATION_OF_SPECIES_Contributions_to_the_genus_Fusarium_in_Egypt_with_dichotomous_keys_for_identification_of_species/links/5a1de0980f7e9b9d5effb25e/FUSARIUM-IN-EGYPT-WITH-DICHOTOMOUS-KEYS-FOR-IDENTIFICATION-OF-SPECIES-Contributions-to-the-genus-Fusarium-in-Egypt-with-dichotomous-keys-for-identification-of-species.pdf
- Kleczewski NM and Egel DS. 2011. A diagnostic guide for *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Health Progress*. [doi:10.1094/PHP-2011-1129-01-DG](https://doi.org/10.1094/PHP-2011-1129-01-DG)
- Klotz LV, Nelson PE and Toussoun TA. 1988. A medium for enhancement of chlamydo-spores formation in *Fusarium* species. *Mycologia* 80:108-109. DOI: 10.2307/3807500
- Leslie JF, Zeller KA and Summerell BA. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59(3):107-117. [doi:10.1006/pmpp.2001.0351](https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0351),
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London. Victoria, Australia. 388 pp.
- Mehl HL and Epstein L. 2007. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and race 2 with PCR and production of disease-free pumpkin seeds. *Plant Disease* 91(10):1288-1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1288>
- Mirhosseini HA, Babaeizad V and Hashemi L. 2014. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. *Journal of Plant Pathology*. 96(2): 431-439. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I2.002>
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species: An Illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. University Park. 193 pp.
- Padwick GW. 1945. Notes on Indian fungi III. *Mycological Papers*. 12:1-15.
- Rentería-Martínez ME., Meza-Moller A, Guerra-Camacho MA, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A and Moreno-Salazar SF. 2015. First report of watermelon wilting caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 99(5):729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN>
- Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE, and Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*. 36(2):233-255. DOI: <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-1>
- Rna AG, Babikar A, Dagash Y, Elhoussein AA, Elhalim TSA and Babikar AGT. 2014. *Fusarium brachygibbosum* a plausible candidate for deployment as a bioagent for *Striga hermonthica* management in Sorghum. Third Conference of Pests Management in Sudan February 3-4, 2014 CPRC-ARC, Wad Medani (Sudan). <http://www.arc-cprc.sd/weedscience.pdf>
- Shan LY, Cui WY, Zhang DD, Zhang J, Ma NN, Bao YM, Dai XF and Guo W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101(5): 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Smith, SN. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin* 16:97-120. <http://140.112.183.156/pdf/16-3/p097-120.pdf>
- Stack AJ, Yagmour MA, Kirkpatrick SC, Gordon TR and Bostock RM. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated almond trees in California. *Plant Disease* 101(2): 390-390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0929-PDN>

- Summerbell RC and Schroers HJ. 2002. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(8): 2866-2875. doi:10.1128/JCM.40.8.2866-2875.2002
- Tan DC, Flematti GR, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Chakraborty S, Obanor F and Barbetti, MJ. 2011. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and 'sheep feed refusal disorders' in Western Australia. *Mycotoxin research* 27(2):123-135. doi: 10.1007/s12550-010-0085-0
- Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, Krid S, Cheffi M, Kammoun S, Dammak M, Mseddi A, Gdoura R and Ali TM. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *Biotech* 7:28. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0587-3>
- Turóczi GV, Posta K, Badenszky L and Bán R. 2011. *Fusarium* wilt of water melon caused by *Fusarium solani* in Hungary. *Plant Breeding and Seeds Science* 63:23-28. DOI: 10.2478/v10129-011-0012-3
- Xia B, Hu J, Zhu X, Liang Y, Ren X, Wu Y and Chen D. 2018. First report of sunflower broomrape wilt caused by *Fusarium brachygibbosum* in China. *Plant Disease* (Accepted) <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1939-PDN>
- Zhang M, Xu JH, Liu G, Yao XF, Li PF and Yang XP. 2014. Characterization of the watermelon seedling infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Pathology*. 64:1076-1084. <https://doi.org/10.1111/ppa.12355>
- Zhou XG, Everts KL and Bruton BD. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. *Plant Disease* 94(1):92-98. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0092>

Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to Wheat Blast disease

Evaluación de trigos sintéticos hexaploides para resistencia a la enfermedad Piricularia o Brusone

Cinthia Carolina Cazal-Martínez*, Alice Rocio Chávez, Yessica Magaliz Reyes-Caballero, Man Mohan Kohli, Departamento de Investigación, Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas, Central, Avenida Brasilia 840, Asunción, Paraguay; Pastor Enmanuel Pérez-Estigarríbia, Facultad de Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, Mcal. Estigarribia Km 11,5. Central, San Lorenzo, Paraguay. *Autor de correspondencia: cccazalm86@gmail.com

Recibido: 31 de Julio, 2018.

Aceptado: 19 de Octubre, 2018.

Cazal-Martínez CC, Chávez AR, Reyes-Caballero YM, Kohli MM and Pérez-Estigarríbia PE. 2018. Evaluation of synthetic hexaploid wheats for resistance to Wheat Blast disease. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 35-49.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1807-5

Primera publicación DOI: 10 de Noviembre, 2018.

First DOI publication: November 10, 2018.

Resumen. La enfermedad Brusone en trigo es causada por el hongo *Pyricularia oryzae* patotipo *Triticum*. Desde hace 30 años, esta enfermedad ha sido endémica de Sudamérica hasta su aparición en Bangladés en el año 2016, abriendo la posibilidad de su expansión a otras regiones. Considerando poca disponibilidad de las fuentes de resistencia conocida en trigo y conociendo la resistencia de los trigos sintéticos hexaploides (TSHs) a distintos tipos de estrés, el objetivo de este trabajo fue evaluar una colección por su resistencia a la Piricularia. Los ensayos fueron realizados en el Centro de Investigación Hernando Bertoni, Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, Paraguay. Las infecciones

Abstract. Wheat Blast disease is caused by the fungus *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum*. The disease has been endemic to tropical South American region for over 30 years until 2016, when it occurred in Bangladesh, opening the possibility of its expansion to other regions. Considering the limited availability of known sources of resistance in wheat and the synthetic hexaploid wheats are known to be a source of resistance to multiple type of stresses, the objective of this research was to evaluate a collection of synthetic hexaploid wheats for their resistance to Wheat Blast. The experiments were carried out in the Hernando Bertoni Research Center, Paraguayan Institute of Agricultural Technology, Paraguay. Test spikes were inoculated, concentration of $5 \cdot 10^4$ conidios.mL⁻¹. The reaction was evaluated 15 days after inoculation and observed for next 15 days to calculate the disease-progress. Sixty-four synthetic hexaploid wheats, provided by the International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, were subjected to infections by isolate (P14ATae039) of *P. oryzae*, 18 materials were selected based on their maximum values of reaction, to be reevaluated with two

fueron realizadas en espigas, concentración 5.10^4 conidios.mL⁻¹. La reacción se evaluó a los 15 días después de la inoculación y observada durante los próximos 15 días para calcular el avance de la enfermedad. Sesenta y cuatro TSHs proporcionados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México, fueron sometidos a infecciones por un aislado (P14ATae039) de *P. oryzae.*, donde 18 materiales fueron seleccionados por su valor máximo de reacción, para una reevaluación con dos aislados P14ATae039 y P14YTae031. Los trigos TS29, TS49 fueron identificados como nuevas fuentes de resistencia a Brusone, al igual que TS73 que es moderadamente susceptible, pero de distinto origen genético. Para nuestro conocimiento este es el primer reporte de selección de los trigos sintéticos hexaploides como nuevas fuentes de resistencia genética para Brusone de trigo.

Palabras clave: Enfermedad fúngica, resistencia a patógeno, *Aegilops tauschii*, *Triticum durum*.

La enfermedad Piricularia o Brusone de trigo, es considerada como una de las enfermedades emergentes en el mundo, causada por el hongo *Pyricularia oryzae*, (sinónimo *Magnaporthe oryzae* Catt.) (Couch y Kohn, 2002). Su especificidad en trigo fue atribuida a una subpoblación denominada como *Triticum patotipo* (MoT) por Cruz y Valent (2017).

Brusone ha sido una enfermedad endémica en la región tropical de Sudamérica, abarcando los llanos de Bolivia, Brasil central y centro sur y Paraguay (Kohli *et al.*, 2011), hasta su primer reporte en Bangladés en el año 2016 (Malaker *et al.*, 2016), lo que evidencia la posibilidad de su expansión en otras regiones similares. Teniendo en cuenta que el control químico es poco eficaz y en condiciones favorables las pérdidas pueden ser de hasta 80% de la producción (Kohli *et al.* 2011), la búsqueda

different isolates P14ATae039 and P14YTae031. TS29, TS49 synthetic wheat were identified as new sources of resistance to wheat blast and TS73 wheat that is moderately susceptible, but of different genetic origin. To our best knowledge, this is the first report of synthetic hexaploid wheats selected as new sources of genetic resistance to wheat blast disease.

Key words: Fungal disease, resistance to pathogen, *Aegilops tauschii*, *Triticum durum*.

The Wheat Blast disease is considered one of the emerging diseases in the world, and is caused by the fungus *Pyricularia oryzae*, (synonym *Magnaporthe oryzae* Catt.) (Couch and Kohn, 2002). Its specificity in wheat was attributed to a subpopulation named *Triticum* pathotype (MoT) by Cruz and Valent (2017).

This disease has been endemic to the tropical region of South America, covering the plains of Bolivia, central and south-central Brazil, and Paraguay (Kohli *et al.*, 2011), up to its first report in Bangladesh in 2016 (Malaker *et al.*, 2016), which shows its possibility of expansion to other similar regions. Considering that chemical control is not very efficient and under favorable conditions, losses may be of up to 80% of the production (Kohli *et al.* 2011), the search for resistance to this pathogen is crucial to ensure the regional and global production of wheat.

The most efficient resistance to wheat blast reported recently is related to the translocation of the 2NS/2AS, from the *Triticum ventricosum* (Tausch) Cess, (Cruz *et al.* 2016). In a recent study, Chávez and Kohli (2018) identified only two of the commercial Paraguayan wheat varieties with resistance and moderate resistance, displaying the urgency of broadening its genetic base.

de resistencia a éste patógeno es primordial para asegurar la producción de trigo regional y mundial.

Actualmente la resistencia a Brusone más eficiente reportada es la asociada a la translocación del 2NS/2AS, proveniente de *Triticum ventricosum* (Tausch) Cess, (Cruz *et al.* 2016). En un estudio reciente, Chávez y Kohli (2018), identificaron solo dos de las variedades comerciales de trigo paraguayo con resistencia y resistencia moderada, demostrando la necesidad urgente de ampliar su base genética.

Considerando la posibilidad de encontrar mayor variabilidad genética en las especies aliadas al trigo, se identificaron resistencia en dos especies *Aegilops tauschii* y *Aegilops umbellulata*. Los Trigos Sintéticos Hexaploides (TSHs), son resultados de las cruces entre trigos duros (*Triticum durum* L., $2n=4x=28$, AABB) y la especie aliada, *Ae. tauschii* ($2n=2x=14$, DD) (Ogbonnaya *et al.*, 2013). Varios de los TSHs han mostrado su potencial como fuente importante de alelos para mejorar características agronómicas, como tamaño y forma de granos (Masood *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2013; Rasheed *et al.*, 2014), calidad del pan (Lu *et al.*, 2005), resistencias a estreses abióticos (Sohail *et al.*, 2011) y bióticos (Gul Kazi *et al.*, 2012; Jighly *et al.*, 2016) Teniendo en cuenta éstos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar un grupo de TSHs según su reacción a la enfermedad Brusone bajo condiciones controladas de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Hernando Bertoni dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (CIHB-IPTA), Caacupé, Paraguay.

Los aislados utilizados, proveniente de las espigas de trigo, fueron identificados morfológicamente

Considering the possibility of finding greater genetic variability in the species allied to wheat, Urushima and Kato (1994) explored *Aegilops* species and found resistance in two species: *Ae. tauschii* and *Ae. umbellulata*. The Synthetic Hexaploid Wheats (SHWs) are a result of crosses between durum wheats (*Triticum durum* L., $2n=4x=28$, AABB) and the allied species, *Ae. tauschii* ($2n=2x=14$, DD) (Ogbonnaya *et al.*, 2013). Several of the SHWs have proven their potential as an important source of alleles for the improvement of agronomic traits, such as grain size and shape (Masood *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2013; Rasheed *et al.*, 2014), bread quality (Lu *et al.*, 2005), resistance to abiotic (Sohail *et al.*, 2011) and biotic stresses (Gul Kazi *et al.*, 2012; Jighly *et al.*, 2016). Taking this into account, the aim of this work was to evaluate a group of SHWs according to their reaction to the wheat blast disease under controlled conditions of infection.

MATERIALS AND METHODS

Trials were carried out in the Hernando Bertoni Research Center, Paraguayan Institute of Agricultural Technology, (CIHB-IPTA), Caacupé, Paraguay.

The isolates used, from the wheat spikes, were morphologically identified following Klaubauf *et al.*, (2014) and confirmed with the specific molecular marker MoT3 (Pieck *et al.*, 2016). Previous evaluations in materials of known reactions of susceptibility and resistance (Caninde 11 and Milan) confirm their capability for infection.

Inoculum were obtained following the method suggested by Marangoni *et al.* (2013). The pieces of filter paper, 0,5 cm in diameter with preserved isolates, were planted in Petri dishes with Oat meal Agar (OA), and incubated for 12 days at 25 °C with

según Klaubauf *et al.*, (2014) e identificados con el marcador molecular específico MoT3 (Pieck *et al.*, 2016). Las evaluaciones previas en materiales de conocida reacción de susceptibilidad y resistencia (Caninde 11 y Milan) confirman su capacidad de infección.

La obtención del inóculo fue lograda mediante la metodología sugerida por Marangoni *et al.* (2013). Los pedazos del papel filtro de 0,5 cm de diámetro con aislados conservados, fueron sembrados en placas de Petri con medio de cultivo Agar-Avena (AA) e incubados durante 12 días a 25 °C con fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente para forzar la esporulación, se aplastaron los micelios en placa y fueron incubados bajo luz constante por 72 horas.

Las inoculaciones forzadas fueron realizadas en mínimo 6 y máximo 10 espigas por genotipo en el estado fenológico de antesis, utilizando un atomizador 1/5 HP 58 PSI *Oilless Airbrush Compressor Kit*, a una concentración de 5.10^4 conidios.mL⁻¹. Se utilizó aproximadamente 0,3 mL de inóculo para cada espiga. Las plantas inoculadas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (28±2 °C) y humedad (85±5 %), por un periodo de 72 horas para ambos ensayos.

Los TSHs son materiales con amplia variabilidad en cuanto a su reacción a distintas enfermedades. Considerando reacciones diferenciales en *P. oryzae*, incluso entre aislados viejos y nuevos reportado por Cruz *et al.*, (2016), se utilizó el valor máximo de reacción (VMR) para clasificar los TSHs y garantizar la reproducibilidad del ensayo. La opción de ponderar el material según el VMR sobre el total de espigas evaluadas permite descartar sesgos por escapes fortuitos a la infección (es decir, plantas susceptibles con reacción nula). Este criterio de clasificación es robusto para selección de materiales según su respuesta a la infección, ya que solo los genotipos con magnitud bajo de VMR muestran resistencia.

light periods of 12 hours. Later, in order to force sporulation, the mycelia were crushed on the dish and incubated under constant light for 72 hours.

Forced inoculations were carried out on a minimum of 6 and a maximum of 10 spikes per genotype in the phenological stage of anthesis, using a 1/5 HP 58 PSI *Oilless Airbrush Compressor Kit*, at a concentration of 5.10^4 conidia.mL⁻¹. Approximately 0,3 mL of inoculum was used for each spike. The inoculated plants were kept under controlled temperature (28±2 °C) and humidity conditions (85±5 %) for a period of 72 hours for both trials.

SHWs are materials with a broad variability in terms of their reactions to different diseases. Considering differential reactions in *P. oryzae*, even between old and new isolates reported by Cruz *et al.*, (2016), the maximum value of reaction (MVR) was used to classify the SHWs and guarantee the reproducibility of the test. The option of pondering the material according to the MVR over the total of spikes evaluated helps discard biases due to fortuitous escapes to the infection (that is, susceptible plants with no reaction). This classification criterion is robust for the selection of materials according to their response to the infection, since only the genotypes with a low MVR display resistance.

Two independent evaluations were carried out on synthetic wheats. In a first evaluation, 64 genotypes of SHWs (Table 1), provided by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), were inoculated with a monosporic isolate (P14ATae039) of the fungus *P. Oryzae*.

In a second evaluation, based on the maximum values of reaction (MVR) for wheat blast on the spike, 18 materials were selected for a second evaluation. The chosen genotypes displayed MVR between resistant and moderately resistant, and as a form of susceptibility control, other susceptible

Se realizaron dos evaluaciones independientes del trigo sintético. En una primera evaluación, 64 genotipos de TSHs (Cuadro 1), proporcionados por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), fueron inoculados con un aislado monospórico (P14ATae039) del hongo *P. Oryzae*.

En una segunda evaluación, con base a los valores máximos de reacción (VMR) al Brusone en la espiga, 18 materiales fueron seleccionados para una segunda evaluación. Los genotipos seleccionados presentaron VMR de resistentes a moderadamente resistentes y de modo a control de susceptibilidad se incluyeron otros materiales de reacción susceptibles. Para cubrir un mayor rango de variabilidad patogénica, dos aislados virulentos, P14ATae039 y P14YTae031 fueron utilizados en la segunda inoculación.

La reacción de la enfermedad fue evaluada a los 15 días después de la inoculación (DDI), utilizando la escala propuesta por Chavez *et al.* (2017) modificada para el VMR de siguiente manera: 0 = Sin infección, 1 = Hasta el 10% de la espiga necrosada (resistente), 2 = Hasta el 40% de la espiga necrosada (moderadamente resistente), 3 = Hasta el 60% de la espiga necrosada (moderadamente susceptible) y 4 = 100% de la espiga necrosada (susceptible). Posterior a este periodo, las espigas de siete genotipos que mostraron resistencia o moderada resistencia en la primera lectura y un testigo susceptible se mantuvieron en condiciones descritas anteriormente, para observar el desarrollo de la infección en espigas para los dos aislados por un periodo de 30 días. Para el progreso de la enfermedad, se utilizó el Diseño Completamente al Azar, cada espiga representa una unidad experimental donde se observó la reacción a los 8, 15, 22 y 30 DDI. El cálculo del valor del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) se realizó mediante la función AUDPC (Área Bajo la Curva del Progre-

reaction materials were included. In order to cover a broader range of pathogenic susceptibility, two virulent isolates, P14ATae039 and P14YTae031, were used in the second inoculation.

The reaction to the disease was evaluated 15 days after inoculation (DAI), using the scale proposed by Chavez *et al.* (2017), modified for the MVR as follows: 0 = No infection, 1 = Up to 10% of the spike necrotized (resistant), 2 = Up to 40% of the spike necrotized (moderately resistant), 3 = Up to 60% of the spike necrotized (moderately susceptible), and 4 = 100% of the spike necrotized (susceptible). After this period, the spikes of seven genotypes that displayed resistance or moderate resistance in the first reading, along with a susceptible control, were kept in the conditions described above, to observe the development of the spike infection for both isolates for a 30-day period. For the progress of the disease, we used a totally randomized design; each spike represents an experimental unit in which the reaction was observed at 8, 15, 22 and 30 DAI. The calculation of the value of the area under the disease progress curve was carried out using the function AUDPC, implemented in the package *agricolae* for R version 3.4.2. Analyses of the AUDPC underwent an ANOVA and the comparisons between averages were performed by Test: LSD Fisher Alfa=0,05.

RESULTS AND DISCUSSION

The data of the first infection and classification of the 64 SHWs based on their maximum values of reaction to an isolate (P14ATae039) are shown in Table 2.

Based on the first evaluation of synthetic wheats, over 10% of the SHWs were classified as Resistant (MVR 0-1), 34% were classified as moderately resistant or moderately susceptible (MVR between 2 and 3), and over 55% as susceptible (MVR 4).

Cuadro 1. Lista de los trigos sintéticos hexaploides proveídos por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Table 1. List of synthetic hexaploid wheats provided by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT).

| Código | Pedigree |
|--------|--|
| TS2 | DOY1/AE. SQUARROSA (188) |
| TS3 | ALTAR84/AE.SQUARROSA (193) |
| TS4 | ALTAR84/AE.SQUARROSA (198) |
| TS15 | ALTAR84/AE.SQUARROSA (219) |
| TS22 | CROC1/AE. SQUARROSA (224) |
| TS23 | ACO89/AE. SQUARROSA (309) |
| TS28 | YAV-3/SCO//J069/CRA/3/YAV79/4/AE.SQUARROSA (498) |
| TS29 | DOY1/AE. SQUARROSA (511) |
| TS32 | 68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (629) |
| TS33 | FGO/USA2111//AE.SQUARROSA (658) |
| TS34 | CROC-1/AE. SQUARROSA (725) |
| TS35 | 68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (781) |
| TS36 | 68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (783) |
| TS37 | YAR/AE.SQUARROSA (783) |
| TS39 | 68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (878) |
| TS43 | 68.111/RGB-U//WARD/3/FGO/4/RABI/5/AE.SQUARROSA (890) |
| TS49 | LCK59.61/Ae. SQUARROSA (313) |
| TS50 | LCK61/Ae. SQUARROSA (324) |
| TS53 | GAN/AE.SQUARROSA (408) |
| TS54 | SCA/AE.SQUARROSA (518) |
| TS55 | YAR/AE.SQUARROSA (518) |
| TS57 | SNIFE/YAV79//DACK/TEAL/3/A.SQUARROSA (629) |
| TS58 | D67.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (633) |
| TS59 | D67.2/PARANA//AE.SQUARROSA (659) |
| TS60 | SNIFE/YAV79//DACK/TEA/3/AE.SQUARROSA (700) |
| TS61 | TRN/AE.SQUARROSA (700) |
| TS62 | SNIFE/YAV79//DACK/TEA/3/AE.SQUARROSA (877) |
| TS63 | GAN/AE.SQUARROSA (897) |
| TS64 | YAV-2/TEZ//AE.SQUARROSA (895) |
| TS65 | ARLIN/AE.SQUARROSA (283) |
| TS67 | RASCON/AE. SQUARROSA (312) |
| TS68 | SCOT/MEXI-1//AE. SQUARROSA (314) |
| TS69 | DOY1/AE. SQUARROSA (333) |
| TS70 | DOY1/AE.SQUARROSA (428) |

Continúa Cuadro 1

Continúa Cuadro 1

| Código | Pedigree |
|--------|--|
| TS71 | DOY1/AE.SQUARROSA (458) |
| TS72 | GREEN/AE.SQUARROSA (458) |
| TS73 | SCA/AE.SQUARROSA (409) |
| TS74 | CP18/GDIZ/3/GOOD//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (409) |
| TS76 | ALTAR84/AE.SQUARROSA (502) |
| TS77 | CROC-1/AE. SQUARROSA (517) |
| TS78 | ZETA/AE. SQUARROSA (1024) |
| TS79 | ZETA/AE. SQUARROSA (1027) |
| TS80 | DOY1/AE.SQUARROSA (1030) |
| TS82 | CROC1/AE. SQUARROSA (210) |
| TS86 | GAN/AE. SQUARROSA (236) |
| TS87 | SORA/AE. SQUARROSA (323) |
| TS88 | D66.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (308) |
| TS89 | LCK59.61/Ae. SQUARROSA (693) |
| TS90 | ZETA/AE. SQUARROSA (1025) |
| TS91 | DOY1/AE.SQUARROSA (1027) |
| TS92 | ZETA/AE. SQUARROSA (386) |
| TS94 | ZETA/AE. SQUARROSA (533) |
| TS95 | CP18/GDIZ/3/GOOD//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (1018) |
| TS97 | ZETA/AE. SQUARROSA (1038) |
| TS98 | ZETA/AE. SQUARROSA (1053) |
| TS99 | CROC1/AE. SQUARROSA (212) |
| TS100 | ZETA/AE.SQUARROSA (368) |
| TS101 | ARLIN-1/AE.SQUARROSA (430) |
| TS102 | D67.2/PARANA66270//AE.SQUARROSA (1015) |
| TS103 | GAN/AE.SCUARROSA (206) |
| TS104 | ARLIN-1/AE.SQUARROSA (335) |
| TS105 | GAN/AE.SQUARROSA (335) |
| TS106 | 68.111/RGB-U//WARD RESEL/3/STIL/4/AE.SQUARROSA (385) |
| TS109 | DOY1/AE.SQUARROSA (534) |

so de la Enfermedad, ABCPE) implementada en el paquete *agricolae* para R versión 3.4.2. Análisis de los datos del ABCPE por aislado se sometieron a un ANOVA y las comparaciones entre medias se realizaron por Test: LSD Fisher Alfa=0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de la primera infección y la clasificación de los 64 TSHs con base a sus valores máximos de reacción a un aislado (P14ATae039) están presentados en el Cuadro 2.

Con base a la primera evaluación de los trigos sintéticos, más del 10% de los TSHs fueron clasificados como Resistentes (VMR 0-1), un 34% fueron clasificados como moderadamente resistentes o moderadamente susceptibles (VMR entre 2 y 3), y más del 55% como susceptibles (VMR 4).

Al igual que Gul Kazi *et al.* (2012) y Das *et al.* (2015), las reacciones a enfermedades fúngicas

Like in Gul Kazi *et al.* (2012) and Das *et al.* (2015), the reactions to fungal diseases using characteristics have been differentiated in this study. The correct phenotyping of these materials is crucial for the selection of the SHWs that can be used as parents in the breeding programs and/or in different studies of molecular characterization and genic expression, differential to the interaction of wheat and *P. oryzae*.

The MVR of the preselected 18 SHWs, with two isolates (P14ATae039 and P14YTae031), is graphed in Figure 1.

The data shown in Figure 1 indicates that only one of the genotypes (TS29) was resistant to both isolates; seven were classified as intermediates (TS77, TS53, TS101, TS78, TS32, TS22 and TS63), since they presented the resistant to moderately resistant reaction to one of the isolates, but moderately resistant to moderately susceptible for the other. This interaction trait was reported by Chávez and Kohli (2018), where moderately resistant varieties for one isolates showed a

Cuadro 2. Clasificación de los 64 genotipos TSHs infectados por P14ATae039, según su valor máximo de reacción a la *Pyricularia*. Caacupé, 2018.

Table 2. Classification of the 64 SHW genotypes infected with P14ATae039, according to their maximum value of reaction to the *Pyricularia*. Caacupé, 2018.

| ESCALA DE REACCIÓN | | | | | | | |
|----------------------------|---|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------|--|
| Resistente
(R)
(0-1) | Moderadamente Resistente
(MR)
(2) | Moderadamente Susceptible
(M)
(3) | Susceptibles
(S)
(4) | | | | |
| TS101 ^z | TS4 ^z | TS32 ^z | TS87 | TS50 | TS70 ^z | TS100 | |
| TS34 | TS22 ^z | TS64 | TS103 | TS54 ^z | TS71 | TS102 | |
| TS53 ^z | TS28 | TS67 | TS2 | TS55 | TS72 ^z | | |
| TS73 | TS29 ^z | TS68 | TS3 | TS57 | TS76 | | |
| TS77 ^z | TS33 ^z | TS74 ^z | TS15 | TS58 | TS82 | | |
| TS78 ^z | TS49 ^z | TS79 | TS23 | TS59 | TS86 | | |
| TS105 ^z | TS63 ^z | TS80 | TS35 | TS60 | TS88 | | |
| | TS89 | TS92 | TS36 | TS61 | TS91 | | |
| | TS90 ^z | TS95 | TS37 | TS62 | TS94 | | |
| | TS98 | TS104 | TS39 ^z | TS65 | TS97 | | |
| | TS109 | TS106 | TS43 | TS69 | TS99 | | |

^zTSHs seleccionados para una segunda evaluación / SHWs selected for a second evaluation.

utilizando características fenotípicas se han diferenciado en este estudio. El fenotipado correcto de estos materiales es fundamental para la selección de los TSHs que puedan ser utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento y/o en diferentes estudios de caracterización molecular y expresión génica diferencial a la interacción de trigo y *P. oryzae*.

El VMR de los preseleccionados 18 TSHs, con dos aislados (P14ATae039 y P14YTae031), está graficado en la Figura 1.

Los datos presentados en la Figura 1 muestran que solo uno de los genotipos (TS29) fue resistente a los dos aislados, siete fueron clasificados como intermedios (TS77, TS53, TS101, TS78, TS32, TS22 y TS63), ya que presentan la reacción resistente a moderadamente resistente para uno de los aislados, pero moderadamente resistente a moderadamente susceptibles para el otro. Esta característica de interacción fue reportada por Chávez y Kohli (2018), donde variedades moderadamente resistentes para

moderadamente susceptible for the other. This type of reaction specificity may probably be explained by the genetic flow between isolates from different hosts, which gives the isolates a virulence variation (Gladieux *et al.*, 2018).

The data displayed in Figure 2 shows the differences in the average progress of the disease amongst the genotypes identified as resistant or moderately resistant. Only three of the genotypes, TS49, TS53 and TS77, kept their resistance or moderate resistance for the 30-day period. The materials TS29, TS73 and TS101 changed their reaction from moderate resistance to moderate susceptibility, while the synthetic TS78 became susceptible at the end of the 30 days. The SHW TS105, used as a control, was susceptible throughout its development. Considering the differential reactions presented by the materials to the different isolates, the progress of the disease was analyzed in a second instance and is shown in Figures 3a and 3b. The results show a significant

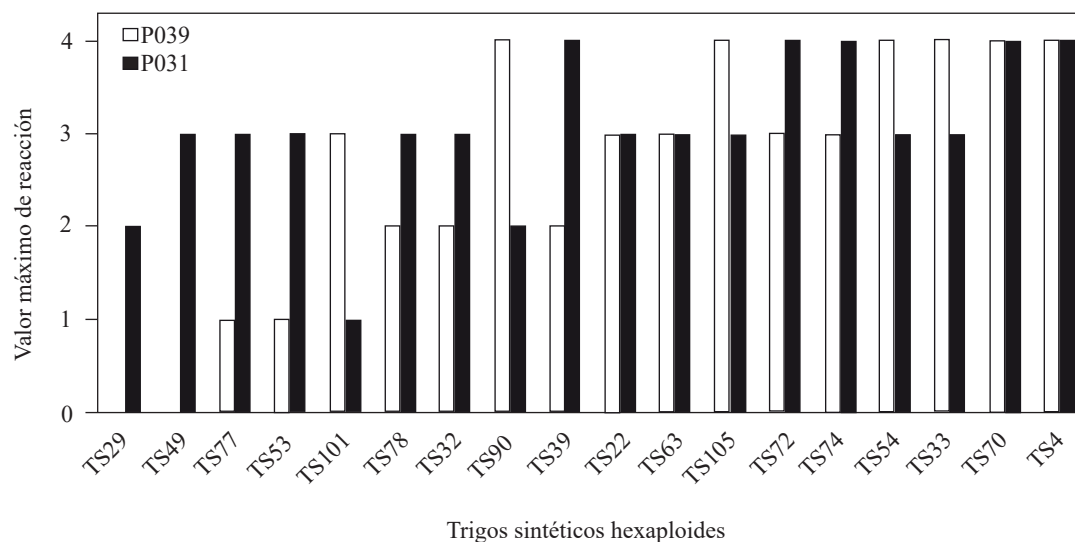


Figura 1. Valores máximos de reacción de 18 TSHs a las infecciones forzadas de dos aislados de *P. oryzae*. Reacciones al aislado P14ATae039 (P039), y reacciones al aislado P14YTae031 (P031). Caacupé, 2018.

Figure 1. Maximum values of reaction of 18 SHWs to the forced infections of two isolates of *P. oryzae*. Reactions to the isolate P14ATae039 (P039) and reactions to the isolate P14YTae031 (P031). Caacupé, 2018.

un aislado mostraron reacción moderadamente susceptible para el otro. Éste tipo de especificidad de reacciones podría ser explicada probablemente por el flujo genético entre aislados provenientes de distintos huéspedes, lo que le otorga una variación de virulencia a los aislados (Gladieux *et al.*, 2018).

Los datos presentados en la Figura 2 muestran las diferencias en el desarrollo promedio de la enfermedad entre los genotipos identificados como resistente o moderadamente resistente. Solo tres de los genotipos, TS49, TS53 y TS77 mantuvieron su resistencia o moderada resistencia por el periodo de 30 días. Los materiales TS29, TS73 y TS101 cambiaron su reacción de moderada resistencia a moderada susceptibilidad, cuando el sintético TS78 llegó a ser susceptible a final de 30 días. El TSH TS105, usado como testigo, fue susceptible durante todo su desarrollo. Considerando las reacciones diferenciales que presentan los materiales a los diferentes aislados se analizó el desarrollo de la infección en una segunda instancia y esta presentada en las Figuras 3a y 3b. Los resultados muestran una interacción significativa entre los trigos sintéticos evaluados y los dos aislados de *P. oryzae*, lo que confirma los resultados de Cruz *et al.*, (2016), donde los cultivares

interaction between the synthetic wheats evaluated and the two isolates of *P. oryzae*, which confirms the results obtained by Cruz *et al.*, (2016), in which the Overland and RonL cultivars were resistant to an isolate, but susceptible to the other.

Wheats *viz.* TS29 and TS49 were relatively stable in maintaining their resistance or moderate resistance, and other *viz.* TS73, TS78 and TS105 were moderately susceptible or susceptible to both isolates. However, the remaining SHWs *viz.* TSHs TS53, TS77 and TS101, have a significantly different reaction between the two isolates (Figure 1).

Synthetic wheat TS101 was resistant to isolate P031, yet susceptible to P039; wheats TS53 and TS77 were between moderately susceptible and susceptible to P031, yet resistant to P039 (Figure 3).

This result is consistent with those obtained by Chávez *et al.* (2018), who observed an interaction of the varieties with different isolates of *P. oryzae*. This interaction of genotypes with different isolates extends to a greater number of isolates under study (data not reported here).

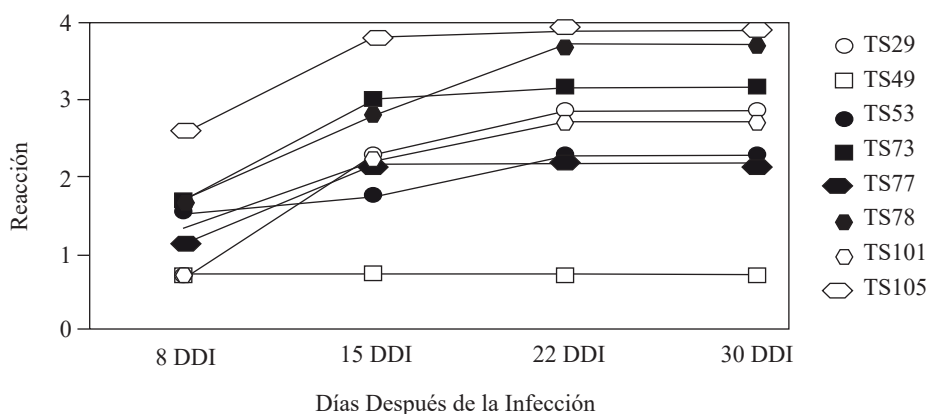


Figura 2. El promedio del progreso de la infección a los 8, 15, 22 y 30 DDI en ocho genotipos de trigo sintéticos hexaploides seleccionados. Caacupé, 2018.

Figure 2. The average disease progress at 8, 15, 22 and 30 DAI in eight selected synthetic hexaploid wheat genotypes. Caacupé, 2018.

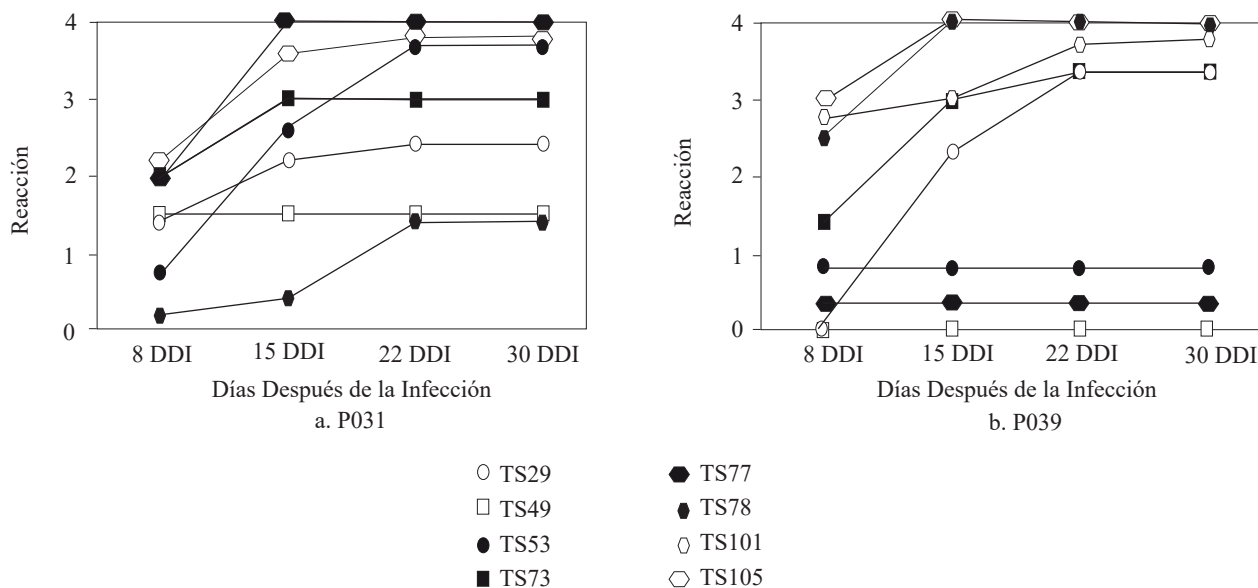


Figura 3. Evolución de la reacción a la infección y su desarrollo contra aislado P14YTae031 (P031) (a) y P14ATae039 (P039) (b) en ocho trigos sintéticos hexaploides a los 8, 15, 22 y 30 DDI. Caacupé, 2018.

Figure 3. Evolution of the reaction to the infection and its development against the isolate P14YTae031 (P031) (a) and P14ATae039 (P039) (b) in eight synthetic hexaploid wheats at 8, 15, 22 and 30 DAI. Caacupé, 2018.

de Overland y RonL, fueron resistentes para un aislado pero susceptibles para el otro.

Los trigos *viz.* TS29, TS49 fueron relativamente estables en mantener su resistencia o moderada resistencia y otros *viz.* TS73, TS78 y TS105 fueron moderadamente susceptibles o susceptibles para los dos aislados. Sin embargo, los restantes TSHs *viz.* TSHs TS53, TS77 y TS101, tienen reacción significativamente diferente entre los dos aislados (Figura 1).

El trigo sintético TS101 fue resistente para el aislado P031, pero susceptible para P039 los trigos TS53 y TS77 fueron de moderadamente susceptible a susceptible para P031, pero resistentes para P039 (Figura 3).

Este resultado es congruente con lo hallado por de Chávez *et al.* (2018) quienes observaron interacción de las variedades con distintos aislados de *P. oryzae*. Esta interacción de genotipos de trigo con diferentes aislados se extiende a un mayor número de aislados bajo estudio (datos no reportados aquí).

In order to study the progress of the disease in the preselected wheats, the area under the disease progress curve was calculated for both isolates, Table 3.

If we analyze the data presented in Table 3, on average, and considering the wheat by isolate interaction, the progress of the disease for both isolates is significantly different. In a similar study on four isolates of *P. oryzae*, Lule *et al.* (2014) did not find significant differences in the AUDPC in rice when interacting with its host, but they did when comparing isolates.

The data of the area under the disease curve confirm the classification of the materials based on the maximum value of infection, without considering the materials with differential reactions. Only synthetic wheats TS29 and TS49 changed their classification based on the maximum value of infection and area under the disease curve.

Con el objetivo de estudiar el avance de la enfermedad en los trigos preseleccionados, el área bajo la curva del progreso fue calculada para los dos aislados, Cuadro 3.

Si se analizan los datos presentados en el Cuadro 3, en promedio y considerando la interacción trigo por aislado, el avance de la enfermedad para los dos aislados es significativamente diferente. En un estudio similar sobre cuatro aislados de *P. oryzae*, Lule *et al.* (2014), no encontraron diferencias significativas en el ABCPE en arroz al interactuar con su hospedero, pero sí al comparar entre aislados.

Los datos del área bajo de curva de la enfermedad corroboran la clasificación de los materiales con base al valor máximo de infección, sin tener en cuenta los materiales con reacción diferencial. Solo los trigos sintéticos TS29 y TS49, cambiaron su clasificación en base al valor máximo de infección y área bajo la curva de la enfermedad.

The TS29, classified as moderately resistant due to its maximum value of infection, was considered moderately susceptible, since it presented a greater progress of the disease after the evaluation of 15 DAI.

The situation with the TS49 was the complete opposite of the reaction of the TS29, since it had a much slower development to reach a lower AUDPC. This selection strategy using AUDPC for this pathogen was also used by Prabhu *et al.* (2003) to classify the reactions of six elite lines of rice in a breeding program. Jeger and Viljanen-Rollinson (2001) agree that the progress of the disease is a more accurate and precise estimate for the selection of materials for a breeding program or genetic studies, helping identify the most stable materials in time.

Considering the genetic variability within the different collections of *Ae tauschii* crossed to obtain

Cuadro 3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en ocho trigos sintéticos hexaploides. Caacupé, 2018.
Table 3. Area under the disease progress curve in eight synthetic hexaploid wheats. Caacupé, 2018.

| Trigos Sintéticos Hexaploides ^x | Área bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) ^y | |
|--|---|--------------------|
| | P14YTae031 | P14ATae039 |
| TS49 | 33 ^{ab} | 0 ^a |
| TS77 | 81 ^c | 7.3 ^a |
| TS53 | 70.3 ^c | 16.5 ^a |
| TS29 | 59.9 ^{abc} | 54.7 ^b |
| TS73 | 66.7 ^{bc} | 64 ^{bc} |
| TS78 | 63.2 ^{abc} | 73.8 ^{bc} |
| TS101 | 32.7 ^a | 82.8 ^{bc} |
| TS105 | 75.1 ^c | 84.5 ^c |
| Promedio por aislado ^z | 60.3 ^a | 47.9 ^b |

^xTest: LSD Fisher Alfa=0,05. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05) / Test: LSD Fisher Alfa=0,05. Averages with a common letter are not significantly different (p > 0,05).

^yValor promedio de ABCPE por TSHs / Average value of AUDPC by SHWs.

^zValor promedio de ABCPE con interacción por aislados / Average value of AUDPC with interaction by isolations.

El TS29, clasificado moderadamente resistente por su valor máximo de infección fue considerado moderadamente susceptible por presentar un mayor desarrollo de la enfermedad post posterior a la evaluación de 15 DDI.

La situación del TS49, fue completamente opuesta a la reacción del TS29, y que tuvo un desarrollo mucho más lento para llegar a una menor ABCPE. Esta estrategia de selección mediante ABCPE, para éste patógeno, también fue utilizada por Prabhu *et al.* (2003) para clasificar la reacción de seis líneas élites de arroz en un programa de mejoramiento. Jeger y Viljanen-Rollinson (2001) concuerdan que el progreso de la enfermedad es una estimación más acertada y precisa para la selección de materiales para un programa de mejoramiento o estudios genéticos, permitiendo identificar los materiales más estables en el tiempo.

Considerando la variabilidad genética existente entre las diferentes colecciones de *Ae tauschii* cruzadas para la obtención de los TSHs, este tipo de reacciones son esperadas. Resultados similares, fueron reportadas por Guz Kazi *et al.*, 2012 y Masood *et al.*, (2016) en sus estudios sobre reacción a las enfermedades como en características agronómicas y de calidad en general.

En un estudio asociado al genoma completo del trigo, Jighly *et al.*, (2016) han mapeado regiones conocidas para resistencia múltiples a patógenos fúngicos en una colección de TSHs. Además de identificar la presencia de combinaciones previamente reportadas en trigos harineros, ellos pudieron observar interacciones para varias enfermedades individualmente. Su afirmación que el uso de marcadores para la introducción de resistencias múltiples a las enfermedades desde TSHs puede ser una fuente importante para la creación de las variedades elite es muy válida para el caso actual donde las fuentes de resistencia son muy limitadas.

the SHWs, this type of reactions is to be expected. Similar results were reported by Guz Kazi *et al.*, 2012 and Masood *et al.* (2016) in their studies on the reaction to diseases as well as in agronomical traits and in quality in general.

In a study related to the complete wheat genome, Jighly *et al.*, (2016) mapped regions known for the resistance to multiple fungal pathogens in a collection of SHWs. Aside from identifying the presence of combinations previously reported in bread wheats, they were able to observe interactions for various diseases individually. Their assertion that the use of markers for the introduction of multiple resistances to diseases from SHWs can be an important source for the creation of elite varieties is very valid for the case in question, where sources of resistance are very limited.

It is worth mentioning that no molecular markers have yet been identified for the resistance to *P. oryzae* that validate their presence in the SHWs. Although TS29 and TS49 can be considered parents for the breeding programs and can be combined with each other, genotypes such as TS49 are the most valuable to provide a higher level of resistance and low progress of the disease until the end of the infection.

CONCLUSION

Taking advantage of the wide variability that exists in the hexaploid synthetic wheats, new sources of resistance to wheat blast, from different genetic origins were identified. These genetic resources represent a move forward in the search for more variability for resistance to *P. oryzae* in wheat, which is currently very narrow and may serve as a source to transfer its resistance to future varieties worldwide.

Cabe mencionar que hasta ahora no se ha identificado marcadores moleculares para la resistencia a *P. oryzae* que convaliden su presencia en los TSHs. Aunque TS29 y TS49 pueden ser considerados como progenitores para los programas de mejoramiento y pueden ser combinados entre sí, son los genotipos como TS49, los más valiosos para otorgar un mejor grado de resistencia y bajo progreso de la enfermedad hasta final de la infección.

CONCLUSIÓN

Aprovechando de la amplia variabilidad que existe en los trigos sintéticos hexaploides, nuevas fuentes de resistencia a Brusone en trigos, provenientes de distintos orígenes genéticos, fueron identificados. Estos recursos genéticos representan un gran avance en la búsqueda de mayor variabilidad para resistencia a *P. oryzae* en trigo, cuya base actual es muy estrecha y que pueden servir como fuente para transferir su resistencia a las futuras variedades a nivel mundial.

AGRADECIMIENTOS

A los Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, México, por proporcionar la colección de trigo sintéticos hexaploides y al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria, IPTA, por las facilidades de instalaciones en el Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé, Paraguay.

LITERATURA CITADA

- Chávez, A., Casal, C. and Kohli, M. M. 2017. Difference in the reaction to *Pyricularia oryzae* of wheat materials in the vegetative and reproductive stages. *Investigación Agraria*, 19(1), 56–63. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2017.junio.56-63>
- Chávez, A. R. and Kohli, M. M. 2018. Patogenicidad de *Magnaporthe oryzae* en variedades y líneas de trigo cultivadas en Paraguay. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 1–11. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1712-3>
- Couch, B. C. and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation

ACKNOWLEDGEMENTS

To the International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT, Mexico, for providing the collection of hexaploid synthetic wheats, and to the Paraguayan Agricultural Technology Institute, for their facilities in the Hernando Bertoni Research Center, Caacupé, Paraguay.

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

- of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4), 683–693. <https://doi.org/10.2307/3761719>
- Cruz, C. D., Peterson, W., Bockus, W. W., Kankanala, P., Dubcovsky, J., Jordan, K. W., Akhunov, E., Chumley, F., Baldeomar, F., Valent, B. (2016). The 2NS Translocation from *Aegilops ventricosa* Confers Resistance to the Triticum Pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Science*, 56(3), 990–1000. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.07.0410>
- Cruz, C. D., and Valent, B. (2017). Wheat blast disease: danger on the move. *Tropical Plant Pathology*, 42(3), 210–222. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0159-z>
- Das, M. K., Bai, G., Mujeeb-Kazi, A. and Rajaram, S. 2015. Genetic diversity among synthetic hexaploid wheat accessions (*Triticum aestivum*) with resistance to several fungal diseases. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(8), 1285–1296. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0312-9>
- Gladieux, P., Condon, B., Ravel, S., Soanes, D., Macié, J. L. N., Nhani, A., Chen, Li., Terauchi, R., Lebrun, M., Tharreau, D., Mitchell, T., Pedley, K., Valent, B., Talbot, N., Farman, M., Fournier, E. 2018. Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *American Society for microbiology*, 9(1), e01219-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01219-17>
- Gul Kazi, A., Awais, R., Tariq, M. and Mujeeb-Kazi, A. 2012. Molecular and morphological diversity with biotic stress resistances of high 1000-grain weight synthetic hexaploid wheats. *Pakistan Journal of Botany*, 44(3), 1021–1028. Retrieved from file:///C:/Users/user/Downloads/Gul-Kazietal2012PJB.pdf
- Jeger, M. J. and Viljanen-Rollinson, S. L. H. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s001220051615>
- Jighly, A., Alagu, M., Makdis, F., Singh, M., Singh, S., Emebiri, L. C., & Ogbonnaya, F. C. 2016. Genomic regions conferring resistance to multiple fungal pathogens in synthetic hexaploid wheat. *Molecular Breeding*, 36(9). <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0541-4>
- Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., de Vries, R. P., Lebrun, M.-H. (2014). Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology*, 79, 85–120. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.004>

- Kohli, M., Mehta, Y. R., Guzman, E., de Viedma, L. and Cubilla, L. E. 2011. *Pyricularia* blast-a threat to wheat cultivation. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(SPEC. ISSUE 1), 130–134. <https://doi.org/DOI:10.17221/3267-CJGPB>
- Lu, C. M., Yang, W. Y., Zhang, W. J. and Lu, B. R. 2005. Identification of SNPs and development of allelic specific PCR markers for high molecular weight glutenin subunit D tx1.5 from *Aegilops tauschii* through sequence characterization. *Journal of Cereal Science*, 41(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.05.006>
- Lule, D., de Villiers, S., Fetene, M., Bogale, T., Alemu, T., Geremew, G., Gashaw, G., Tesfaye, K. 2014. Pathogenicity and yield loss assessment caused by *Magnaporthe oryzae* isolates in cultivated and wild relatives of finger millet (*Eleusine coracana*). *Indian Journal of Agricultural Research*, 48(4), 258–268. <https://doi.org/10.5958/0976-058X.2014.00659.3>
- Malaker, P. K., Barma, N. C. D., Tiwari, T. P., Collis, W. J., Duveiller, E., Singh, P. K., Joshi, A., Singh, R., Braun, H., Peterson, G., Pedley, K., Farman, M., Valent, B. 2016. First Report of Wheat Blast Caused by *Magnaporthe oryzae* Pathotype *triticum* in Bangladesh. *Plant Disease*, PDIS-05-16-0666-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0666-PDN>
- Marangoni, M. S., Nunes, M. P., Fonseca, J. N., & Mehta, Y. R. 2013. *Pyricularia* blast on white oats - a new threat to wheat cultivation. *Tropical Plant Pathology*, 38(3), 198–202. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000004>
- Masood, R., Ali, N., Jamil, M., Bibi, K., Rudd, J. C. and Mujeeb-Kazi, A. 2016. Novel genetic diversity of the alien D-genome synthetic hexaploid wheat ( $2n=6x=42$ , Aabddd) germplasm for various phenology traits. *Pakistan Journal of Botany*, 48(5), 2017–2024. [https://doi.org/10/2016;48\(5\):2017-2024](https://doi.org/10/2016;48(5):2017-2024)
- Ogbonnaya, F. C., Abdalla, O., Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A. G., Xu, S. S., Gosman, N., Lagudah, Evans S., Bonnett, D., Sorrells, M., Tsujimoto, H. 2013. Synthetic hexaploids: Harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement. *Plant Breeding. Reviews* 37 (First Edition). <https://doi.org/10.1002/9781118497869.ch2>
- Okamoto, Y., Nguyen, A. T., Yoshioka, M., Iehisa, J. C. M. and Takumi, S. 2013. Identification of quantitative trait loci controlling grain size and shape in the D genome of synthetic hexaploid wheat lines. *Breeding Science*, 63(4), 423–429. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.423>
- Pieck, M. L., Ruck, A., Farman, M., Peterson, G. L., Stack, J. P., Valent, B., & Pedley, K. F. 2016. Genomics-Based Marker Discovery and Diagnostic Assay Development for Wheat Blast. *Plant Disease*, PDIS-04-16-0500-RE. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0500-RE>
- Prabhu, A. S., De Castro, E. D. M., De Araújo, L. G. and Berni, R. F. 2003. Resistance spectra of six elite breeding lines of upland rice to *Pyricularia grisea*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 38(2), 203–210. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000200006>
- Rasheed, A., Xia, X., Ogbonnaya, F., Mahmood, T., Zhang, Z., Mujeeb-Kazi, A. and He, Z. 2014. Genome-wide association for grain morphology in synthetic hexaploid wheats using digital imaging analysis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-128>
- Sohail, Q., Inoue, T., Tanaka, H., Eltayeb, A. E., Matsuoka, Y. and Tsujimoto, H. 2011. Applicability of *Aegilops tauschii* drought tolerance traits to breeding of hexaploid wheat. *Breeding Science*, 61(4), 347–357. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.347>

# Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex

## Respuesta de genotipos de *Capsicum pubescens* al daño ocasionado por el complejo fúngico de la marchitez

Alma Janeth Vallejo-Gutiérrez, Jaime Mejía-Carranza\*, Rómulo García-Velasco, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 1.5. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México, C.P. 52400, México; Marithza Guadalupe Ramírez-Gerardo, División de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero, Carretera Federal México-Ixtapan de la Sal km 64.5. La Finca, Villa Guerrero, Estado de México. C.P. 51760, México.

\*Autor de correspondencia: jmejiac@uaemex.mx

Recibido: 27 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 19 de Noviembre, 2018.

Vallejo-Gutiérrez AJ, Mejía-Carranza J, García Velasco R and Ramírez-Gerardo MG. 2018. Response of *Capsicum pubescens* genotypes to damage caused by the fungal wilt complex. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 50-70.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1809-3

Primera publicación DOI: 15 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 15, 2018.

**Resumen.** En el sur del Estado de México el chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo económicamente importante, sin embargo, es afectado por la “marchitez”, enfermedad de raíz que provoca la muerte de la planta. El objetivo fue identificar los organismos asociados y evaluar la variación en respuesta al daño de la marchitez en 16 genotipos (M1-M16) de chile manzano. Se sembraron segmentos de plantas infectadas en medio de cultivo PDA y 3P y se identificaron morfológica

**Abstract.** In the south of the State of Mexico the manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) is an economically important crop, but is affected by the “wilt disease”, a root disease that causes the death of the plant. The objective was to identify the associated organisms and evaluate the variation in response to the damage of wilt using 16 genotypes (M1-M16) of manzano pepper. Segments of infected plants were sown in PDA and 3P culture medium. The associated organisms were morphologically and molecularly identified. To evaluate the pathogen-genotype interaction, associated organisms were inoculated alone and their combinations in *C. pubescens*. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*, were identified as the main cause of wilt, in which there were differences in severity and incidence between colonies of *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ), and *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ). There were significant differences ( $P \leq 0.01$ ) in pathogenicity between *P. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, and

y molecularmente a los organismos asociados. Para la interacción patógeno-genotipo, se inocularon los organismos asociados solos y sus combinaciones en *C. pubescens*. Se identificaron a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* como responsables de la marchitez, en los que hubo diferencias en severidad e incidencia entre colonias de *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ), y de *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ). Hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en patogenicidad entre *P. capsici*, *F. oxysporum* y *R. solani*, y combinaciones entre estos. Se observó variación en la resistencia a la marchitez, donde M8 fue el genotipo que presentó resistencia a *F. oxysporum* y *R. solani*, y M9 tolerancia a *F. oxysporum*. Éstos pueden ser aprovechados en el mejoramiento genético para desarrollo de genotipos resistentes.

**Palabras clave:** chile manzano, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*.

El género *Capsicum*, que incluye a los chiles dulces y picantes, son verduras y especias cultivadas y consumidas en todo el mundo (Carrizo *et al.*, 2016). De acuerdo a USDA-ARS (2011), el género *Capsicum* cuenta con 38 especies, de las cuales *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* y *Capsicum baccatum* son cultivadas. De las cinco especies *C. annuum* y *C. frutescens* fueron domesticados en Mesoamérica y *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* en América del Sur (Pickersgill, 2007). El chile en México, por su tradición e historia es un cultivo importante, en 2016 alcanzó 2.3 mill/t, con un valor que rebasa los 22 mil 500 millones de pesos (SAGARPA, 2017). En la diversidad de chiles que se cultivan en el territorio nacional, el chile manzano (*C. pubescens*) ha cobrado mayor importancia en la última década y de acuerdo con

combinaciones among them. Variation in resistance to wilt was observed, where M8 was the genotype that showed resistance to *F. oxysporum* and *R. solani*, and M9 tolerance to *F. oxysporum*. These can be used in breeding for the development of resistant genotypes.

**Key words:** Manzano pepper, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*.

The *Capsicum* genus, which includes sweet and hot chilies, are vegetables and spices cultivated and consumed worldwide (Carrizo *et al.*, 2016). According to USDA-ARS (2011), the genus *Capsicum* has 38 species, from which the most grown are *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* and *Capsicum baccatum*. From the five species, *C. annuum* and *C. frutescens* were domesticated in Mesoamerica, and *C. chinense*, *C. baccatum* and *C. pubescens* in South America (Pickersgill, 2007). Traditionally and historically, chili is an important crop in Mexico, whose production in 2016 was of 2.3 million tons valued at more than 22,500 million Mexican pesos (SAGARPA, 2017). Among the diversity of chili species cultivated in Mexico, the importance of manzano pepper (*C. pubescens*) increased in the last decade, and according to SAGARPA (2018), 4,221.83 tons are intended only for export to the United States, 86.3% of which are produced in the southern zone of the State of Mexico. Manzano pepper cultivation is intensive in that region. However, manzano pepper has agronomic production limitations, such as wilt susceptibility, a disease that causes root damage and death in manzano pepper plants. This disease, which is considered the most destructive worldwide (Zhang *et al.*, 2013), was first detected in *C. annuum* by Leonian (1922), who identified

SAGARPA (2018), 4,221.83 t están destinadas solo para exportación a los Estados Unidos, de las cuales el 86.3 % es producido en el sur del Estado de México. En esta región el cultivo de chile manzano es intensivo. Sin embargo, tiene limitaciones agroeconómicas en la producción, como la susceptibilidad a la “marchitez”, enfermedad que daña a la raíz y causa la muerte de la planta. Esta enfermedad considerada como una de las más destructivas en todo el mundo (Zhang *et al.*, 2013), fue reportada por primera vez en *C. annuum* por Leonian (1922), quien identificó a *Phytophthora capsici* como su agente causal. Los organismos asociados pueden afectar al cultivo en cualquier etapa de desarrollo, causan la pérdida de turgencia en la planta y su muerte posterior (Kousik *et al.*, 2012). Para *C. annuum* en México, se han reportado como agentes causales de la marchitez, además de *P. capsici*, a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Uc-Arguelles *et al.*, 2017).

De acuerdo con González-Pérez *et al.* (2014), *C. pubescens* cuenta con una baja diversidad genética como consecuencia de un efecto fundador durante su domesticación que lo hace una especie menos polimórfica. Aun así, en la zona sur del Estado de México, con un variado número de nichos ecológicos, se cultivan diferentes genotipos de *C. pubescens*, que representan considerable variación dentro de la especie y por lo tanto, un valioso reservorio de germoplasma que pudiera ser de utilidad en el mejoramiento de esta especie (Arias *et al.*, 2017), no solo para aspectos morfológicos sino también en la resistencia a enfermedades. Con la presencia de variación natural, algunos individuos de la población pueden expresar ciertas características con mayor o menor grado que otros, las cuales pueden dar al individuo ciertas ventajas ligadas a su ciclo de vida. Estos individuos pueden variar en la producción de frutos, tanto en número como en tamaño, color, textura, sabor, maduración, apariencia

*Phytophthora capsici* as the causal agent. The associated organisms affect the crop at any development stage, cause loss of turgidity and the subsequent death of plants (Kousik *et al.*, 2012). Besides *P. capsici*, in Mexico, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* have been reported as causal agents of wilt in *C. annuum* (Uc-Arguelles *et al.*, 2017).

According to González-Pérez *et al.* (2014), *C. pubescens* has low genetic diversity as a result of a founder effect during its domestication that makes it a less polymorphic species. However, in the southern zone of the State of Mexico, with a varied number of ecologic niches, different genotypes of *C. pubescens* are cultivated, which represents a considerable variation within the species and, therefore, a valuable germplasm reservoir that could be used to improve not only the morphological traits but also the disease resistance of this species (Arias *et al.*, 2017). With the existing natural variation, some individuals from a population can express certain characteristics with a higher or lesser degree than others, and this can give the individual certain advantages linked to their life cycle. Fruits produced by those individuals may vary both in number and size, color, texture, taste, maturity, appearance and quality, as well as plant's architecture and ability to resist abiotic or biotic stresses (Schubert *et al.*, 2009). Due to these factors, the variation in the reproduction of *C. pubescens* genotypes, during which some individuals may have a higher number of offspring than those of others, would mean that there is an increase in the frequency of their genetic material compared to others (Nora *et al.*, 2011).

The genetic diversity within species is the main reason why a determined species evolves under changing environmental conditions and selection pressures. Knowing the genetic diversity is key in order to diversify germplasm sources, try to minimize genetic vulnerability risks and increase



y la calidad, así como la arquitectura de la planta y su capacidad de resistir estrés abiótico o biótico (Schubert *et al.*, 2009). Debido a estos factores, la variación en la reproducción de genotipos de *C. pubescens*, en la que algunos pudieran tener mayor cantidad de descendientes que otros, implicaría un incremento en la frecuencia de su material genético con respecto a los demás (Nora *et al.*, 2011).

La diversidad genética dentro de las especies es la razón principal por la que una determinada especie tenga la oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente y presiones de selección. Asimismo, el conocimiento de la diversidad genética es indispensable para diversificar las fuentes de germoplasma, tratar de minimizar los riesgos de vulnerabilidad genética e incrementar las probabilidades de detectar alelos favorables (Ruíz *et al.*, 2016). El Centro Universitario UAEM Tenancingo cuenta con 16 genotipos colectados en el sur del Estado de México, de los cuales, 15 presentan variabilidad morfológica y caracteres únicos de interés genético y comercial (Martínez, 2016). Con la finalidad de aprovechar los genotipos de *C. pubescens* que forman parte de la colección de germoplasma del CU Tenancingo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de 16 genotipos de chile manzano al complejo fúngico de microorganismos asociados de la marchitez del chile en el Estado de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado a 18° 58' 05.53" N y 99° 36' 50.51" O, a una altitud de 2068 msnm. En 2016, en el sur del Estado de México se colectaron plantas de chile manzano con síntomas de marchitez en las localidades siguientes: 5 en Ahuacatlán, Ixtapan de la

the probabilities of detecting favorable alleles (Ruíz *et al.*, 2016). The University Center of the Autonomous University of Mexico State (UAEM for its acronym in Spanish) in Tenancingo has 16 genotypes that were collected in the southern zone of the State of Mexico, 15 of which represent morphological variability and have unique traits that are genetically and commercially important (Martínez, 2016). To make the most of the *C. pubescens* genotypes that are part of the collection of the UC-Tenancingo, the objective of the present study was to evaluate the response of 16 manzano pepper genotypes to the fungal complex of microorganisms associated with chili wilt in the State of Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

The research was conducted at UAEM's University Center in Tenancingo, located at 18° 58' 05.53" N and 99° 36' 50.51" W, 2068 masl. In 2016, manzano pepper plants showing wilt symptoms were collected at the following locations of the southern zone of the State of Mexico: 5 in Ahuacatlán, Ixtapan de la Sal; 5 in El Zarco, Tenancingo; 3 in Santa Ana, Tenancingo; 4 in Tepoxtepec, Tenancingo; 3 in Matlazinca, Villa Guerrero; 4 in San Miguel, Ixtapan de la Sal; 5 in El Potrero, Coatepec Harinas; 5 in Ixtlahuaca, Coatepec Harinas; 3 in San Nicolás, Tenancingo; and 4 in Las Cabañas, Tenancingo. The collection sites were classified according to their cropping intensity (IC) that was defined based on the cultivated area: low: up to 3 ha; intermediate: 3.1-8.0 ha; high: more than 8.1 ha. Samples wrapped with wet brown paper were placed in transparent plastic bags and transported in a cooler to the laboratory, where were kept at 4 °C until the next day, when they were used.

Sal; 5 en El Zarco, Tenancingo; 3 en Santa Ana, Tenancingo; 4 en Tepoxtepec, Tenancingo; 3 en Matlazinca, Villa Guerrero; 4 en San Miguel, Ixtapan de la Sal; 5 en El Potrero, Coatepec Harinas; 5 en Ixtlahuaca, Coatepec Harinas; 3 en San Nicolás, Tenancingo; y, 4 en Las Cabañas, Tenancingo. Los sitios de colecta se clasificaron con base en la Intensidad de Cultivo (IC) definida por la superficie cultivada en: Baja, hasta 3 ha; media, de 3.1 a 8.0 ha; y alta, más de 8.1 ha. Las muestras envueltas en papel de estraza húmedo se guardaron en bolsas de plástico transparente y fueron transportadas en hielera al laboratorio, donde se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para su utilización al siguiente día.

**Aislamiento de los organismos asociados.** De 41 plantas colectadas en los 10 sitios muestreados, de cada una se obtuvieron ocho segmentos de raíz y ocho de tallo, que en total sumaron 656 muestras. Las muestras se desinfectaron y para hongos se sembraron de acuerdo a López (1984) en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA); para oomicetos se sembraron en 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimaricina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L<sup>-1</sup> de ampicilina en agua destilada, de acuerdo a López *et al.*, (2009), modificado de Kannwischer and Mitchell (1978). Los cultivos se incubaron a una temperatura de 24 °C bajo oscuridad. Las siembras se revisaron cada 24 h para observar el crecimiento y desarrollo del hongo. Una vez crecidos los hongos y el oomiceto, se hicieron transferencias sucesivas hasta la obtención de cultivos puros, de los que se hicieron cultivos monospóricos y de punta de hifa. Las colonias se preservaron en tubos con PDA cubierto con aceite mineral estéril.

**Identificación morfológica de los organismos asociados.** Los organismos asociados se identificaron

**Isolation of the associated organisms.** Eight segments of root and eight segments of stem were taken from each of the 41 plants collected in the 10 sampled sites, with a total of 656 samples. The samples were disinfected; for fungi, the samples were placed in Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, according to the method of López (1984); oomycetes were cultivated in 20 g of maize flour, 18 g of agar-agar, 0.8 mL of pimaricin, 0.02 g of rifamycin and 0.25 g L<sup>-1</sup> of ampicillin diluted in distilled water, according to the method of López *et al.*, (2009), modified from Kannwischer and Mitchell (1978). The cultures were incubated at 24 °C in darkness and monitored every 24 h to observe fungus growth and development. When fungi and oomycetes had grown, successive transfers were made to obtain pure cultures and then prepare monosporic and hyphal tip cultures. The colonies were kept in tubes containing a PDA culture medium covered with sterile mineral oil.

**Morphological identification of the associated organisms.** The associated organisms were identified using taxonomic keys for fungi and oomycetes. The keys of Booth (1971) and Leslie and Summerell (2006) were used to characterize fungi micronidia and macronidia size and shape, and to describe chlamydospores, which are an important structure for identification; and the keys of Singleton *et al.* (1992) and Watanabe (2002) to characterize sclerotia, ramification angles and mycelium. The keys of Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) were used to identify oomycetes colony growth, type of mycelium, and sporangia and chlamydospores shape.

**Molecular identification of the associated organisms.** DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method

por claves taxonómicas para hongos y oomicetos. Para hongos, se utilizaron las claves de Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006), para caracterizar el tamaño y la forma de micro y macroconidios, así como descripción de clamidosporas, estructuras importantes para la identificación; y las claves de Singleton *et al.* (1992) y Watanabe (2002), para la caracterización de esclerocios, ángulos de ramificación, así como micelio. Para oomicetos, se usaron las claves de Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008), en la identificación de crecimiento de la colonia, tipo de micelio, forma de esporangios y clamidosporas.

**Identificación molecular de organismos asociados.** La extracción del ADN se hizo por el método (CTAB) y acetato de sodio. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos y oomicetos con los iniciadores ITS-1 5'-tccgtagtgtaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990); los cuales amplifican fragmentos de entre 500 y 900 pares de bases (pb). La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL fue de 10 µL de agua ultrapura, 12 µL de MyTaq Mix® (Bioline), 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R y 1 µL de ADN. El programa térmico fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s, respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min para oomicetos. Para hongos fue de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-60-72 °C durante 30-30-60 s, respectivamente y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en TBE con geles de agarosa al 1.2 %.

**Secuenciación.** Productos de PCR se purificaron con el Kit EZ-10 Spin Column Handbook (Bio Basic Canada Inc.) y se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la FES- Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

and sodium acetate. Universal PCR reactions were performed for fungi and oomycetes using the ITS-1 5'-tccgtagtgtaacctgcgg-3' and ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' primers (White *et al.*, 1990) that amplify fragments of 500-900 base pairs (bp). The reaction mixture in a final volume of 25 µL was made from a mixture of 10 µL of ultrapure water, 12 µL of MyTaq Mix® (Bioline), 1 µL of F primer, 1 µL of R primer and 1 µL of DNA. For oomycetes, the thermal program was set at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94-55-72 °C for 30-30-60 s, respectively, and one final extension at 72 °C for 5 min. For fungi, the thermal program was set at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94-60-72 °C for 30-30-60 s, respectively, and one final extension at 72 °C for 5 min. The amplified products from the PCR reactions were separated by electrophoresis using tris-borate-EDTA (TBE) and 1.2% agarose gels.

**Sequencing.** The PCR amplified fragments were purified using the EZ-10 Spin Column Handbook kit (Bio Basic Canada, Inc.) and then sequenced in the Molecular Biology Laboratory of FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The sequences in FASTA format (Chromas 2.6.5 version) were aligned with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank database for consensus and identity –BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (available at <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>).

**Pathogenicity *in vitro*.** Pathogenicity was evaluated on *C. pubescens* M3 genotype, the most cultivated material in the study region. Seeds were disinfested and inoculated following the method of Apodaca-Sánchez *et al.* (2001), and then placed in Petri dishes containing an agar-water culture medium. Each strain obtained from the monosporic and

Las secuencias en formato FASTA (Chromas versión 2.6.5) se alinearon para consenso e identidad con la base de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) – BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (disponible en <https://www.yeastgenome.org/blast-fungal>).

**Patogenicidad *in vitro*.** La patogenicidad se evaluó en el genotipo M3 de *C. pubescens*, material más cultivado en la región. Las semillas se desinfectaron e inocularon de acuerdo a Apodaca-Sánchez *et al.* (2001) y después se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar-agua. Cada cepa obtenida de cultivo monospórico y de punta de hifa, fue considerada un tratamiento, con 5 repeticiones de 10 semillas cada una. El testigo fue semilla desinfectada y sumergida en agua destilada estéril. Se evaluó la patogenicidad mediante la incidencia y la severidad medidas a los 10 días de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012), y se registraron los síntomas de radícula e hipocótilo. La incidencia se determinó por el porcentaje de plántulas con manifestación de la enfermedad. La severidad se midió por la longitud de la lesión a lo largo de la plántula expresada en porcentaje. Los valores obtenidos se promediaron dentro de cada unidad experimental. La relación entre incidencia y severidad se calculó por proporción mediante el cociente severidad/incidencia (Segura *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

**Interacción en infecciones múltiples.** Semillas desinfectadas del genotipo M3, se sembraron en un tubo de ensayo con agar-agua, se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y al germinar se establecieron a 12 h de luz y 12 de oscuridad a 25 °C. A los siete días de germinadas las semillas se inocularon de acuerdo a Herrera y Laurentin (2012). Se aplicaron 100 µL de una suspensión de esporas  $1 \times 10^6$

hyphal tip cultures was considered as a treatment of 5 repetitions with 10 seeds each. Disinfested seed immersed in sterile distilled water was used as control. The pathogenicity was evaluated using the incidence and severity levels measured at day 10, according to Herrera and Laurentin (2012), and radicle and hypocotyl symptoms were recorded. The incidence was determined using the percentage of seedlings showing disease symptoms. The severity was measured using the lesion length along the seedling and expressed as percentage. The obtained values were averaged within each experiment unit. The ratio between incidence and severity was calculated proportionally using the severity/incidence quotient (Segura *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010).

**Interaction in multiple infections.** Disinfested seeds of the M3 genotype were placed in a test tube containing an agar-water medium, kept in darkness at 25 °C, and, when germinated, at intervals of 12 h light and 12 h darkness at 25 °C. At day 7, the seeds were inoculated following the method of Herrera and Laurentin (2012). A 100 µL of  $1 \times 10^6$  spore suspension and 100 µL of monosporic and hyphal tip culture of the associated organisms, alone and combined, were applied to seven treatments with 10 replications each: *P. capsici* (P); *P. capsici* plus *R. solani* (P+R); *F. oxysporum* plus *P. capsici* (F+P); *F. oxysporum* plus *P. capsici* plus *R. solani* (F+P+R); *F. oxysporum* (F); and *R. solani* (R). The treatments were incubated at intervals of 12 h light and 12 h darkness at 25 °C and monitored every 24 h to evaluate the disease severity, which was determined by lesion length/seedling length x 100.

**Pathogens-genotype interaction.** *C. pubescens* M1-M16 genotypes collected at different sites of the southern zone of the State of Mexico were used because they are morphologically contrasting

y 100 µL de cultivo monospórico y de punta de hifa de los organismos asociados en forma individual y sus combinaciones en siete tratamientos con 10 repeticiones cada uno: *P. capsici* (P); *P. capsici* más *R. solani* (P+R); *F. oxysporum* más *P. capsici* (F+P); *F. oxysporum* más *P. capsici* más *R. solani* (F+P+R); *F. oxysporum* (F); y *R. solani* (R). Se incubaron a 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 25 °C y se observaron cada 24 h para evaluar la severidad determinada por (longitud de la lesión/longitud de la plántula) x 100.

**Interacción patógenos-genotipo.** Se emplearon los genotipos de *C. pubescens* M1 a M16, materiales morfológicamente contrastantes a diferentes caracteres como flor y fruto, colectados en diferentes localidades de la región sur del Estado de México (Martínez, 2016). Plántulas con cuatro hojas verdaderas se inocularon con los patógenos identificados solos y combinados de acuerdo a los siguientes tratamientos (T): *F. oxysporum* (T1); *P. capsici* (T2); *R. solani* (T3); *F. oxysporum* + *P. capsici* (T4) y *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* (T5). El método de inoculación utilizado fue el descrito por Martínez *et al.* (1996). Las plantas inoculadas fueron trasplantadas en vasos de poliestireno de un litro, con sustrato de una mezcla desinfectada de turba y agrolita en proporción de 2:1 respectivamente, y con cinco repeticiones por tratamiento. La severidad de la enfermedad se midió por el porcentaje de daño en hipocótilo y raíz de la plántula según la escala 1-9, desarrollada en el CIAT (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Los datos se transformaron logarítmicamente para obtener el modelo lineal general utilizando el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, los tratamientos se compararon mediante la prueba de Duncan ( $p=0.05$ ), con el empleo de InfoStat.

with different traits such as flower and fruit (Martínez, 2016). Seedlings with four true leaves were inoculated with the identified pathogens, alone and combined, according to the following treatments (T): *F. oxysporum* (T1); *P. capsici* (T2); *R. solani* (T3); *F. oxysporum* + *P. capsici* (T4) and *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* (T5). The inoculation method used was that described by Martínez *et al.* (1996). The plants inoculated were transplanted to 1-liter polystyrene cups containing peat and expanded mineral perlite (agrolita) at a 2:1 ratio, respectively, with five replications per treatment each. The disease severity was measured by the percentage of the seedling's hypocotyl and root using a 1-9 scale developed at CIAT (Abawi and Pastor-Corrales, 1990). Data were logarithmically converted to obtain a general linear model using the InfoStat statistical software (Di Rienzo *et al.*, 2016).

**Statistical analysis.** The data obtained were subjected to an analysis of variance and the treatments were compared using Duncan's test ( $p=0.05$ ) and the InfoStat program.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Isolation of the associated organisms.** *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani* (Table 1) were isolated from samples collected at the study sites. *F. oxysporum* was constantly found in all the sites (9/10), while *P. capsici* was found only in sites with intermediate and high cropping intensity (Table 1). The presence of *R. solani* in one sampled site suggests a limited participation in wilt damage. The three associated organisms were isolated at one site, and this indicates that the pathogen may individually or collectively affect the host. These results coincide with those reported by Anaya-López *et al.* (2011),

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Organismos asociados aislados.** De las localidades muestreadas se aisló a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* (Cuadro 1). *Fusarium oxysporum* fue constante casi en todas las localidades (9/10), mientras que la presencia de *P. capsici* se limitó a las localidades con intensidad de cultivo media y alta (Cuadro 1). La presencia de *R. solani* en solo un sitio de muestreo sugiere limitada participación en el daño por marchitez. Solo en una localidad se aislaron los tres organismos asociados, lo que denota la participación individual o colectiva en el ataque al huésped. Los resultados coinciden con lo reportado por Anaya-López *et al.* (2011), quienes mencionaron a *F. oxysporum* como el más común y en segundo turno a *R. solani* en cultivo de *C. annuum*. De acuerdo a Nelson *et al.* (1983), la variación en las frecuencias de estos organismos asociados como responsables de la marchitez se ve afectada por diversos factores, donde las condiciones climáticas son determinantes.

who mentioned *F. oxysporum* as the most common pathogen, followed by *R. solani* in *C. annuum* crops. According to Nelson *et al.* (1983), the frequency variation of the associated organisms that cause wilt is affected by diverse factors, among which climate conditions are crucial. Compared to the other communities, the climate at El Potrero, the site where the three associated organisms were found, is warmer and rainy, and favors the development of the associated organisms. On the other hand, the crop systems, the use of fungicides and the genotype of the same crop itself, are decisive factors that favor the presence and survival of the organisms associated with the fungal complex (Guigón-López *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2015). The crop's phenological stage at which samples are collected could influence the presence of the fungal complex, as has been observed in the case of *C. annuum* seedling stage (Vásquez *et al.*, 2009).

### Morphological description of the associated microorganisms identified. *Fusarium oxysporum*

**Cuadro 1. Organismos aislados en cultivo de *C. pubescens* en localidades de tres municipios del sur del Estado de México.**

**Table 1. Isolated organisms from *C. pubescens* crops at three municipalities in the southern zone of the State of Mexico.**

| Localidad<br>Zona | IC <sup>z</sup> | Microorganismo fitopatógeno |                   |                  | Muestras<br>procesadas <sup>y</sup> |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------------|
|                   |                 | <i>F.oxysporum</i>          | <i>P. capsici</i> | <i>R. solani</i> |                                     |
| Ahuacatitlan      | Baja            | X                           |                   |                  | 75                                  |
| El Zarco          | Media           | X                           | X                 |                  | 75                                  |
| Santa Ana         | Baja            | X                           |                   |                  | 45                                  |
| Tepoxtepec        | Baja            | X                           |                   |                  | 60                                  |
| Matlazinca        | Media           | X                           | X                 |                  | 45                                  |
| San Miguel        | Media           | X                           | X                 |                  | 60                                  |
| El Potrero        | Alta            | X                           | X                 | X                | 75                                  |
| Ixtlahuaca        | Alta            | X                           | X                 |                  | 75                                  |
| San Nicolás       | Baja            | X                           |                   |                  | 45                                  |
| Las Cabañas       | Media           |                             | X                 |                  | 60                                  |
| Total             |                 |                             |                   |                  | 656                                 |

<sup>z</sup>Intensidad de cultivo; <sup>y</sup>segmentos de tallo y raíz / <sup>z</sup>Cropping intensity; <sup>y</sup>stem and root segments.

El Potrero, comunidad en la que se encontraron los tres organismos asociados, a diferencia de las otras comunidades presenta un clima más cálido y lluvioso lo que favorece el desarrollo de los organismos asociados. Por otra parte, los sistemas de producción, la utilización de fungicidas y el genotipo mismo del cultivo son determinantes para la presencia y sobrevivencia de los organismos asociados al complejo fúngico (Guigón-López *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2015). Es posible que la etapa fenológica del cultivo al momento de la colecta influya en la presencia del complejo fúngico, como se ha marcado para la etapa de plántula en *C. annuum* (Vásquez *et al.*, 2009).

**Descripción morfológica de microorganismos asociados identificados.** *Fusarium oxysporum* presentó micelio aéreo y abundante con un hábito de crecimiento radial y pigmentación naranja. Micelio hialino y septado, microconidios de forma ovalada, de tamaño promedio 8.6 x 4.3 µm con 0 ó 1 septo, abundantes en falsas cabezas y en monofialides; macroconidios en menor cantidad, con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie de tres a cuatro septos, de tamaño promedio 23.8 x 4.2 µm. También se observaron clamidosporas abundantes, terminales o intercalares en la hifa (Figura 1).

*Rhizoctonia solani* presentó micelio con coloración blanca los primeros cuatro días, a partir del quinto día el micelio se tornó café y mostró la presencia de esclerocios. Microscópicamente se logró observar ramificación próxima al septo distal en células vegetativas jóvenes, ángulo de 90°, estrechamiento de hifa y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

*Phytophthora capsici* presentó micelio color blanco, crecimiento arrosetado en medio de cultivo

desarrollado abundante aéreo, hialino y septado micelio, con hábito de crecimiento radial y pigmentación naranja, microconidios de forma ovalada de 8.6 x 4.3 µm tamaño promedio con 0 o 1 septo, abundantes en falsas cabezas y en monofialides, un menor número de macroconidios con célula apical atenuada y célula basal en forma de pie de tres a cuatro septos de 23.8 x 4.2 µm tamaño promedio, así como abundantes intercalares y terminales clamidosporas en las hifas (Figura 1).

Los primeros cuatro días, *Rhizoctonia solani* desarrolló micelio blanco en color, que se volvió café al quinto día, y esclerocios. Observaciones microscópicas mostraron células vegetativas jóvenes con ramificación próxima al septo distal, un ángulo de 90°, hifas estrechas y formación de septos en una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro (Figura 1).

*Phytophthora capsici* desarrolló micelio blanco en color, crecimiento arrosetado en medio de cultivo, hialino y coenocítico micelio; esporangios ovoides, tipo limón y no totalmente papilados de 11 a 54 µm de largo y 9 a 36 µm de ancho, y clamidosporas intercalares de 9.5 µm de diámetro (Figura 1).

Diferentes autores (Lozano *et al.*, 2015) han reportado los organismos asociados como los agentes causales de la marchitez en *C. annuum*. Estos organismos han sido encontrados en el norte y centro de México (Anaya-López, 2011). Sin embargo, en el caso de *C. pubescens*, incluso cuando se encuentran los tres organismos asociados, la presencia de *P. capsici* está asociada con una intensidad de corte intermedia y alta en la zona de producción del Estado de México (Tabla 1).

**Identificación molecular de los organismos asociados.** Los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los tres organismos asociados confirmaron la identidad del patógeno, que ya había sido previamente establecida morfológicamente. Los fragmentos



**Figura 1.** Organismos asociados causales de la marchitez de *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) Microconidios, b) Micelio hialino, c) Micelio septado. 2. *R. solani* a) Septo cercano al punto de origen a la ramificación hifal, b) Micelio grueso y septado, c) Angulo de 90°. 3. *P. capsici* a) Esporangios, b) Micelio hialino y toruloso.  
**Figure 1.** Associated organisms that caused wilt in *C. pubescens*. 1. *F. oxysporum* a) microconidia, b) hyaline mycelium, c) septate mycelium. 2. *R. solani* a) septa close to the point of origin to the hyphal ramification, b) thick and septate mycelium, c) 90° angle. 3. *P. capsici* a) sporangia, b) hyaline and torulose mycelium.

PDA, micelio cenocítico, hialino y toruloso; esporangios ovoides de forma alimonada y poco papilados de 11 a 54  $\mu\text{m}$  de largo y 9 a 36  $\mu\text{m}$  de ancho, clamidosporas intercalares de 9.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1).

Dichos organismos asociados han sido reportados en *C. annuum* como responsables de la marchitez por diferentes autores (Lozano *et al.*, 2015). Éstos se han encontrado en el Norte y Centro de México (Anaya-López, 2011). Sin embargo para el caso de *C. pubescens*, aun cuando se encuentran los tres organismos asociados, la presencia de *P. capsici* se ve relacionada a la media y alta intensidad del cultivo en la zona productora del Estado de México (Cuadro 1).

**Identificación molecular de los organismos asociados.** La amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de los tres organismos asociados confirmó la identidad, previamente establecida morfológicamente. El fragmento amplificado de *F. oxysporum* mostró peso molecular de 900 pares de bases (pb), mientras que *P. capsici* y *R. solani* mostraron un peso aproximado de 650 pb (Figura 2).

Los fragmentos secuenciados de la cepa de *F. oxysporum* se alinearon con la secuencia de *F.*

fragment of *F. oxysporum* had a molecular weight of 900 base pairs (bp), and *P. capsici* and *R. solani* had an approximate weight of 650 bp (Figure 2).

The sequenced fragments of the *F. oxysporum* strain were aligned with the *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sequence (accession CM000593.1), and the consensus showed 88% identity with fragments from the region 248-270. The sequenced fragments of the *P. capsici* strain were aligned with the *P. capsici*\_LT1534 sequence version 11 accession PcapLT1534\_SC064, and the consensus showed 83% identity with fragments from the region 146-259. Similarly, the DNA sequenced fragments of the *R. solani* strain were aligned with sequences from the NCBI's gene bank, and its highest level of identity (90%) coincided with that of *R. solani*, accession number JATN01000256.1 (Version JATN01000256.1 GI: 576995022) with fragments from the region 144-292.

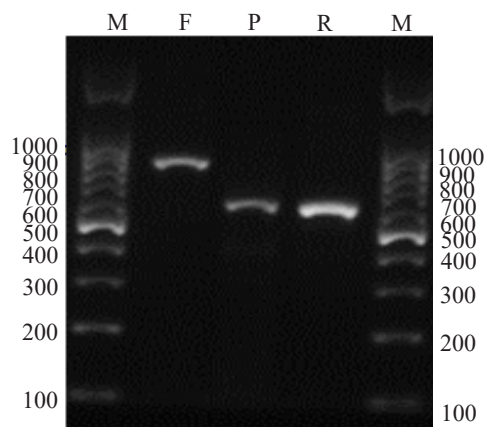
**Pathogenicity *in vitro*.** The symptoms observed were necrotic root apex, hypocotyl and/or cotyledons. The *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* isolates were pathogenic to manzano pepper seedlings but symptoms appeared at different time. The expression of symptoms when *F. oxysporum*



*oxysporum* f.sp. *lycopersici* accesión CM000593.1, y en el consenso tuvo un 88 % de identidad en fragmentos de la región 248 a 270. Los fragmentos secuenciados de la cepa de *P. capsici* se alinearon con la secuencia de *P. capsici*\_LT1534, versión 11, accesión PcapLT1534\_SC064, con un 83 % de identidad en consenso con fragmentos de la región 146 – 259. Similarmente los fragmentos secuenciado de ADN de la cepa de *R. solani* se alinearon con secuencias del banco de genes NCBI y su mayor identidad (90 %) se consensó con *R. solani* accesión número JATN01000256.1 (Versión JATN01000256.1 GI: 576995022), con fragmentos de la región 144 – 292.

**Patogenicidad *in vitro*.** Los síntomas observados fueron necrosis en ápice de raíz, hipocótilo y/o cotiledones. Los aislamientos de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* resultaron patogénicos en las plántulas de chile manzano con variación temporal en la manifestación de los síntomas. La expresión de los síntomas con inóculo de *F. oxysporum* varió de 8 a 12 días después de la siembra de acuerdo a la cepa. En el caso de las plántulas inoculadas con *P. capsici* y *R. solani* los síntomas se presentaron a los 10 días después de la inoculación.

En incidencia y severidad se observaron diferencias estadísticas entre colonias de *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$ ; con valores respectivos máximo y mínimo entre tratamientos de 34.4 y 92.8 % en incidencia y de 48.8 y 81.6 % en severidad) y entre colonias de *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ; con valores respectivos máximo y mínimo entre tratamientos de 49.2 y 63.6 % en incidencia y de 69.3 y 90.9 % en severidad) asociadas al lugar de colecta, lo que posiblemente indique heterogeneidad intraespecífica, asociada entre otros factores a la dispersión natural de los patógenos, como la reportada para cenicienta (*Leveillula taurica*) en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011)



**Figura 2.** Electroforesis en gel de 1.2 % de agarosa en TBE para fragmentos amplificados de ADN ITS de *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (P) y *R. solani* (R); carriles M corresponden al marcador molecular de 100 pb.

**Figure 2.** Electrophoresis in 1.2% agarose gel in TBE for ITS DNA amplification of fragments of *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (P) and *R. solani* (R); M lanes correspond to the 100 bp molecular marker.

was inoculated varied 8-12 days after being cultivated depending on the strain. In the case of seedlings inoculated with *P. capsici* and *R. solani*, symptoms appeared 10 days after inoculation.

Statistical differences in incidence and severity were observed on *F. oxysporum* ( $P \leq 0.01$  colonies, with maximum and minimum values between 34.4 and 92.8% incidence, and 48.8 and 81.6% severity, respectively, and on *P. capsici* colonies ( $P \leq 0.05$ , with maximum and minimum values between 49.2 and 63.6% incidence, and 69.3 and 90.9% severity, respectively, that were associated with the collection site, a fact that may indicate intraspecific heterogeneity associated, among other factors, with pathogens natural spread, such as that reported for powdery mildew (*Leveillula taurica*) in tomato crops (*Solanum lycopersicum*) (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011), and resistance development by the pathogens due to the selection pressure caused by

y desarrollo de resistencia de los patógenos por la presión de selección ejercida con fungicidas (Silva-Rojas *et al.*, 2009). La incidencia de los patógenos fue de 65 % en *F. oxysporum*, 56.4 % en *P. capsici* y del 76 % para *R. solani*. Por otra parte, los valores de severidad fueron de 81.4 % para *P. capsici*, 64.6 % *F. oxysporum* y 65.5 % para *R. solani* lo que denota un efecto más devastador del oomiceto, el cual procede de una zona altamente productora de chile manzano, donde el control de enfermedades es por medio de productos químicos, lo cual de acuerdo a Silva-Rojas *et al.* (2009), trae como consecuencia la resistencia de *P. capsici*.

Los valores mayores a uno del cociente severidad/ incidencia (Figura 3), indican mayor patogenicidad, ya que aun cuando los patógenos mostraron incidencia relativamente similar, el proceso infeccioso en términos de superficie del tejido (severidad) fue más acelerado. En *F. oxysporum*

fungicidas (Silva-Rojas *et al.*, 2009). The pathogens incidence was 65% in *F. oxysporum*, 56.4% in *P. capsici*, and 76% in *R. solani*. On the other hand, the severity values were 81.4% in *P. capsici*, 64.6% in *F. oxysporum*, and 65.5% in *R. solani*. These values indicate a more devastating effect caused by oomycetes, which come from a major manzano pepper production zone, where chemical products are used to control diseases, a fact that, according to Silva-Rojas *et al.* (2009), causes *P. capsici* to become resistant.

Values higher than 1 in the severity/incidence quotient (Figure 3) indicate a higher level of pathogenicity given that although the pathogens showed a relatively similar incidence, the infection process was faster (severity) on the tissue area. The severity/incidence quotient of *F. oxysporum* was lower than 1.0 in five out of nine sites where *F. oxysporum* was found (Figure 3), which

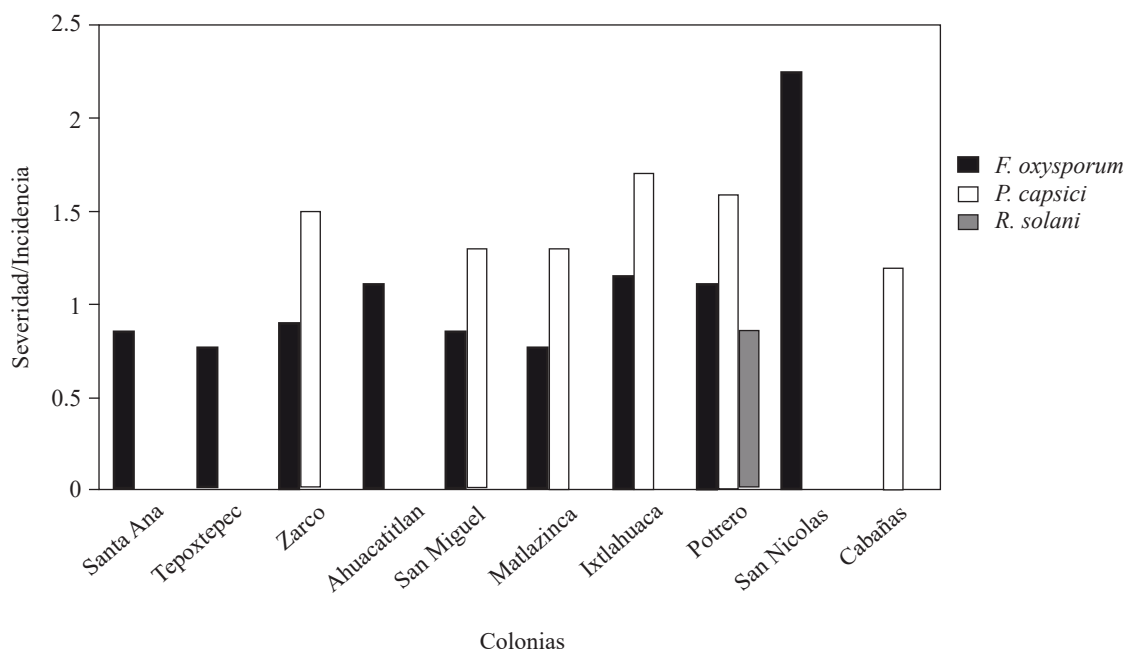


Figura 3. Cociente de severidad/incidencia de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* en plántulas de chile manzano en 10 localidades productoras del sur del Estado de México.

Figure 3. Severity/incidence quotient of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* in manzano pepper seedlings in 10 production sites of the southern zone of the State of Mexico.

El cociente severidad/ incidencia fue menor a 1.0 en cinco de nueve localidades donde se presentó (Figura 3), lo que representó mayores valores de incidencia que de severidad; sin embargo, el valor promedio del cociente de las nueve colonias de este patógeno fue muy cercano a uno, lo que sugiere una relación proporcional entre la incidencia y la severidad para este patógeno. Por el contrario, el cociente severidad/ incidencia de *P. capsici* muestra valores mayores a 1.0 en todas las colonias evaluadas (Figura 3), indicativo de que el grado de daño es más acelerado aun con menores valores de incidencia. En el caso de *R. solani* el valor del cociente fue similar al descrito para *F. oxysporum*.

**Interacción en infecciones múltiples.** El proceso infeccioso después de la inoculación se aceleró tanto en infecciones simples como combinadas, al manifestarse los síntomas tres días después de la inoculación (ddi) (Figura 4). Cinco ddi todas las plantas infectadas con *P. capsici* murieron (Figura 5). Resultados similares en *Capsicum* spp., ubican al patógeno como el más catastrófico a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012). Adicionalmente, información de Sanzón *et al.* (2012), describe necrosis de raíz a 24 h de la inoculación y muerte posterior a los cinco días, con evidencias de invasión de micelio y esporangios en la planta. Sin embargo, una vez que *P. capsici* se combina con otro u otros patógenos, aun sin diferencia significativa en algunos tratamientos (Figura 5), el daño disminuye, lo cual puede deberse a la competencia por nutrientes por parte de los patógenos (Abdullah *et al.*, 2017). Los valores de severidad promedio de tres días de medición (Figura 5), denotaron variación significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la aceleración del proceso infeccioso entre tratamientos, marcando también al inóculo individual de *P. capsici* como el más severo al acumular más rápido el daño.

En el caso de *F. oxysporum*, cinco ddi el hipocótilo de las plántulas mostraron manchas color ma-

represented higher levels of incidence than those of severity, but the average value of the quotient of the nine pathogen colonies was very close to one, which suggests a proportional relation between the pathogen's incidence and severity. In contrast, the severity/incidence quotient of *P. capsici* had values higher than 1.0 in all the evaluated colonies (Figure 3), which indicates that the rate of damage was faster even though the incidence was lower. In the case of *R. solani*, the quotient value was similar to that of *F. oxysporum*.

**Interaction in multiple infections.** The infectious process after inoculations, alone and combined, was faster and symptoms appeared three days after inoculation (dai) (Figure 4). At five dai, plants infected with *P. capsici* died (Figure 5). Similar results of *Capsicum* spp. indicate that this is the most lethal pathogen around the world (Lamour *et al.*, 2012). Additionally, reports by Sanzón *et al.* (2012) describe root necrosis 24 h after inoculation and plant death at day five, as well as evidence of plants being invaded by mycelium and sporangia. However, when *P. capsici* was combined with other pathogen(s), although no significant differences were found in some treatments (Figure 5), the level of damage was low, which could be due to pathogens competition for nutrients (Abdullah *et al.*, 2017). The average severity values from three-day measurements (Figure 5) showed a significant variation ( $p \leq 0.05$ ) in the infection process rate between treatments, which also indicated that the *P. capsici* inoculum alone was the most severe because of the faster damages accumulation.

In the case of *F. oxysporum*, seedlings developed brown spots on the hypocotyl five ddi, which, according to Sanzón *et al.* (2012), are caused by a higher accumulation of polyphenols in the stem tissue that causes the cells in contact to die. Cell wall degradation could be due to activity of lytic enzymes that are produced by the pathogens (Feng *et al.*, 2010).

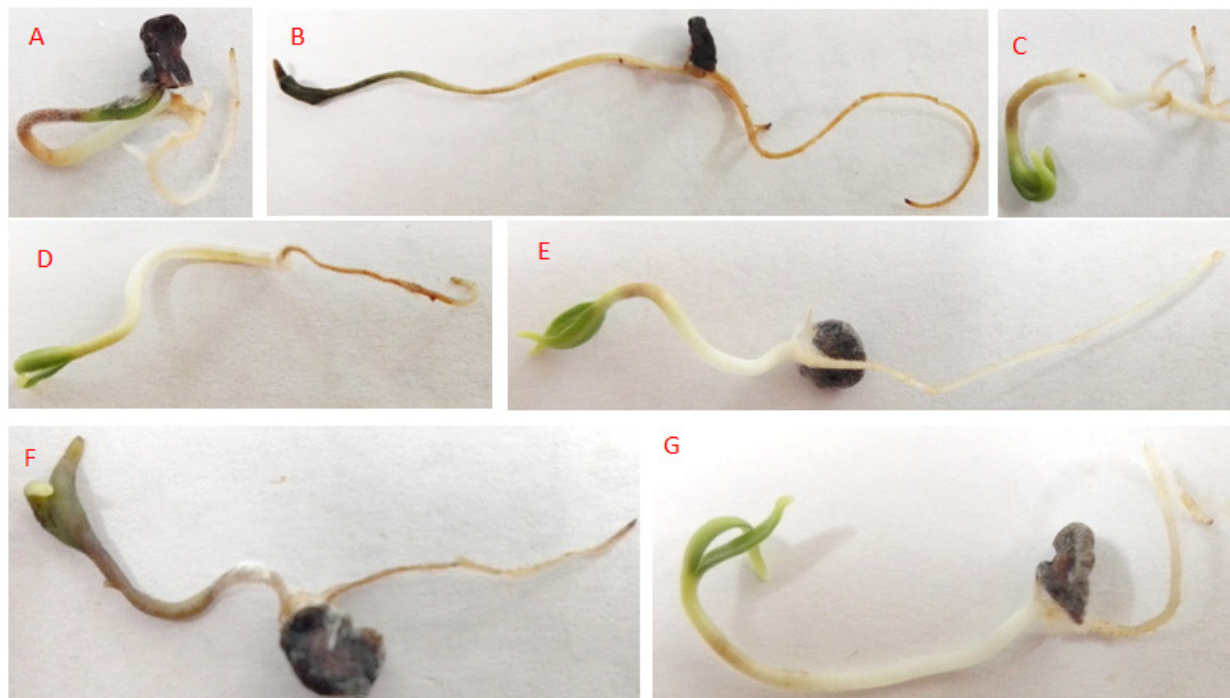


Figura 4. Daños ocasionados en *C. pubescens* cinco días por: A) *F. oxysporum*, B) *P. capsici*, C) *R. solani*, D) *P. capsici* + *R. solani*, E) *F. oxysporum* + *R. solani*, F) *P. capsici* + *F. oxysporum* y G) *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*.  
Figure 4. Damage caused in *C. pubescens* five days by: A) *F. oxysporum*, B) *P. capsici*, C) *R. solani*, D) *P. capsici* + *R. solani*, E) *F. oxysporum* + *R. solani*, F) *P. capsici* + *F. oxysporum* and G) *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*.

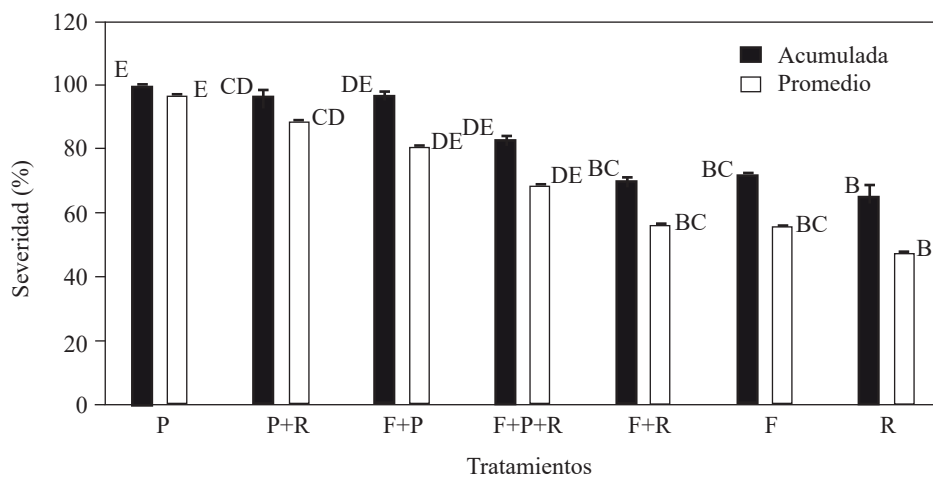


Figura 5. Severidad acumulada y promedio de organismos asociados con acción individual o combinada en plantas de *C. pubescens* 5 días después de la inoculación. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* y R= *R. solani*. Barras de error corresponden al error estándar. Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ).

Figure 5. Accumulated and average severity of associated organisms alone and combined in *C. pubescens* plants, 5 days after inoculation. P= *P. capsici*, P+R= *P. capsici* + *R. solani*, F+P= *F. oxysporum* + *P. capsici*, F+P+R= *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani*, F= *F. oxysporum* and R= *R. solani*. The error bars correspond to the standard error. Columns with the same letter are not statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

rrón, las cuales de acuerdo a Sanzón *et al.* (2012), se deben a la mayor acumulación de polifenoles en tejido del tallo, que ocasionan que las células en contacto mueran. La degradación de las paredes celulares posiblemente se debe a la actividad de enzimas líticas producidas por los patógenos (Feng *et al.*, 2010).

En la combinación *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* se observó una interacción de coinfección, donde la patogenicidad se redujo con respecto a *P. capsici* individual (Figura 5). En este complejo de interacción la respuesta provocada por un patógeno modificó la presencia del otro. Esta interacción compleja, tiende a alterar el curso de la enfermedad, ya que los patógenos coexistentes entran en competencia por crecimiento y por los nutrimentos en el mismo huésped, y la nutrición subóptima conduce a la competencia por la cual algunas especies pueden dominar (Abdullah *et al.*, 2017). No obstante, la gravedad y el tipo de competencia se determinan por el consumo de nutrimentos a lo largo del tiempo (Chesson, 2000).

En la interacción *F. oxysporum* + *R. solani*, la patogenicidad fue similar a la correspondiente del inóculo individual *F. oxysporum* y ligeramente mayor a la de *R. solani* (Figura 5), lo que sugiere que entre estos dos patógenos la presencia de uno en términos generales no altera la presencia del otro. A este respecto Alizon *et al.* (2013), señalan que existen una amplia variedad de respuestas en las combinaciones de patógenos en un huésped determinado, las cuales tiene que ver con aspectos evolutivos y ecológicos entre ambas partes.

**Interacción patógenos-genotipo.** Los síntomas en las plantas inoculadas con patógenos individuales y combinados se observaron 15 ddi. Plantas con daños de *P. capsici* mostraron flacidez en la parte aérea y lesiones necróticas en la parte interna y externa de la corona del tallo, así como radícu-

When *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* were combined, a co-infection interaction occurred where the pathogenicity was lower compared to that of the infection produced by *P. capsici* alone (Figure 5). In this interaction complex, the response elicited by one pathogen may be modified in the presence of another pathogen. This complex interaction tends to alter the course of the disease because the co-existing pathogens compete for growth and nutrients in the same host, and suboptimal nutrition leads to a competition whereby some species may dominate (Abdullah *et al.*, 2017). However, the severity and type of competition are determined by nutrient consumption over time (Chesson, 2000).

In the interaction *F. oxysporum* + *R. solani*, the pathogenicity was similar to that of *F. oxysporum* alone, and slightly higher to that of *R. solani* (Figure 5), which in general terms suggests that when both pathogens are combined, the presence of one of them does not alter the presence of the other. To this regard, Alizon *et al.* (2013), pointed out that, when the pathogens are combined, there is a wide range of responses from a determined host that have to do with evolutive and ecological aspects from both parts.

**Pathogens-genotype interaction.** The symptoms in plants inoculated with pathogens, alone and combined, appeared 15 dai. Plants infected with *P. capsici* showed looseness on the aerial part, necrotic lesions on the internal and external part of the stem crown, and necrotic radicle. Seedlings infected with *R. solani* showed chlorosis on the aerial part and necrotic roots; when the damage was severe, there was radicle strangulation; González (2008) mentioned non-compact rot with epidermis detachment. Seedlings inoculated with *F. oxysporum* showed chlorosis and, sometimes, curly foliage and necrotic radicle. Seedlings inoculated with *F. oxysporum* + *P. capsici* showed

la necrótica. Plántulas con daño por *R. solani* presentaron clorosis en la parte aérea y necrosis en raíz; en daño más avanzado la radícula presentó estrangulamiento, González (2008), menciona una pudrición no compacta con desprendimiento de epidermis. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron clorosis y en ocasiones rizados en el follaje y necrosis de la radícula. Las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* mostraron clorosis foliar y marchitez, así como necrosis en corona del tallo y radícula.

En plántulas inoculadas con *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* se observó clorosis en hojas, corona del tallo y radícula necróticas. De acuerdo a Velásquez-Valle *et al.* (2001) el síntoma inicial más evidente es una ligera flacidez foliar, que es más notable al avanzar el día, así como un ligero amarillamiento del follaje. Estos síntomas se asociaron con la podredumbre de la raíz y ablandamiento de las puntas de las raíces, lesiones de la raíz que varían en tamaño y color, de rojizo a marrón y negro, recorte de la raíz y pudrición (Hamon *et al.*, 2011). En daño por *F. oxysporum* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre genotipos, con variación del 0 a 70 % entre el menor y el mayor valor respectivamente, donde el genotipo M8 mostró resistencia y el genotipo M9 tolerancia a dicho patógeno (Cuadro 2). En plántulas inoculadas con *R. solani* se observaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), con valores mínimo de 0 % en M8 y máximo de 76 % en M15. En inoculación con *P. capsici* hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), con variación en la susceptibilidad del 81 al 95 % entre M8 y M7 respectivamente. En las combinaciones de patógenos, los intervalos entre valores máximo y mínimo disminuyeron. En la combinación *F. oxysporum* + *P.capsici* con diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), los valores máximo y mínimo fueron de 67 % en M8 y 93 % en M2; y en la combinación *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R.*

foliar chlorosis and wilt, as well as necrotic stem and radicle.

Seedlings inoculated with *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* showed chlorotic leaves and stem crown, and necrotic radicle. According to Velásquez-Valle *et al.* (2001), the earliest evident symptom was a slight foliar looseness that was more visible as the day went on, as well as a slight yellowing of foliage. These symptoms were associated with root rot, softening of roots tip, root lesions that varied in size and color (from reddish to brown and black) and short and rotten root (Hamon *et al.*, 2011).

In infections caused by *F. oxysporum*, there were highly significant differences ( $P \leq 0.01$ ) between genotypes with 0-70% variation between the lowest and the highest value, respectively, where the M8 genotype showed resistance, and the M9 genotype showed tolerance to the pathogen (Table 2). In seedlings inoculated with *R. solani* there were highly significant differences ( $P \leq 0.01$ ), with minimum values of 0 % for M8 and maximum values of 76 % for M15. When inoculated with *P. capsici*, significant differences ( $P \leq 0.05$ ) were observed, with 81-95 % variation in susceptibility between M8 and M7, respectively. In pathogen combinations, the intervals between maximum and minimum values were lower. In combinations of *F. oxysporum* + *P.capsici* with significant differences ( $P \leq 0.05$ ), the maximum and minimum values were 67 % for M8 and 93% for M2; and the combination *F. oxysporum* + *P.capsici* + *R. solani* with highly significant differences ( $P \leq 0.01$ ), the minimum and maximum values were 41% for M8 and 95% for nine genotypes (Table 2). The M8 genotype had the lowest level of wilt susceptibility and also showed other distinctive phenotypic differences compared to the rest of the genotypes analyzed (non-reported data), such as dense ramification and small fruits that are characteristic of rustic materials.

**Cuadro 2. Susceptibilidad de 16 genotipos de chile manzano a daño por marchitez.**  
**Table 2. Susceptibility to wilt damage in 16 manzano pepper genotypes.**

| Genotipos            | Susceptibilidad <sup>x</sup> |        |         |        |       |
|----------------------|------------------------------|--------|---------|--------|-------|
|                      | F                            | P      | R       | F*P    | F*P*R |
| M8                   | 0 a                          | 81 a   | 0 a     | 67 a   | 41 a  |
| M9                   | 29 b                         | 91 b   | 38 b    | 90 b   | 81 bc |
| M16                  | 48 c                         | 95 b   | 48 bc   | 90 b   | 95 c  |
| M15                  | 48 c                         | 95 b   | 76 e    | 90 b   | 95 c  |
| M11                  | 48 c                         | 93 b   | 48 bc   | 91 b   | 95 c  |
| M12                  | 48 c                         | 95 b   | 67 cde  | 85 b   | 83 bc |
| M10                  | 48 c                         | 95 b   | 48 bc   | 90 b   | 95 c  |
| M3                   | 48 c                         | 93 b   | 48 bc   | 90 b   | 95 c  |
| M4                   | 48 c                         | 95 b   | 48 bc   | 90 b   | 75 b  |
| M5                   | 48 c                         | 95 b   | 48 bcde | 90 b   | 93 c  |
| M6                   | 48 c                         | 95 b   | 73 e    | 85 b   | 90 bc |
| M7                   | 48 c                         | 95 b   | 52 bcd  | 90 b   | 95 c  |
| M13                  | 57 c                         | 95 b   | 61 cde  | 90 b   | 95 c  |
| M2                   | 57 c                         | 95 b   | 69 de   | 93 b   | 95 c  |
| M14                  | 70 d                         | 95 b   | 70 de   | 90 b   | 95 c  |
| M1                   | 70 d                         | 93 b   | 66 cde  | 90 b   | 95 c  |
| p-valor <sup>z</sup> | 0.0001                       | 0.0329 | 0.0001  | 0.0300 | 0.001 |

<sup>x</sup>F= *Fusarium oxysporum*; P= *Phytophthora capsici*; R= *Rhizoctonia solani*; F\*P= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*; F\*P\*R= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*+ *Rhizoctonia solani*. Medias con letras distintas son significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ). <sup>z</sup>Probabilidad estadística / <sup>x</sup>F= *Fusarium oxysporum*; P= *Phytophthora capsici*; R= *Rhizoctonia solani*; F\*P= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*; F\*P\*R= *Fusarium oxysporum*+ *Phytophthora capsici*+ *Rhizoctonia solani*. Medians with different letters are significantly different, according to Duncan's test  $P \leq 0.05$ ). <sup>z</sup>Statistical probability.

*solani*, con diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), los valores mínimo y máximo fueron de 41 % en M8 y 95 % en nueve genotipos (Cuadro 2). El genotipo M8 que fue el que mostró menor susceptibilidad al daño por marchitez, también muestra otras diferencias fenotípicas distintivas de los demás genotipos analizados (datos no reportados), como ramificación densa y frutos pequeños, característicos de materiales rústicos.

El genotipo M8 y potencialmente el M9, ambos como los menos susceptibles a los daños por marchitez representan una potencial alternativa para introducir la resistencia observada en esta investigación a genotipos comerciales como el M3, el cual es el más cultivado en la región. Además, la respuesta diferencial de algunos de los genotipos de

The M8 genotype, and likely, the M9 genotype, were both the least susceptible to wilt damage and can be a potential alternative for introducing the observed resistance in this study to commercial genotypes, such as M3, the most cultivated in the region. Moreover, the differential response of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* to some of the *C. pubescens* genotypes analyzed suggests the existence of different resistance mechanisms (Anaya-López, 2011).

## CONCLUSIONS

Three organisms were detected that cause manzano pepper wilt in the southern zone of the

*C. pubescens* analizados a *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* y sus combinaciones, sugieren variación en los mecanismos de defensa (Anaya-López, 2011).

## CONCLUSIONES

Se detectaron tres organismos causales de la marchitez de chile manzano del sur de México; de ellos *Fusarium oxysporum* fue el más frecuente, seguido por *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

La identificación molecular permitió identidad de 88 % de los fragmentos amplificados de *F. oxysporum* con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2. *P. capsici* tuvo identidad de 83 % con *P. capsici* LT1534, versión 11, y *R. solani* alcanzó identidad de 90% con el grupo anatómico 3 (AG-3).

De los tres patógenos encontrados, *Phytophthora capsici* es el que causa la mayor severidad en daño por marchitez en la región sur del Estado de México, aunque *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* también causan daños en la planta.

El genotipo M8 fue resistente a *F. oxysporum* y *R. solani*, y el genotipo M9 podría ser tolerante a *F. oxysporum*. El genotipo M8 fue tolerante a *P. capsici* y a la inoculación individual y en mezcla de los tres patógenos, por lo que podría representar un genotipo potencial para estudios sobre fuentes de genes de tolerancia útiles en programas de mejoramiento genético.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por la beca escolar otorgada a Alma Janeth Vallejo Gutiérrez para estudios de maestría.

State of Mexico, from which *Fusarium oxysporum* was the most frequently present, followed by *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*.

The molecular identification showed 88% identity of the amplified fragments of *F. oxysporum* using *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2. *P. capsici* showed 83% identity with *P. capsici* LT1534, version 11, and *R. solani* had 90% identity with the anastomic group 3 (AG-3).

From the three pathogens identified, *Phytophthora capsici* causes the highest level of wilt severity in the southern region of the State of Mexico, although *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* also cause plant damage.

The M8 genotype was resistant to *F. oxysporum* and *R. solani*, and the M9 genotype could be tolerant to *F. oxysporum*. The M8 genotype was tolerant to *P. capsici* and to inoculation with the three pathogens, alone and combined, so it could be a potential genotype for studies about tolerance genes that could be used in genetic improvement programs.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) for the scholarship granted to Alma Janeth Vallejo Gutiérrez for her master's studies.

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

LITERATURA CITADA

Abawi SG and Pastor-Corrales CMA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 114p.

- Abdullah AS, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibber MR, Hamblin J and Zerihun A. 2017. Host-Multi-Pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 8:1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Alizon S, de Roode JC and Michalakis Y. 2013. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters* 16:556-67. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>
- Anaya-López JL, González-Chavira MM, Pineda-Villordo E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V y Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chiles resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:373-383. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n3/v2n3a6.pdf>
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, García-Espinosa R, Osada-Kawasoe S y Valenzuela-Ureta JG. 2001. Comparación de técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:197-202. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219210.pdf>
- Arias AB, Mejía CJ, Estrada MI, Arriaga RM y García VLM. 2017. Caracterización morfológica de híbridos de chile manzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:825-836. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/2631/263152088006/>
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. *Commonwealt Mycological Institute*. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Carrizo GC, Barfuss HJM, Sehr EM, Barboza GE, Rosabelle S, Eduardo A and Ehrenderfer F. 2016. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118:35-51. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245634>
- Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:343-366. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.343>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *The Journal of Agricultural Science* 131(2):245-249. <https://doi.org/10.1017/S0021859698215796>
- Feng B, Li P, Wang H and Zhang X. 2010. Functional analysis of pepme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis* 49:23-31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.03.004>
- Fernández ER, Trapero A y Domínguez J. 2010. Experimentación en agricultura. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España. 350 p.
- Galleghy ME and Honh Ch. 2008. *Phytophthora capsici*. In identifying species by morphology and ADN fingerprints. APS PRESS. St. Paul, Minnesota, Estados Unidos de América. 165 p.
- González GM. 2008. Reseña de "Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*". *Fitosanidad* 12:147-159. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209115572003.pdf>
- González-Pérez S, Garces-Claver A, Mallor C, Sáenz de Miera LE, Fayos O, Pomar F, Merino F and Silvar C. 2014. New insights into *Capsicum* spp. relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *Plos one* 9:e116276. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278865/pdf/pone.0116276.pdf>
- Guigón-López C y González-González PA. 2001. Estudio regional de la enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19:49-56. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61219107.pdf>
- Guzmán-Plazola RA, Fajardo-Franco ML, García-Espinosa R and Cadena-Hinojosa MA. 2011. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. *Agrociencia* 45:363-378. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n3/v45n3a9.pdf>
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, Mcgee RJ, Le Goff IL, L'anthoëne V, Esnault R and Pilet-Nayel ML. 2011. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple field and controlled environments from France and the United States. *Theoretical and Applied Genetics* 123:261-281. DOI: 10.1007/s00122-011-1582-z
- Herrera I y Laurentin H. 2012. Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*). *Revista Científica UDO Agrícola* 12:639-643. Disponible en línea: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12072>
- Kannwischer ME and Mitchell DJ. 1978. The Influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Ecology and Epidemiology* 68: 1760-1765. Disponible en línea en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n12_1760.pdf
- Kousik ChS, Donahoo RS and Hassell R. 2012. Resistance in watermelon rootstocks to crown rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Protection*. 39: 18-25. Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219412000907>
- Lamour HK, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Leonian LH. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1972Articles/Phyto62n01_20.PDF
- Leslie JF and Sumerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. First edition. State Avenue, Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing. 388 p. Disponible en línea: <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- López AGF. 1984. Manejo de Hongos Fitopatógenos. Departamento de Enseñanza e Investigación en parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 106-115.

- Lozano AN, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta ME, Aguilar RVH y Ayala EV. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztitlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:31-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61240687003.pdf>
- Martínez GE, Albarracín N, Arcia A, Subero L y Albarracín M. 1996. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Tropical* 46:265-273. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/40647>
- Martínez EI. 2016. Caracterización morfológica y molecular de 15 colectas de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) de la región sur del Estado de México. Tesis de Maestría. Centro Universitario UAEM Tenancingo, México. P.43-56. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/40647>
- Nelson PE, Tousson TA and Marasa WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. Pennsylvania, USA. 193 p.
- Nora S, Albaladejo RG, González MSC, Robledo-Arnuncio JJ y Aparicio A. 2011. Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas* 20:35-45. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54022121004>
- Pickersgill B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100: 925-940. <http://doi:10.1093/aob/mcm193>
- Ruiz de GJI, Prohens J y Tierno R. 2016. Las variedades locales en la mejora genética de plantas. Vitoria-Gasteiz: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. País Vasco, España. 480 p.
- Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI y Zavaleta ME. 2012. Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:66-71. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a6.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Producción nacional de chile alcanza 2.3 millones de toneladas. <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/produccion-nacional-de-chile-alcanza-2-3-millones-de-toneladas> (consulta, junio 2018).
- Segura LS, Zavala RD, Equihua CC, Andrés AJ y Yopez TE. 2009. Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(3): 297-305. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rchsh/v15n3/v15n3a11.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. Relación de huertos de chile manzano registrados para exportación del Estado de México a los Estados Unidos de América con tratamiento de irradiación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/379049/CHILE_MANZANO_EDO_MEX_08_23__2018.pdf (consulta, septiembre 2018).
- Schubert S, Neubert A, Schierholt A, Sümer A and Zörb C. 2009. Development of salt-resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant Science*. 177(3): 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.011>
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavia, SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum Annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente Causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27: 134-147. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61212195006>
- Singleton L, Mihail JD and Rush MCh. 1992. Methods for research on soil borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 264 p.
- Uc-Arguelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V and 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. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n2/2007-8080-rmfi-35-02-00263.pdf>
- United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (USDA-ARS). 2011. Grin species records of Capsicum. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory. <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-barc/beltsville-agricultural-research-center/national-germplasm-resources-laboratory/> (consulta, febrero 2018)
- Vásquez LA, Tlapa BB, Yáñez MMJ, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (2): 127 – 134. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61011222007>
- 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* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219207>
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultures fungi and key to species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p. Disponible en línea: <http://www.eagriculture.biz/download/Soil/Pictorial%20Atlas%20of%20Soil%20and%20Seed%20Fungi%20%20Morphologies%20of%20Cultured%20Fungi%20and%20Key%20to%20Species.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. *PCR Protocols*. Academic Press. San Diego, CA, USA. P 315-322. Disponible en línea: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhang YL, Jia QL, Li DW, Wang JE, Yin YX and Gong H. 2013. Characteristic of the pepper CaRGA2 gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 8985-9004. <https://doi.org/10.3390/ijms14058985>

Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray-spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico

Epidemiología regional aplicada a la caracterización inductiva y pronóstico de la mancha gris del agave azul (*Cercospora agavicola*) en Jalisco, México

Juan José Coria-Contreras, Gustavo Mora-Aguilera*, María de Jesús Yáñez-Morales, Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, C. P. 56230; Gerardo Acevedo-Sánchez, Baldemar Santana-Peñaloza, Coral Mendoza-Ramos, Laura Jiménez-González, Verónica Inés Martínez-Bustamante, Dulce Cecilia García-Martínez, Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LAN-REF); Ramón Rubio-Cortés, Área de Investigación, Casa Sauza, Francisco Javier Sauza #80, Tequila, Jalisco, C.P. 46400. *Autor para correspondencia: morag@colpos.mx

Recibido: 29 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 21 de Diciembre, 2018.

Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yáñez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2018. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(1): 71-94.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1809-4

Primera publicación DOI: 31 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 31, 2018.

Resumen. *Cercospora agavicola*, agente causal de la mancha gris del agave azul (*Agave tequilana*), es un hongo reglamentado bajo control oficial en estados bajo Denominación de Origen del Tequila (DOT). Este trabajo se desarrolló en Jalisco,

Abstract. *Cercospora agavicola*, causal agent of the gray spot of blue agave (*Agave tequilana*), is a regulated fungus under official control in states under the Denomination of Origin of Tequila (DOT). This work was carried out in Jalisco, Mexico, the main DOT region, to determine the spatial-temporal epidemic inductivity of the fungus and to develop stochastic models to forecast the gray spot in order to support regional preventive programs. Monthly, from October 2016 to December 2017 the severity, incidence and number of diseased plants were evaluated in 41 plots established in commercial agave plantations of 3-4 years of age selected with weighted risk criteria in Los Altos (20), Valleys (11) and South (10). The regional epidemic inductivity of *C. agavicola* was heterogeneous with a greater risk for at least nine counties of Los Altos. However, low epidemic rates (0.0008-0.006 units week⁻¹), strong restriction

México, principal región DOT, para determinar la inductividad epidémica espacio-temporal del hongo y desarrollar modelos estocásticos de pronóstico de la mancha gris con el fin de sustentar acciones preventivas regionales. De octubre 2016 a diciembre 2017 se evaluó mensualmente la severidad, incidencia y número de plantas enfermas en 41 parcelas establecidas en plantaciones comerciales de agave de 3-4 años de edad seleccionadas con criterios ponderados de riesgo en Los Altos (20), Valles (11) y Sur (10). La inductividad epidémica regional de *C. agavicola* fue heterogénea con mayor riesgo para al menos nueve municipios de Los Altos. Sin embargo, bajas tasas epidémicas (0.0008-0.006 unidades semana⁻¹), fuerte restricción de contagio (1-4 plantas), reducido incremento anual de incidencia (0-32 plantas/0.5 ha) y nula captura de esporas evidenciaron la baja aptitud parasítica y epidémica del hongo. Consecuentemente, se encontró limitada capacidad predictiva aun con los mejores modelos generados (R^2_{adj} 0.51-0.60). Las horas favorables (HFav) de enero-abril, respecto a la infección, fue consistente entre modelos por lo que puede integrarse como algoritmo preventivo en SIVEA (www.sivea.org.mx). Las pérdidas regionales establecidas se estimaron entre 237 mil dólares americanos y 98.01 MDD. La cercosporina, toxina asociada al género *Cercospora*, puede estar implicada en el progreso temporal lineal atípico y debe integrarse en futuras investigaciones.

Palabras clave: Pérdidas, dron, tóxina, Weibull, NCBI, ABCPE, SIVEA

México ostenta la Denominación de Origen del Tequila (DOT) conformada por 181 municipios de los estados de Guanajuato (7), Michoacán (30), Nayarit (8), Tamaulipas (11) y la totalidad de Jalisco (125). La DOT representa el 73.4% (81,053 ha) del

spread (1-4 plants), reduced annual increment of incidence (0-32 plants / 0.5 ha) and no spore capture evidenced the low parasitic fitness and reduced fungus epidemic potential. Consequently, limited predictive capacity was found even with the best goodness of fit models (R^2_{adj} 0.51-0.60). The favorable hours (HFav) of January-April, with respect to infection, was consistent among models, so it can be used as preventive algorithm in SIVEA (www.sivea.org.mx). The regional losses were estimated between 237 thousand US dollars and 98.01 MDD. Cercosporin, a toxin associated with *Cercospora* genus, may be involved in atypical linear temporal progress and should be integrated in future research.

Key words: Losses, drone, toxin, Weibull, NCBI, AUDPC, SIVEA

Mexico holds the Denomination of Origin of Tequila (DOT) composed by 181 municipalities of the states of Guanajuato (7), Michoacán (30), Nayarit (8), Tamaulipas (11) and Jalisco in its entirety (125). The DOT represents 73.4% (81,053 ha) of the nationally grown blue agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), Jalisco being the most representative with 64,499 ha (SIAP 2018). Throughout the tequila industry, the DOT directly favors the regional economy by generating estimably 1,600 million of Mexican pesos per year and represents the economic support of 70,000 families (SIAP 2015). The implications of maintaining the DOT agave region, legally defined in time and space, is multidimensional but it is substantiated on the challenge of guaranteeing productive sustainability and profitability with a long-termed resilient model.

From the decade of the '90s, the productive inventories of agave in Jalisco have been strongly

agave azul (*Agave tequilana* Weber var. Azul) cultivado a nivel nacional, siendo Jalisco el más representativo con 64,499 ha (SIAP 2018). La DOT, a través de la industria tequilera, genera de forma directa una derrama económica regional estimada en 1,600 millones de pesos anuales y representa el sustento de 70,000 familias (SIAP 2015). Las implicaciones de mantener la región DOT agave-ra, legalmente definida en el tiempo y espacio, es multidimensional pero se fundamenta en el reto de garantizar la sustentabilidad productiva y rentabilidad bajo un modelo resiliente a largo plazo.

A partir de la década de los 90's, los inventarios productivos del agave en Jalisco han sido fuertemente afectados por factores fitosanitarios entre los que destacan el picudo (*Scyphophorus acupunctatus*), la marchitez por *Fusarium* spp, y la mancha gris causada por *Cercospora agavicola*. Ante los recurrentes desabastos de planta de siembra y la tendencia creciente del precio de la piña (tallo del agave) se ha incrementado el volumen de hijuelos movilizados dentro y entre estados acrecentando los riesgos fitosanitarios por lo que es importante fortalecer el monitoreo y muestreo en el marco de la Campaña Contra Plagas Reglamentadas del Agave (SENASICA, 2017). Así mismo, es importante desarrollar algoritmos de prevención y control para su integración en SIVEA (Sistema Integral de Vigilancia Epidemiológica del Agave), un sistema fitosanitario web operado por el SENASICA-DGSV (www.sivea.org.mx). Actualmente, una de las preocupaciones de productores es la dificultad del control de *C. agavicola*, por lo que este trabajo se enfocó a estudiar la mancha gris en Jalisco, estado en el cual históricamente se han reportado daños en Los Altos (Acatic, San Juan de los Lagos, Tepatitlán y Yahualica), Valles (Amatitán, Ahualulco, Arenal, Magdalena, San Juanito de Escobedo y Tequila), Sur (Autlán, El Grullo, El Limón y Unión de Tula) y Sierra Occidental (Atenguillo,

affected by phytosanitary factors amongst which the weevil (*Scyphophorus acupunctatus*), the agave wilt caused by *Fusarium* spp, and the gray spot caused by *Cercospora agavicola* stand out. Given the recurrent shortages of sowing plants and the increase tendency of the pineapple's price (agave stem) the number of mobilized shoots (hijuelo in spanish) within and between states has increased, rising some major phytosanitary risks. Therefore it is important to strengthen and improve the control and sampling within the framework of the Campaign Against Regulated Pests of the Agave (SENASICA, 2017). Likewise, it is important to develop new preventive and control management algorithms for their incorporation into SIVEA (Comprehensive Epidemiological Surveillance System of the Agave), a phytosanitary web system operated by SENASICA-DGSV (www.sivea.org.mx). At present one of the main concerns of producers is the difficulty of *C. agavicola* control, therefore this project focused on studying the gray spot in Jalisco, a state in which plant damage has historically been reported in Los Altos (Acatic, San Juan de Los Lagos, Tepatitlán and Yahualica), Valleys (Amatitán, Ahualulco, Arenal, Magdalena, San Juanito de Escobedo and Tequila), Sur (Autlán, El Grullo, El Limón and Unión de Tula) and Sierra Occidental (Atenguillo, Mascota and Mixtlán) (Rubio 2007). The gray spot was first reported in 2003 in Pénjamo, Guanajuato and in 2005 the causal agent was identified as *C. agavicola* (Ayala *et al.*, 2005). The fungus' infection apparently occurs within October and March under favorable conditions of relative humidity $\geq 80\%$ and average temperatures between 15 and 22 ° C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016; Valencia 2011; Rubio 2007). The primary infection causes black oval lesions of up to 1-3 cm commonly found in the middle to upper third of non-expanded leaves of the plant's head. The disease develops rapidly producing

Mascota y Mixtlán) (Rubio, 2007). La mancha gris se reportó en 2003 en Pénjamo, Guanajuato y en 2005 se identificó al agente causal como *C. agavicola* (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). La infección del hongo aparentemente ocurre en los periodos de octubre a marzo en condiciones favorables de humedad relativa $\geq 80\%$ y temperatura media entre 15 y 22 °C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016; Valencia, 2011; Rubio, 2007). La infección primaria causa lesiones negras, ovaladas de hasta 1-3 cm, generalmente en el tercio medio a superior de hojas no expandidas del cogollo. La enfermedad desarrolla rápidamente produciendo manchas coalescentes, deprimidas grisáceas y termina con colapso del cogollo y muerte de planta.

Aunque no se ha comprobado la implicación de cercosporina en el síntoma, toxina no específica producida por *Cercospora* spp, activada por luz y temperatura (Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989), este estudio se planteó bajo la premisa de que es posible pronosticar el proceso infeccioso primario, independiente del efecto de dicha toxina; así mismo, se propuso caracterizar atributos espacio-temporales a nivel parcelario-región con el fin de comprender procesos de dispersión, prevalencia e intensidad epidémica aplicables a la generación de alertas tempranas para fortalecer el manejo preventivo de la mancha gris del agave.

MATERIALES Y MÉTODOS

Red de monitoreo e inductividad epidémica regional. De octubre 2016 a diciembre 2017, se estableció y evaluó una red de monitoreo de 41 parcelas distribuidas en predios comerciales de agave de 3-4 años en Los Altos (20), Valles (11) y Sur (10) del estado de Jalisco. Las parcelas se seleccionaron con base a un análisis de inductividad epidémica regional, para lo cual se emplearon datos de ocu-

coalescing, depressed grayish spots and ends with the collapse of the head and death of the plant.

Although the implication of *cercosporin* in the symptom has not been confirmed a non-specific toxin produced by *Cercospora* spp, activated by light and temperature (Daub and Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989), this study was based upon the premise that it is possible to predict the primary infectious process independent of the effect of said toxin. Likewise, it was proposed to characterize spatio-temporal attributes at the plot-region level in order to understand processes of dispersion, prevalence and epidemic intensity applicable to the generation of an early warning system to strengthen the preventive management of the agave gray spot.

MATERIALS AND METHODS

Network monitoring and regional epidemiological inductivity. From October 2016 to December 2017 a monitoring network of 41 plots distributed in commercial agave plots of 3-4 years in Los Altos (20), Valley(11) and South (10) in the state of Jalisco was established and evaluated. The plots were selected based on an analysis of regional epidemic inductivity, for which data from the occurrence of focus points of infestation were used. These were generated during 2012-2015 by the Regulated Pests Campaign of the Agave (www.sivea.org.mx) cultivated surface (SIAP, 2015), weather (CONAGUA 2015) and edaphic factors. The Reg-N methodology was applied to the incorporated data matrix to generate a multivariate inductive epidemic indicator and to select plots that maximize the regional epidemic variability of the disease (Table 1) (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Aguilera and Acevedo-Sánchez 2016). The epidemic indicator was used to generate a regional inductivity map using ArcMap from ArcGis v10.3.

rrencia de focos de infestación generados durante 2012-2015 por la Campaña de Plagas Reglamentadas del Agave (www.sivea.org.mx), superficie cultivada (SIAP, 2015), clima (CONAGUA 2015) y factores edáficos. Se empleó la metodología RegN a la matriz integrada de datos para generar un indicador epidémico multivariado de inductividad y para seleccionar parcelas que maximicen la variabilidad epidémica regional de la enfermedad (Cuadro 1) (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera y Acevedo-Sánchez, 2016). El indicador epidémico se usó para generar un mapa de inductividad regional mediante ArcMap de ArcGis v10.3. Por predio comercial se seleccionó una parcela con una población de plantas de aproximadamente 0.5 ha; 25 parcelas tuvieron un foco central de 1-94 plantas enfermas con una severidad de macha gris entre 6-65%. Este foco constituyó el Y_0 o intensidad inicial de epidemia. En 16 parcelas se tuvieron únicamente poblaciones de plantas aparentemente sanas. Al centro de la parcela se colocó una trampa TIDE modificada con un dispositivo pasivo de impacto y deposición (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). En cada trampa se colocaron tres portaobjetos con cinta adhesiva doble cara, dos el dispositivo de deposición y uno en la de impacto. En el mismo soporte de la trampa se instaló un *datalogger* Hobo® Pro V2 configurado a intervalos de 30 minutos con el propósito de relacionar cambios de intensidad de enfermedad con variables de temperatura y humedad relativa ambiental. Quincenalmente se colectaron los portaobjetos de trampas y se realizó la extracción *in situ* de datos climáticos.

Diagnóstico molecular de *C. agavicola*. Con el objetivo de confirmar la asociación del agente causal con la mancha gris se colectó en 13 parcelas de monitoreo muestras vegetales con lesiones típicas de la enfermedad. En laboratorio, el tejido se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5% durante dos

A plot with a plant population of approximately 0.5 ha was selected per commercial property amongst which 25 plots had a focal point of 1-94 infected plants with gray spot severity between 6-65%. This focal point constituted the Y_0 or initial epidemic intensity. In 16 plots there were only apparent healthy plant populations. At the center of each plot, a modified TIDE trap was placed with a device of passive impact and deposition (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). In each trap, three slides were placed with double-sided adhesive tape, two in the disposition device and one on the impact device. A Hobo® Pro V2 data logger configured at 30-minute intervals was installed in the trap support in order to relate changes in disease intensity with temperature and relative humidity variables. The trap slides were collected on a 15-days interval and *in situ* extraction of climatic data was conducted.

Molecular diagnosis of *C. Agavicola*. In order to confirm the relation between the gray spot and the disease-causing agent, plant samples with common disease lesions were collected in 13 monitoring plots. In the laboratory, the tissue was disinfested with 1.5% sodium hypochlorite for two minutes, rinsed 3 times with sterile water and incubated in a humid chamber at 24-28 °C alternating 12:12 h light:dark for 3 days. From the mycelial growth, the fungus was isolated and cultured in agave-agar medium (Ayala *et al.*, 2005). DNA extraction was performed by the modified AP method (Sambrook and Russel, 2001) and the ITS region 1-4 was amplified through PCR (White *et al.*, 1990). The PCR product was sent to Macrogen (Seoul Korea) for sequencing and the sequences identification was made through the web program Blast® *blastn suite* at NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Variables evaluation. The infected plants incidence and severity were evaluated monthly in

Cuadro 1. Localización de 41 parcelas de monitoreo en plantaciones comerciales de agave azul de 3-4 años de edad seleccionadas por criterio de inductividad epidémica para el estudio regional de la mancha gris, y condición inicial (Y_0) de ocurrencia de la enfermedad representado por número de plantas sintomáticas (P.enf) y severidad promedio de planta enferma (SProm) por parcela. Jalisco, México. 2016-2017.

Table 1. Location of 41 monitoring plots in commercial blue agave plantations of 3-4 years of age selected by criteria of epidemic inducibility for the regional study of gray spot, and initial condition (Y_0) of disease occurrence represented by the number of symptomatic plants (P.enf) and average severity of diseased plant (SProm) per plot. Jalisco, Mexico. 2016-2017.

| Región | Municipio | Latitud | Longitud | ID Plantación | P.enf (Y_0) ^x | SProm(Y_0) ^y |
|--------|-----------------|-----------|------------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
| Altos | Arandas | 20.6973 | -102.2572 | A-ARA-CP01 | 94 | 32.8 |
| | | 20.8508 | -102.1592 | A-ARA-CP04 | 1 | 100 |
| | | 20.7618 | -102.2936 | A-ARA-CP05 | 3 | 63.6 |
| | | 20.7624 | -102.3470 | A-ARA-CP06 | 7 | 31.4 |
| | | 20.6954 | -102.3241 | A-ARA-CP20 | 22 | 22.5 |
| | Jesús María | 20.6161 | -102.1381 | A-JM-CP02 | 12 | 58.5 |
| | | 20.6698 | -102.0802 | A-JM-CP03 | 0 | 0.0 |
| | | 20.5931 | -102.1582 | A-JM-CP19 | 4 | 57.2 |
| | Tepatitlán M. | 20.7891 | -102.5530 | A-TEP-CP08 | 0 | 0.0 |
| | | 20.8581 | -102.6558 | A-TEP-CP09 | 1 | 6.0 |
| | | 20.6605 | -102.6456 | A-TEP-CP14 | 0 | 0.0 |
| | Zapotlanejo | 20.5797 | -102.8915 | A-ZAP-CP10 | 1 | 85.0 |
| | Cerro Gordo | 20.6842 | -102.5042 | A-SICG-CP15 | 10 | 43.5 |
| | | 20.7505 | -102.4838 | A-SICG-CP07 | 18 | 61.1 |
| | Ocotlán | 20.4247 | -102.7568 | A-OCO-CP11 | 0 | 0.0 |
| | Atotonilco A. | 20.5151 | -102.6127 | A-ATO-CP12 | 2 | 85.0 |
| | Mextican | 21.2626 | -102.7186 | A-MEX-CP16 | 1 | 22.0 |
| | Yahualica G. G. | 21.1117 | -102.8675 | A-YAH-CP17 | 0 | 0.0 |
| | | 21.1674 | -102.8727 | A-YAH-CP18 | 2 | 2.0 |
| | Ayotlán | 20.5357 | -102.3696 | A-AYO-CP13 | 1 | 65.0 |
| Valles | Hostotipaquillo | 21.0404 | -104.1994 | V-HOS-CP01 | 3 | 42.6 |
| | | 20.9298 | -104.1078 | V-MAG-CP02 | 0 | 0.0 |
| | Magdalena | 20.8982 | -103.9450 | V-MAG-CP03 | 1 | 85 |
| | | 20.9674 | -104.0410 | V-AMA-CP11 | 0 | 0.0 |
| | Tequila | 20.9362 | -103.8726 | V-TEQ-CP04 | 0 | 0.0 |
| | Amatitán | 20.8589 | -103.7688 | V-AMA-CP05 | 0 | 0.0 |
| | | 20.8344 | -103.6795 | V-AMA-CP06 | 1 | 6.0 |
| | San Juanito E. | 20.7724 | -103.9958 | V-SJE-CP07 | 0 | 0.0 |
| | Ahualulco M. | 20.7388 | -103.9321 | V-AHU-CP08 | 0 | 0.0 |
| | Ameca | 20.5029 | -103.9862 | V-AME-CP09 | 1 | 2.0 |
| Cocula | 20.3672 | -103.8636 | V-COC-CP10 | 0 | 0.0 | |
| Sur | Tecolotlán | 20.1896 | -104.0236 | S-TEC-CP01 | 0 | 0.0 |
| | Juchitlán | 20.0756 | -104.1008 | S-JUC-CP02 | 0 | 0.0 |
| | Autlán de N. | 19.8322 | -104.3041 | S-AUT-CP03 | 0 | 0.0 |
| | Tuscacuesco | 19.7397 | -103.8802 | S-TUS-CP04 | 0 | 0.0 |
| | San Gabriel | 19.6659 | -103.8135 | S-SGA-CP05 | 4 | 56.0 |
| | San Andrés I. | 19.8257 | -103.5072 | S-GF-CP06 | 3 | 64 |
| | Teocuitatlán C. | 20.0920 | -103.4223 | S-TEO-CP07 | 5 | 39 |
| | | 20.1270 | -103.3524 | S-TEO-CP08 | 1 | 6 |
| | Zacoalco de T. | 20.2014 | -103.5321 | S-ZAC-CP09 | 14 | 35.2 |
| | Acatlán de J. | 20.4808 | -103.6357 | S-ACA-CP10 | 1 | 85 |

^xPenf=Número de plantas enfermas con mancha gris al seleccionar el sitio localizadas al centroide de parcela. / Penf = Number of diseased plants with gray spot when selecting the site located at the plot centroid.

^ySProm Y_0 = Severidad promedio en planta enferma al seleccionar el sitio / SProm Y_0 = Average severity of diseased plant when selecting the site.

minutos, se enjuagó 3 veces con agua estéril y se incubó en cámara húmeda a 24-28 °C alternando 12:12 h luz:oscuridad durante 3 días. A partir del crecimiento micelial se aisló y cultivó al hongo en medio Agave-agar (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). La extracción de DNA se realizó por el método AP modificado (Sambrook y Russel, 2001) y se amplificó por PCR la región ITS 1-4 (White *et al.*, 1990). El producto de PCR fue enviado a Macrogen (Seoul Corea) para su secuenciación. La identidad de las secuencias se realizó por medio del programa web Blast® *blastn suite* en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

VARIABLES DE EVALUACIÓN. En cada parcela se evaluó mensualmente la incidencia de plantas enfermas y la severidad en planta mediante una escala diagnóstica de 7 clases (0=sana, 1=2%, 2=6%, 3=22%, 4=65%, 5=85% y 6=100%) (Jiménez-González *et al.*, 2017). La evaluación se realizó siempre en las mismas en plantas para lo cual se seleccionaron y marcaron en un patrón sistemático discontinuo de 1x2 surcos y 1x3 plantas/surco, totalizando 273 plantas. El registro de las evaluaciones y su localización espacial se realizó directamente en App-SIVEA v1.1, una aplicación Android para telefonía móvil generada por COLPOS-LANREF (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). Los datos se enviaron por vía satelital a la plataforma SIVEA (www.sivea.org.mx) para la integración automática de la matriz de datos regional. Para el monitoreo aerobiológico se contabilizó el número de esporas en 7 cm² de cada portaobjeto por trampa.

Caracterización de epidemias, análisis espacial y temporal. Se caracterizó temporal y espacialmente un total de 41 epidemias inducidas por *C. agavicola*. Con base en un análisis gráfico exploratorio de parámetros epidémicos (Mora-Aguilera *et al.*, 1993) se seleccionaron 14 epidemias, ocho en

each plot throughout a diagrammatic scale of 7 classes (0 = healthy, 1 = 2%, 2 = 6%, 3 = 22%, 4 = 65%, 5 = 85% and 6 = 100%) (Jiménez-González *et al.*, 2017). The evaluation was solely conducted in the same plants, for which they were selected and marked in a discontinuous systematic pattern of 1x2 rows and 1x3 plants per row, with a total of 273 plants.

The evaluations record was made directly in App-SIVEA v1.1, an Android application for mobile phones developed by COLPOS-LANREF (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). The data was sent via satellite to the SIVEA platform (www.sivea.org.mx) for automatic incorporation of the regional data matrix. The number of spores in 7 cm² of each slide of the trap was counted in the aerobiological monitoring.

Characterization of epidemics, spatial and temporal analysis. A total of 41 epidemics induced by *C. agavicola* were temporally and spatially characterized. Based on an exploratory graphic analysis of epidemic parameters (Mora-Aguilera *et al.*, 1993), 14 epidemics were selected, eight in Los Altos, three in Valleys and three in the South for the estimation of regionally representative epidemic rates. For this purposes, the Weibull flexible model was used, which describes and adjusts epidemic curves of diverse form (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). For the model fit, data of plant severity and number of infected plants accumulated proportionally, divided by their respective maximum value accumulated per region was transformed in order to standardize different epidemics. The Weibull model, with two parameters was adjusted with the NLIN procedure of SAS® v9.4 through the equation $y = 1 - \exp(-t/b)^c$ where: y = severity or the number of infected plants in proportion, t = time, b = rate estimator parameter and c = shape parameter of the curve. Additionally, the area under the disease

Los Altos, tres en Valles y tres en Sur para la estimación de tasas epidémicas representativas regionalmente. Para este fin se empleó el modelo flexible Weibull, el cual describe y ajusta curvas epidémicas de forma diversa (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). Para el ajuste del modelo se realizó la transformación de los datos de severidad en planta y número de plantas enfermas acumuladas a proporción dividido entre su respectivo valor máximo acumulado por cada región con el propósito de estandarizar las diferentes epidemias. El modelo Weibull, con dos parámetros fue ajustado con el procedimiento NLIN de SAS® v9.4 mediante la ecuación $y = 1 - \exp(-t/b)^c$ donde: y = severidad o número de plantas enfermas en proporción, t = tiempo, b = parámetro estimador de tasa y c = parámetro de forma de la curva. Adicionalmente, se estimó el Área Bajo la Curva de Progreso de Enfermedad (ABCPE) con datos de severidad de planta enferma y con el número de plantas enfermas. La combinación aditiva se empleó como un estimador de índice de daño (ID). Para el análisis espacial se seleccionó la epidemia con mayor intensidad por cada región para analizar el comportamiento de contagio intraparcelario. Con las evaluaciones en Y_o (Nov-2016) y Y_{max} (pico de incremento absoluto máximo) (Dic-2017) se generaron mapas interpolados y se analizaron los semivariogramas geostadísticos con el programa Surfer® v10.6 (Golden software, EUA). Adicionalmente, a través del programa MorLloyd versión 1.0 desarrollado en MS Excel (Rivas-Valencia y Mora-Aguilera 2010. No publicado) se calculó el índice de Morisita y Loyd para estimar el patrón de dispersión espacial parcelario de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990).

Detección de focos con dron. Para analizar la capacidad de detección temprana de focos asistido con vehículos no tripulados, se empleó el dron Phantom4 de DJI® con cámara RGB 14mpx. Se

progress curve (AUDPC) was estimated with data on plant severity and the number of infected plants. The additive combination was used as a damage index estimator (DI). For the spatial analysis, the epidemic with the highest intensity was selected per region to analyze the spreading behavior amongst plots. With the evaluations on Y_o (Nov-2016) and Y_{max} (Dec-2017), interpolated maps were generated and geostatistical semivariograms were analyzed with the Surfer® v10.6 program (Golden software, USA). Additionally, through the MorLloyd version 1.0 program developed in MS Excel (Rivas-Valencia and Mora-Aguilera 2010. Not published) the index of Morisita and Loyd was calculated to estimate the plot spatial dispersion pattern of the disease (Campbell and Madden, 1990).

Detection of foci with drone. To analyze the capacity of early detection of foci assisted with not tripulated vehicle, the DJI® Phantom4 drone with RMP 14mpx camera was used. Orchards of 3-5 years with variable incidence-severity of gray spot were chosen. To optimize the time, energy resources, digital and analytical storage, needed in regional approaches, flights were conducted on vertical trajectory from the centroid/orchard to capture of images between 10-200 m height. Images were collected between 8:00 a.m. and 6:00 p.m. to evaluate the effect of reflected light. The analysis of images by the classification method of the maximum probability and improvement of the resolution was made with ArcMap® v10.1 and QGIS® v2.18.2.

Development of forecast models. The generation of stochastic forecast models to estimate changes in disease intensity was developed in two stages: 1) Selection of representative epidemics per region and 2) Generation of multiple linear regression models between five dependent variables Y_i with

eligieron predios de 3-5 años con incidencia-severidad variable de mancha gris. Para optimizar tiempo, recursos energéticos, almacenamiento digital y analíticos, necesarios en enfoques regionales, los vuelos se realizaron en trayectoria vertical partiendo del centroide/predio para captura de imágenes a alturas entre 10-200m. Las capturas se realizaron entre 8:00 y 18:00h para evaluar efecto de luz reflejada. El análisis de imágenes mediante método de clasificación por máxima probabilidad y mejora de resolución se realizó con ArcMap® v10.1 y QGIS® v2.18.2.

Desarrollo de modelos de pronóstico. La generación de modelos estocásticos de pronóstico para estimar cambios en la intensidad de enfermedad se desarrolló en dos etapas: 1) Selección de epidemias representativas para cada región, y 2) Generación de modelos de regresión lineal múltiple entre cinco variables dependientes Y_i con respecto a ocho variables independientes X_i con desfases (LAG) de 2-20 semanas para incluir el efecto del periodo de incubación. Los modelos se generaron para dos ventanas de inductividad epidémica (VI_i) correspondientes a los periodos enero-abril 2017 (VI_1) y junio-octubre 2017 (VI_2), los cuales se definieron por exploración gráfica entre horas favorables y Y_i . La bondad de ajuste de los modelos se evaluó con *CP-Mallow*, factor de inflación de la varianza (VIF en inglés) y el coeficiente de regresión ajustado R^2_{Adj} (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). La generación de modelos se realizó en los procedimientos REG y GLM del programa estadístico SAS v9.4.

Selección de variables independientes. Debido a las características parasíticas de *C. agavicola* se eligieron variables climáticas para correlacionar con variables dependientes. Se usó el promedio, máximo y mínimo acumulado semanal de temperatura y humedad relativa. Una infección exitosa del

respect to eight independent variables X_i with lags (LAG) of 2-20 weeks to include the effect of the incubation period. Models were generated for two epidemic inductivity period (VI_i) corresponding to january-april 2017 (VI_1) and june-october 2017 (VI_2), which was obtained by graphical exploration between favorable hours and Y_i . The goodness of fit of the models was evaluated with *CP-Mallow*, variance inflation factor (VIF) and the adjusted regression coefficient R^2_{adj} (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). Model generation was performed with the REG and GLM procedures of the statistical program SAS v9.4.

Independent variables selection. Due to the parasitic characteristics of *C. agavicola*, climatic variables were chosen to correlate with dependent variables. The maximum and minimum average of temperature and relative humidity accumulated weekly were used. Successful infection of the fungus requires relative humidity greater than 80% and between 15-22°C for optimal development (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). Based on this, the number of weekly accumulated optimal hours for the germination of *C. agavicola conidia* that met the two requirements was calculated. The calculation was made with the MS CalculaHF program (Santana-Peñaloza *et al.*, 2015). In total, eight independent X_i variables were used to generate forecast models (Table 2).

Dependent variables selection. The dependent variables analyzed were the number of infected plants (Y_1), the total number of infected plants (Y_2), plant severity (Y_3), plant severity in proportion (Y_4), and the number of infected plants in proportion (Y_5). All the variables represented absolute increments for each time interval t_i-t_{i-1} per plot ($Y_1, Y_3 - Y_5$) or for the n -plots of each region (Y_2) (Table 2).

hongo requiere humedad relativa mayor a 80% y entre 15-22 °C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). Con esta base, se calculó el número acumulado semanalmente de horas favorables que cumplieran los dos requerimientos para la germinación de conidios de *C. agavicola*. El cálculo se realizó con el programa MS CalculaHF (Santana-Peñaloza *et al.*, 2015). En total, ocho variables independientes X_i se emplearon para generar modelos de pronóstico (Cuadro 2).

Selección de variables dependientes. Las variables dependientes analizadas incluyeron el número de plantas enfermas (Y_1), sumatoria del número de plantas enfermas (Y_2), severidad de planta (Y_3), severidad de planta en proporción (Y_4) y número de plantas enfermas en proporción (Y_5). Todas las variables representaron incrementos absolutos por cada intervalo de tiempo t_i-t_{i-1} , por parcela (Y_1 , Y_3 - Y_5) o por las n -parcelas de cada región (Y_2) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variables dependientes e independientes para generar modelos estocásticos de pronóstico de cambios de intensidad de la enfermedad mancha gris del agave azul en Jalisco, México.

Table 2. Dependent and independent variables to generate stochastic models to forecast disease intensity change of blue-agave gray spot in Jalisco, Mexico.

| Variabes | Símbolo |
|--|----------------------------------|
| Independientes (X_i) ^x | |
| Temperatura promedio semanal | Tprom _(2-20 semanas) |
| Temperatura mínima semanal | Tmin _(2-20 semanas) |
| Temperatura máxima semanal | Tmax _(2-20 semanas) |
| Humedad relativa promedio semanal | HRprom _(2-20 semanas) |
| Humedad relativa mínima semanal | HRmin _(2-20 semanas) |
| Humedad relativa promedio semanal | HRmax _(2-20 semanas) |
| Número de horas favorables con desfase (lag) de n semanas | HFav _(2-20 semanas) |
| Número de horas supresivas con desfase (lag) de n semanas | HSup _(2-20 semanas) |
| Dependientes en incrementos absolutos (Y_i) ^y | |
| Número de plantas enfermas | Y_1 |
| Sumatoria de plantas enfermas ^z | Y_2 |
| Severidad en planta enferma (%) | Y_3 |
| Proporción de severidad en planta | Y_4 |
| Proporción del número de plantas enfermas | Y_5 |

^xEl cálculo de variables se realizó por parcela de monitoreo / The calculation of variables was done per each monitoring plot.

^yIncremento absoluto: $Y_i - Y_{i-1}$ / Absolut increment: $Y_i - Y_{i-1}$

^zLa sumatoria se realizó para las n -parcelas de monitoreo de cada región (Los Altos, Valles y Sur) por cada tiempo- i de evaluación. / The summatory was made for the n -monitoring plots per each region (Los Altos, Valleys and South) for evaluation time- i .

RESULTS

Characterization of the fungus. The cultural, morphological and molecular characteristics of 13 fungal isolates corresponded to *C. agavicola*. The DNA sequences of the isolates were analyzed with the Blast® *blastn* suit program, resulting in 99% homology with respect to the sequence with accession number AY647237 corresponding to *C. agavicola* (Ayala *et al.*, 2005). The sequenced samples were registered in GenBank with accession numbers MH458575-MH458587.

Regional epidemic inductivity. The map of epidemic inductivity at the level of Jalisco showed the potential of *C. agavicola* to induce epidemics with spatially heterogeneous intensity. The highest potential was estimated for Los Altos with moderate to very high levels, highlighting the municipalities of Jesus Maria, Atotonilco, Ayotlán,

RESULTADOS

Caracterización del hongo. Las características culturales, morfológicas y moleculares de 13 aislados fungosos correspondieron a *C. agavicola*. Las secuencias de ADN de los aislados se analizaron con el programa Blast® *blastn suit* resultando 99% de homología con respecto a la secuencia con número de accesoión AY647237 correspondiente a *C. agavicola* (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). Las muestras secuenciadas fueron registradas en el *GenBank* con números de accesoión MH458575- MH458587.

Inductividad epidémica regional. El mapa de inductividad epidémica a nivel del estado de Jalisco mostró el potencial de *C. agavicola* para inducir epidemias con intensidad espacialmente heterogénea. El mayor potencial se estimó para Los Altos con niveles de moderado a muy alto resaltando municipios de Jesús María, Atotonilco, Ayotlán, Degollado, San Ignacio, Cerro Gordo, Arandas, Tepatitlán y Cuquio (Figura 1). En Valles, el potencial se categorizó de bajo a moderado sobresaliendo Ahualulco, San Juan y Magdalena. La región Sur exhibió condiciones homogéneas de baja inductividad (Figura 1).

Caracterización de epidemias. En un total de 12 evaluaciones mensuales de incidencia y severidad, la mancha gris del agave se presentó con baja intensidad en 33 de las 41 parcelas de monitoreo. En los ocho restantes la ocurrencia de la enfermedad fue nula. En Y_o , la incidencia regional promedio en Los Altos fue 3.6%, Valles 0.33% y Sur 0.51%. En la fase final del estudio epidémico (Y_f) se observó poca variación con 2.0, 0.9 y 0.1% con incrementos absolutos máximos en el periodo de marzo a mayo 2017 de 4.4, 1.3 y 0.2%, respectivamente. En general, la severidad de plantas enfermas estuvo en el rango de 2-100%, con severidad promedio entre

Degollado, San Ignacio, Cerro Gordo, Arandas, Tepatitlán and Cuquio (Figure 1). In Valleys, the epidemic induction potential was low to moderate, highlighting Ahualulco, San Juan and Magdalena. The South region showed homogeneous conditions of low inductivity (Figure 1).

Characterization of epidemics. In a total of 12 monthly assessments of plant disease incidence severity, the gray spot of the agave was shown with low intensity in 33 of the 41 monitoring plots. In the remaining eight, the disease occurrence was null. In Y_o , the average regional incidence in Los Altos was 3.6%, Valleys 0.33%, and South 0.51%. In the final phase of the epidemic study (Y_f) little variation on disease incidence was observed with 2.0, 0.9 and 0.1% with maximum absolute increments in the period from March to May 2017 of 4.4, 1.3 and 0.2%, respectively. In general, the severity of infected plants was within the range of 2-100%, with average severity somewhat between 0.01-12.8%. The absolute annual, regional incidence was in the range of 0-25%. Per plot, the greatest absolute increase in the number of infected plants from Y_o to Y_{max} was 94 to 125 plants in Los Altos, 1 to 6 in Valleys and 14 to 17 in the South. Of these plants, the mortality was 9, 1 and 9 in Y_f , respectively. The absolute severity increased from 11.3 to 28.1% in Altos, 1.8 to 5.7% in the South and 0.02 to 0.7% in the Valleys. Amongst epidemics of 14 plots selected for temporal modeling, the Los Altos region had the highest damage index (DI) with 74.1-329.9 %num.day⁻¹, followed by the South with 108-144.5 and Valleys 0-51.2 (Table 3).

Spatial Analysis. The analysis of spatial patterns at the plot level showed a limited increase of Y_o to Y_{max} in the number and expansion of foci in a period of 5-8 months. The biggest increase including foci coalescence was observed in the plots located in Los Altos, an extreme condition

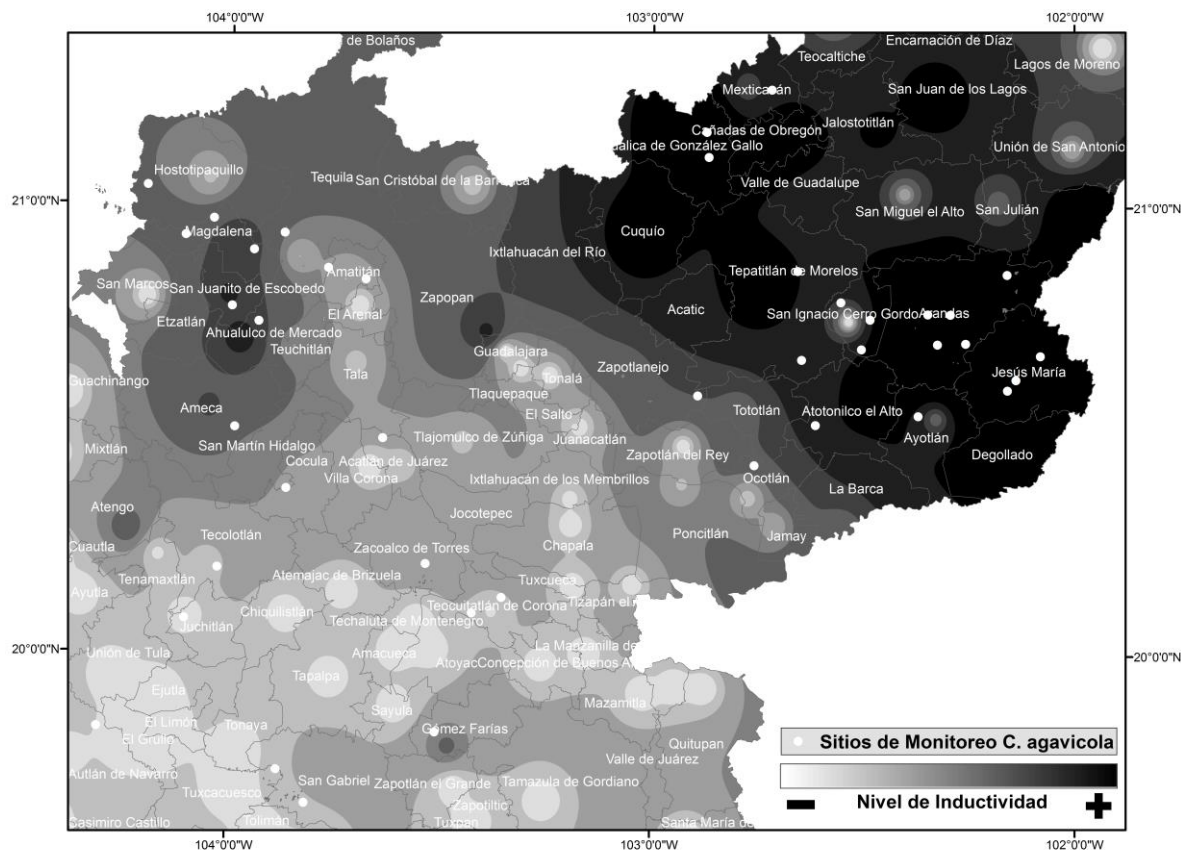


Figura 1. Mapa de inductividad epidémica de *Cercospora agavicola* estimado con un indicador multivariado de ocurrencia de enfermedad (2012-2015), clima, tipología de suelo y superficie municipal de agave azul (*Agave tequilana*). Parcelas de monitoreo epidémico (puntos blancos) en plantaciones de agave comerciales de 3-4 años de edad. Jalisco, México.

Figure 1. Map of epidemic inductivity of *Cercospora agavicola* estimated with a multivariate index of disease occurrence (2012-2015), climate, soil typology and municipal hectares of blue agave (*Agave tequilana*). Epidemic monitoring plots (white dots) in commercial agave plantations 3-4 years old. Jalisco, Mexico.

0.01-12.8%. La incidencia total absoluta anual regional estuvo en el rango de 0-11%. Por parcela, el mayor incremento absoluto del número de plantas enfermas de Y_0 a Y_{max} fue de 94 a 125 plantas en Los Altos, 1 a 6 en Valles y 14 a 17 en Sur. De estas plantas, la mortalidad fue de 9, 1 y 9 en Y_p , respectivamente. La severidad absoluta incrementó de 11.3-28.1% en Altos, 1.8-5.7% en Sur y 0.02-0.7% en Valles. A partir de epidemias de 14 parcelas seleccionadas para modelaje temporal, la región Los Altos tuvo el mayor índice de daño (ID) con 74.1-

not observed in other monitoring plots (Figure 2). In the plot located on the South and in the Valleys, the increase was mainly in number and intensity of estimated foci with disease severity. The foci maintained practically their original size in Y_0 and increased from 5 to 9 and from 0 to 2 respectively (Figure 2). The Morisita aggregation index was within the range of 2.4-10.9, indicating moderate to strong aggregation (foci). However, the autocorrelation variograms showed a limited spatial dependence of 2 and 4 plants for the South

329.9 %núm.día⁻¹ seguido de Sur con 108-144.5 y Valles 0-51.2 (Cuadro 3).

Análisis Espacial. El análisis de patrones espaciales a nivel parcela demostró un limitado incremento de Y_o a Y_{max} en el número y expansión de focos en un periodo de 5-8 meses. El mayor incremento, incluyendo coalescencia de focos, se observó en una parcela de Los Altos, una condición extrema no observada en otros predios estudiados (Figura 2). En parcelas de Sur y Valles, el incremento fue principalmente en número e intensidad de foco estimado con la severidad de enfermedad. Los focos mantuvieron prácticamente su tamaño original en Y_o y se incrementaron de 5 a 9 y de 0 a 2, respectivamente (Figura 2). El índice de agregación de Morisita estuvo en el rango de 2.4-10.9, indicando agregación moderada a fuerte (focos). Sin embargo, los variogramas de autocorrelación mostraron una dependencia espacial limitada de 2 y 4 plantas para Sur y Los Altos, respectivamente. En la región

and Los Altos, respectively. In the Valley region, the lowest spatial dependence with a value of 1 was observed, indicating a strong contagion restriction. Early foci detection of the gray spot was possible in vertical flights set to 50-100 m. The detection-delimitation of foci efficiency was >85%. The most accurate damage characterization was the variable of incidence with a percentage error of $\pm 7\%$. Accuracy was related to the disease development, age, weeds, height and time/flight (Figure 3).

Temporary Analysis. The estimated epidemic behavior for the standardized and cumulative plant severity ratio (Y_d) was the most adequate to forecast epidemic rates in the 14 selected epidemics. The Weibull model with two parameters had moderate goodness of fit in 8/13 epidemics with a range of R^2 of 0.62-0.87 ($p \leq 0.001$). On 4/13 the regression coefficient (R^2) was within the range of 0.96-0.99 ($p < 0.0001$). A plot of the Valley region had only one infected plant in the 12-month period, therefore the

Cuadro 3. Parámetros de ajuste del modelo Weibull e Índice de Daño (ID) de curvas de proporción estandarizada de severidad (Y_d) de 14 epidemias seleccionadas regionalmente para estimar la tasa de epidémica (l/b) e intensidad epidémica (ID) inducida por *C. agavicola* en Jalisco, México. 2016-2017.

Table 3. Weibull model fit parameters and Damage Index (DI) of standardized severity proportion (Y_d) curves of 14 regionally selected epidemics to estimate the epidemic rate (l/b) and epidemic intensity (DI) induced by *C. agavicola* in Jalisco, Mexico. 2016-2017.

| Región | Parcela | Latitud | Longitud | Modelo | l/b | ID ^x | R ² | Pr > F |
|--------|---------|----------|-------------|--|--------|-----------------|----------------|--------|
| Altos | A1 | 20.69727 | - 102.25716 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/112.7)^{1.24}$ | 0.003 | 329.9 | 0.98 | <.0001 |
| | A4 | 20.85077 | - 102.15921 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/65149.7)^{0.74}$ | 0.005 | 168.0 | 0.71 | 0.001 |
| | A7 | 20.75053 | - 102.48384 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/1197.1)^{0.86}$ | 0.003 | 161.4 | 0.96 | <.0001 |
| | A10 | 20.57965 | - 102.89150 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/28742.1)^{0.85}$ | 0.004 | 149.9 | 0.62 | 0.004 |
| | A13 | 20.53568 | - 102.36955 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/1716.4)^{2.76}$ | 0.0008 | 74.1 | 0.77 | 0.0003 |
| | A15 | 20.68421 | - 102.50424 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/116.3)^{1.14}$ | 0.003 | 120.0 | 0.96 | <.0001 |
| | A17 | 21.11167 | - 102.86754 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/3311)^{1.90}$ | 0.003 | 93.0 | 0.75 | 0.0005 |
| | A20 | 20.69541 | - 102.32411 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/472)^{1.60}$ | 0.003 | 130.4 | 0.99 | <.0001 |
| Sur | S5 | 19.66587 | - 103.81346 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/113353)^{0.58}$ | 0.004 | 131.1 | 0.86 | <.0001 |
| | S7 | 20.09198 | - 103.42234 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/25831.5)^{0.83}$ | 0.003 | 102.8 | 0.85 | <.0001 |
| | S9 | 20.20140 | - 103.53209 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/3629.6)^{0.86}$ | 0.004 | 144.5 | 0.99 | <.0001 |
| Valles | V9 | 20.50290 | - 103.98623 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/5740.9)^{5.15}$ | 0.0002 | 0.0 | 0 | - |
| | V10 | 20.36717 | - 103.86355 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/6490.9)^{1.26}$ | 0.004 | 30.6 | 0.87 | <.0001 |
| | V11 | 20.96739 | - 104.04096 | $Y_d = 1 - \text{EXP}(t/28742.1)^{0.85}$ | 0.006 | 51.2 | 0.63 | 0.004 |

^xÍndice de daño=ABCPE del número de plantas enfermas + ABCPE de la severidad de plantas enfermas / Damage index = AUDPC of the number of diseased plants + AUDPC of the severity of diseased plants.

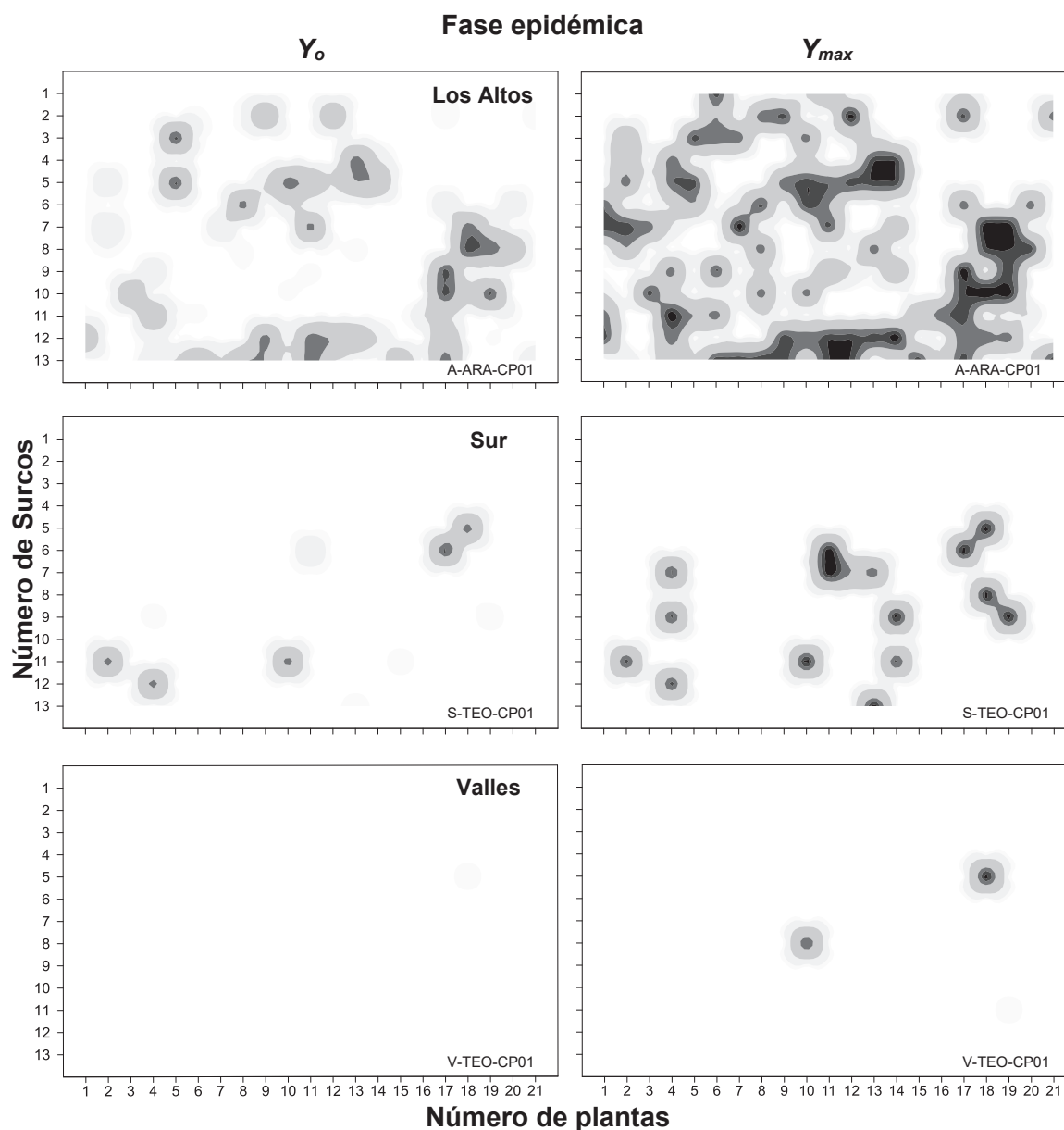


Figura 2. Patrón espacial en las fases epidémicas Y_0 y Y_{max} en tres parcelas comerciales seleccionadas por el mayor número de plantas enfermas en tres regiones agaveras de Jalisco, México. Y_0 para Altos y Sur fue octubre 2016; Y_0 en Valles noviembre 2016. Y_{max} en Altos y Sur Junio y Julio 2017, respectivamente; Valles septiembre 2017.

Figure 2. Spatial pattern in the epidemic stages Y_0 and Y_{max} in three commercial plots selected by the largest number of diseased plants in three agave regions of Jalisco, Mexico. Y_0 for Altos and South was October 2016; Y_0 in Valleys November 2016. Y_{max} in Altos and South June and July 2017, respectively; Valleys September 2017.

Valles se observó la menor dependencia espacial con valor de uno, indicativo de una fuerte restricción de contagio. La detección de focos tempranos de mancha gris fue posible en vuelos verticales a alturas 50-100m. La eficiencia detección-delimitación focos fue >85%. La caracterización de daño más preciso fue la variable de incidencia con error $\pm 7\%$. La precisión estuvo en función al desarrollo de enfermedad, edad, maleza, altura y hora/vuelo (Figura 3).

Análisis Temporal. El comportamiento epidémico estimado con la proporción de severidad de planta estandarizada y acumulada (Y_4) fue la más adecuada para estimar tasas epidémicas en las 14 epidemias seleccionadas. El modelo Weibull con dos parámetros tuvo una moderada bondad de ajuste en 8/13 epidemias con un rango de R^2 de 0.62-0.87 ($p \leq 0.001$). En 4/13 el coeficiente de regresión (R^2) estuvo en el rango de 0.96-0.99 ($p < 0.0001$). Una parcela de Valles tuvo una sola planta enferma en el periodo de 12 meses, por lo que no se requirió el ajuste del modelo (Figura 4, Cuadro 3). Las tasas epidémicas estimadas (b^{-1}) estuvieron en el rango de 0.0008-0.006 unidades semana⁻¹, correspondiendo con epidemias de muy baja intensidad. Las tasas epidémicas relativamente superiores se observaron en Los Altos seguido de Sur. La forma de las curvas epidémicas (c) estuvieron en el rango de 0.58-5.15 y representaron un progreso de tipo lineal, atípico para un proceso infeccioso multiplicativo (Campbell y Madden, 1990).

Modelos de Pronóstico. Se seleccionaron 14 epidemias por tipología de forma e intensidad contrastante en el tiempo para el desarrollo de modelos regionales de pronóstico. Se generaron y analizaron un total de 82 modelos a partir del número de epidemias mencionadas y las variables dependientes Y_p , los cuales resultaron con R^2_{adj} de 0.15-0.60. Aunque con baja capacidad de pronóstico, los mejores

adjustment of the model was not required (Figure 3, Table 3). The estimated epidemic rates (b^{-1}) were within the range of 0.0008-0.006, corresponding to very low-intensity epidemics. Relatively higher epidemic rates were observed in Los Altos followed by the South region. The shape of the epidemic curves (c) was within the range of 0.58-5.15 and represented atypical linear progress for a multiplicative infectious process (Campbell and Madden, 1990).

Forecast models. 14 epidemics were selected according to their form typology and time intensity contrast for the development of regional forecast models. A total of 82 models were generated and analyzed based on the number of epidemics previously mentioned and dependents variables Y_i which was R^2_{adj} of 0.15-0.60. Through with a low forecast capacity, the best models were obtained with Y_2 , the total sum of infected plants per unit of time and per region, and with the variables HFav and HRprom, with a LAG of 2 and 12 weeks as independent variables. These models obtained R^2_{adj} within the range of 0.29-0.60, C(p) of 0.03-8.84, VIF of 1.00-5.93 and $p < 0.003$. The best forecast models were for VI_i (January-April 2017) for Los Altos and the South (Table 4, Figure 5).

DISCUSSION

The causal agent of the gray spot of blue agave caused by *C. agavicola*, has a heterogeneous regional epidemic potential with a higher risk for the region of Los Altos (Figure 1). This insight was verified with 12 months worth of thorough data obtained from a monitoring network of 41 plots under commercial production conditions in Jalisco. However, all parameters, indicators and estimated variables consistently demonstrated the low epidemic capacity of *C. agavicola*. Due to the

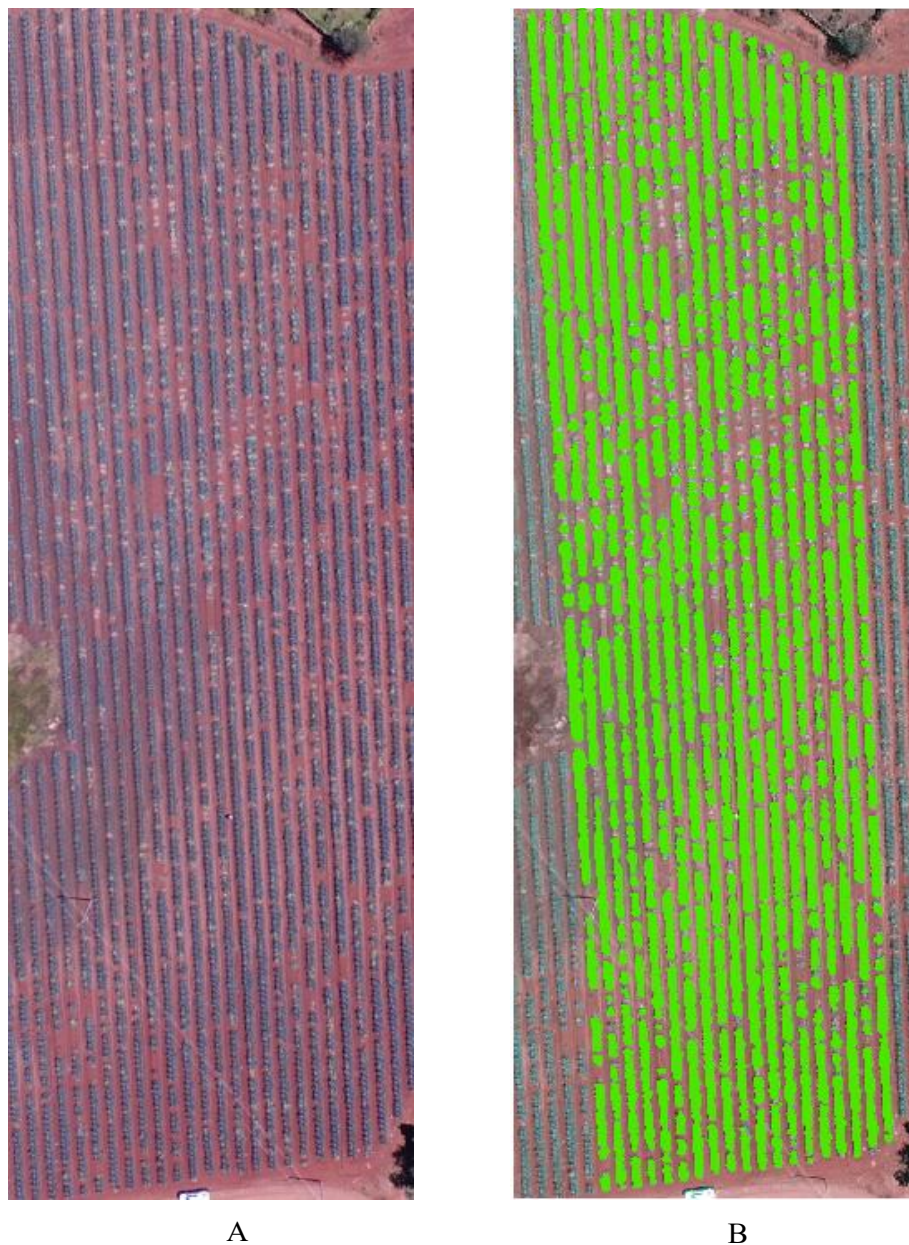


Figura 3. A. Imagen RGB capturada las 13 horas a 220 m de altura en vuelo centroide-vertical sobre una hectárea de agave azul de 3 años con incidencia de mancha gris en Arandas, Jalisco. **B.** Imagen procesada en ArcGis para estimación del número de plantas e incidencia de plantas enfermas. Censo terrestre: 3600 plantas vs Censo estimado por análisis de imagen: 3717. Incidencia censada vs estimada: 40.5 y 38.3%, respectivamente. Notar la discontinuidad dentro de surcos (ausencia de color verde o pérdida del bandeo) representando focos simples o coalescentes de enfermedad.

Figure 3. A. RGB image captured at 13 hr at 220 m height in centroid-vertical flight over a hectare of 3-year-old blue agave with incidence of gray spot in Arandas, Jalisco. **B.** Image processed in ArcGis to estimate plants number and disease incidence. Scout census: 3600 plants vs estimated census by image analysis: 3717. Census incidence vs estimated: 40.5 and 38.3%, respectively. Note the discontinuity within rows (absence of green color or loss of banding) representing simple or coalescent disease foci.

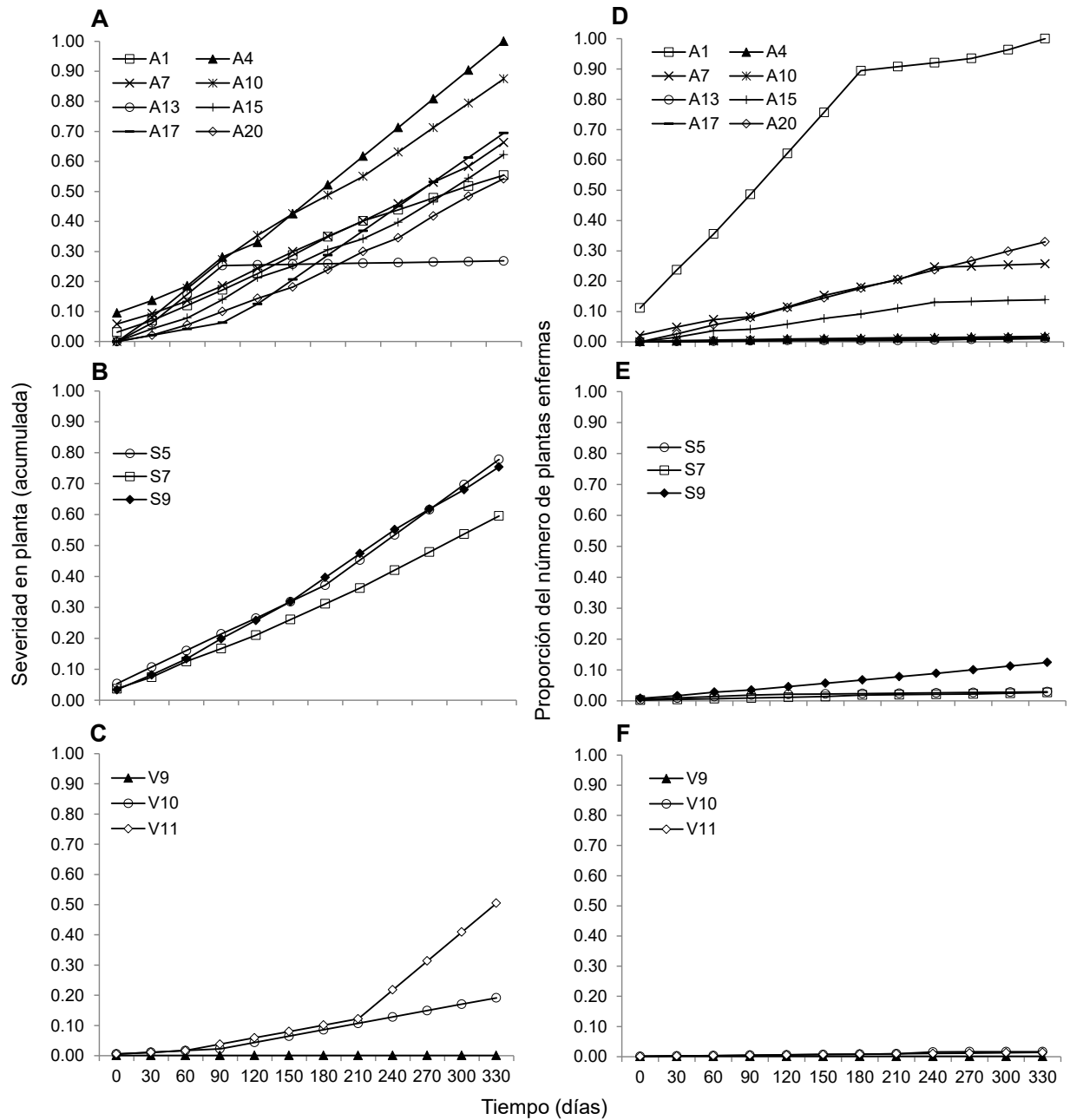


Figura 4. Progreso epidémico en 14 parcelas comerciales de agave en Jalisco, México. Proporción estandarizada acumulada de severidad en planta para A) Altos, B) Sur y C) Valles. Proporción estandarizada acumulada del número de plantas enfermas para D) Altos, E) Sur y F) Valles.

Figure 4. Epidemic progress in 14 commercial agave plots in Jalisco, Mexico. Cumulative standardized proportion of plant severity for A) Los Altos, B) South and C) Valleys. Accumulated standardized proportion of the number of diseased plants for D) Los Altos, E) South and F) Valleys.

modelos se obtuvieron con Y_2 , la sumatoria del número de plantas enfermas por unidad de tiempo y por región, y con las variables HFav y HRprom, con un LAG de 2 y 12 semanas como variables independientes. Estos modelos tuvieron R^2_{adj} en rango de 0.29-0.60, C(p) de 0.03-8.8, VIF de 1-5.9 y $p < 0.003$. Los mejores modelos de pronóstico fueron para la VI_1 (enero-abril 2017) para Los Altos y Sur (Cuadro 4, Figura 5).

DISCUSIÓN

El agente causal de la mancha gris del agave azul, causado por *C. agavicola*, tiene un potencial epidémico regional heterogéneo con mayor riesgo para Los Altos (Figura 1). Este resultado se con-

regional approach applied, which allows optimizing the epidemiological system and capturing regional epidemic variability, these results are inherently strong. Thus, very low epidemic rates (0.0008-0.006, units weeks⁻¹), strongly restricted contagion parameters (1-4 plants), an annual increase of diseased plants (0-32 plants) and no captures of spores amongst 41 traps show the low parasitic aptitude of the fungus (Table 2-3, Figure 2).

Stochastic forecast models are recurrent in epidemiology because of the analytical ease of including a set of variables in an automatic statistical process of selection of variables and models (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Chuang y Jeger, 1987; Coakley *et al.*, 1985). However, the practical application of these models is limited by regional level due to the restricted uptake of

Cuadro 4. Modelos estocásticos seleccionados para el pronóstico en dos ventanas de inductividad, VI_1 (enero-abril) y VI_2 (junio-octubre), del incremento absoluto de la sumatoria de plantas enfermas (Y_2) de mancha gris del agave azul en tres regiones agaveras de Jalisco. 2016-2017.

Table 4. Stochastic models selected to forecast in two inductance windows, VI_1 (January-April) and VI_2 (June-October), the absolute increase of the summatory diseased plants (Y_2) of gray spot of blue agave in three agave regions of Jalisco 2016-2017.

| Región | Modelos ^x | F | C(p) ^y | VIF | R^2_{adj} ^z |
|-----------------|---|--------|-------------------|------|--------------------------|
| Altos / VI_1 | $Y_2 = 1.31(\text{HFav}_{12})$ | <.0001 | 8.84 | 2.04 | 0.47 |
| Altos / VI_1 | $Y_2 = 0.8(\text{HFav}_2)$ | <.0001 | 0.03 | 1.00 | 0.51 |
| Altos / VI_1 | $Y_2 = 0.95(\text{HFav}_{12}) + 0.25(\text{HRprom}_{12})$ | <.0001 | 2.00 | 2.04 | 0.50 |
| Altos / VI_2 | $Y_2 = 0.0005(\text{HFav}_{12}) + 0.17(\text{HRprom}_{12})$ | <.0001 | 2.00 | 2.54 | 0.23 |
| Sur / VI_1 | $Y_2 = -0.04(\text{HFav}_{12}) + 0.25(\text{HRprom}_{12})$ | <.0001 | 2.00 | 4.75 | 0.60 |
| Sur / VI_1 | $Y_2 = 0.04(\text{HRprom}_2)$ | <.0001 | 6.46 | 4.00 | 0.57 |
| Sur / VI_2 | $Y_2 = 0.002(\text{HFav}_{12}) + 0.02(\text{HRprom}_{12})$ | <.0001 | 2.00 | 3.67 | 0.31 |
| Sur / VI_2 | $Y_2 = 0.004(\text{HFav}_2)$ | <.0001 | 1.04 | 1.00 | 0.32 |
| Valles / VI_1 | $Y_2 = -0.006(\text{HFav}_{12}) + 0.01(\text{HRprom}_{12})$ | 0.0003 | 2.00 | 3.67 | 0.32 |
| Valles / VI_1 | $Y_2 = -0.003(\text{HFav}_2) + 0.008(\text{HRprom}_2)$ | <.0001 | 2.00 | 3.25 | 0.31 |
| Valles / VI_2 | $Y_2 = -0.001(\text{HFav}_{12}) + 0.02(\text{Hprom}_{12})$ | <.0001 | 2.00 | 4.15 | 0.32 |
| Valles / VI_2 | $Y_2 = -0.001(\text{HFav}_2) + 0.014(\text{Hprom}_2)$ | <.0001 | 2.00 | 5.93 | 0.29 |

^xHRprom_{2,12}=porcentaje de humedad relativa promedio semanal, HFav_{2,12}= horas favorables acumuladas por una semana y desfazadas 2 o 12 semanas a partir de la evaluación de Y_2 / HRprom_{2,12}= percentage of weekly relative humidity, HFav_{2,12}= favorable hours week accumulated and lag-2 or lag-12 weeks from the evaluation of Y_2 .

^yEstadísticos de bondad de ajuste: Cp-Mallow. VIF=Factor de inflación de la varianza. R^2_{adj} =Coeficiente de regresión ajustado / Statistics of goodness of fit: Cp-Mallow. VIF = Variance inflation factor. R^2_{adj} = Adjusted regression coefficient.

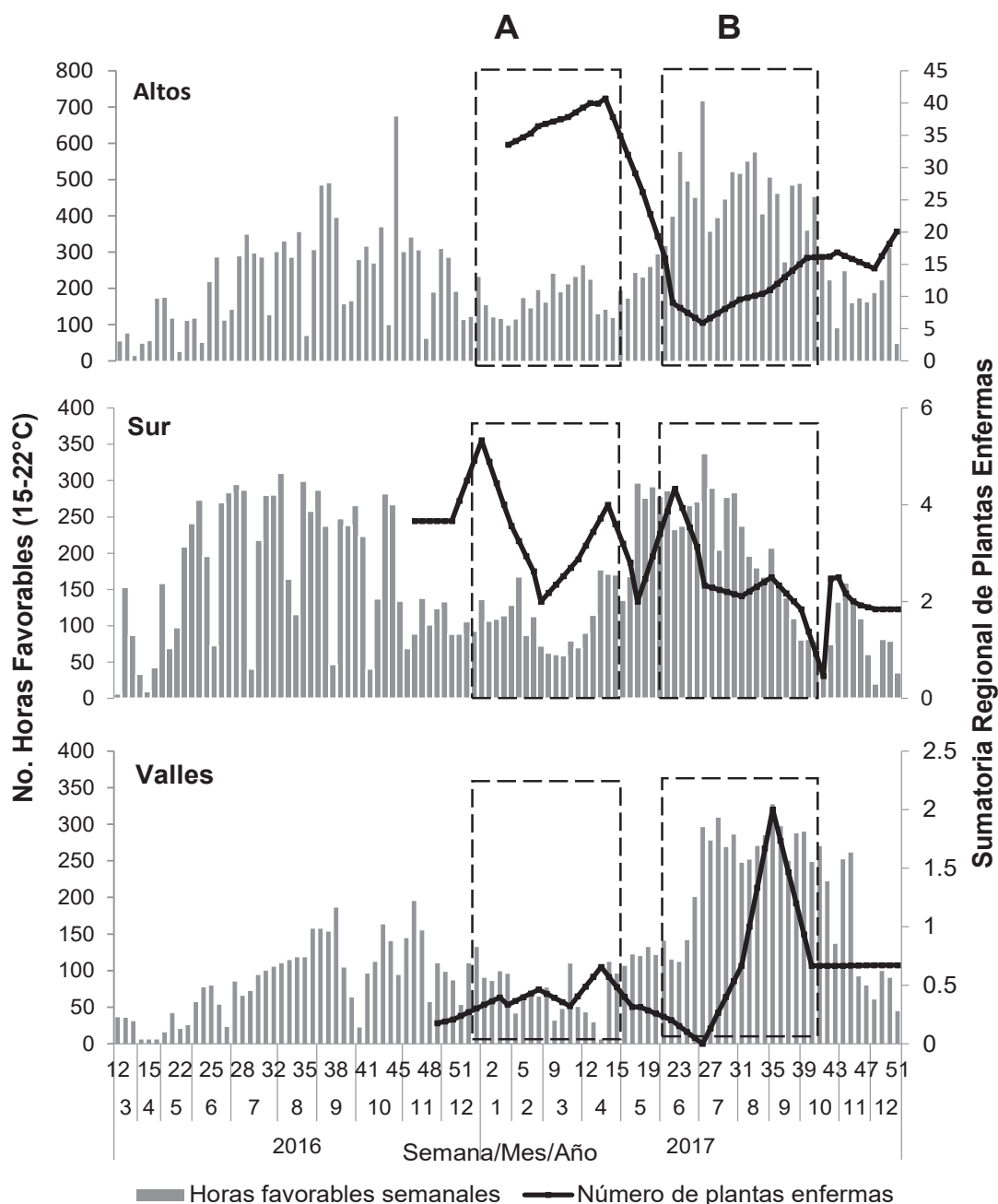


Figura 5. Curvas epidémicas de la sumatoria del número de plantas enfermas de agave azul con mancha gris en 8, 3 y 3 parcelas de monitoreo para Los Altos, Sur y Valles, respectivamente (líneas). Número acumulado por semana de horas favorables para la infección de *C. agavicola* obtenidas de marzo 2016 a dic 2017 (barras). A) Ventana de inductividad epidémica correspondiente al periodo enero-abril 2017 (VI_1). B) Ventana de inductividad epidémica correspondiente al periodo jun-oct 2017 (VI_2).

Figure 5. Epidemic curves of the sum of the number of diseased blue-agave plants with gray spot in 8, 3 and 3 monitoring plots for Los Altos, South and Valleys, respectively (lines). Accumulated number per week of favorable hours for *C. agavicola* infection obtained from March 2016 to December 2017 (bars). A) Epidemic inductivity window corresponding to January-April 2017 period (VI_1). B) Epidemic inductivity window corresponding to Jun-Oct 2017 period (VI_2).

firmó con datos exhaustivos de 12 meses obtenidos a partir de una red de monitoreo de 41 parcelas en condición productiva comercial de Jalisco. Sin embargo, todos los parámetros, indicadores y variables estimados demostraron consistentemente la baja capacidad epidémica de *C. agavicola*. Debido al enfoque regional aplicado, el cual permite optimizar el sistema epidemiológico, para captar la variabilidad epidémica regional, estos resultados son inherentemente robustos. Así, tasas epidémicas muy bajas (0.0008-0.006 unidades semana⁻¹), contagio fuertemente restringido (1-4 plantas), reducido incremento anual de plantas enfermas (0-32 plantas) y nula captura de esporas en 41 trampas muestran la baja aptitud parasítica del hongo (Cuadro 2-3, Figura 2).

Los modelos estocásticos de pronóstico son recurrentes en la epidemiología por la facilidad analítica de incluir un conjunto de variables en un proceso estadístico automática de selección de variables y modelos (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Chuang y Jeger, 1987; Coakley *et al.*, 1985). Sin embargo, la aplicación práctica de estos modelos puede ser limitada por la captación restringida de la variabilidad implícita en estudios parcelarios en contraposición con enfoques regionales (Mora-aguilera *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2010). Por otra parte, una condición obligada para la viabilidad del pronóstico es la ocurrencia de epidemias con picos de variable intensidad para garantizar la identificación de variables independientes con una significativa capacidad descriptiva (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). En este trabajo, aunque exhaustivo en la caracterización de la varianza epidémica regional con el estudio de 41 epidemias, la baja intensidad de la enfermedad no permitió la generación de modelos con aceptable capacidad predictiva (*i.e.* $R^2 > 0.70$). Esta restricción, más que temporal puede ser inherente a la limitada aptitud parasítica del *C. agavicola* y al rol de la toxina en la intensidad

implicit variability in plot studies different with regional approaches (Mora-aguilera *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2010). On the other hand, an obligatory condition for the viability of the forecast is the occurrence of epidemics with peaks of variable intensity to guarantee the identification of independent variables with a significant exploratory capacity (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). In this work, exhaustive in the characterization of the regional epidemic variance with the study of 41 epidemics, the low intensity of the disease did not allow the development of models with acceptable productive capacity (*i.e.* $R^2 > 0.70$). This restriction, more than temporal, may be associated with the limited parasitic fitness of *C. agavicola* and to the role of the toxin in damage intensity (Apoga *et al.*, 2002; Franco-Navarro y Zavaleta-Mejía, 2001; Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989; Kurppa, 1985), which may be important due to the absence of a typical curve of infectious processes with linear temporal trends (Figure 4). Consequently, the premise of this research to predict the primary infectious process successfully, independent of the effect of the toxin could be ruled out and in future mixed models which include the infectious and toxic process would be necessary. More over considering the adaptation of agave to dry weather and high solar radiation, conditions which are possibly optimal for the activation of cercosporin (Daub and Ehrenshaft, 2000). The implications of fungal toxins and other abiotic factors in atypical epidemic processes have been recognized by Vanderplank (1984) and others (Apoga *et al.*, 2002; Liljeroth, 1994, Kurppa, 1985; Ludwig, 1957). However, despite the limited predictive capacity, even of the best models generated, corresponding to Los Altos region and the South (R^2_{adj} 0.51-0.60), some consistent analytical trends were observed: 1). Identification of two disease induction periods, the most important one being on January-April,

del daño (Apoga *et al.*, 2002; Franco-Navarro y Zavaleta-Mejía, 2001; Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989; Kurppa, 1985), el cual puede ser importante debido a la ausencia de una curva típica de procesos infecciosos con tendencias temporales lineales (Figura 4). En consecuencia, la premisa de esta investigación de pronosticar el proceso infeccioso primario con éxito, independiente del efecto de la toxina, podría descartarse y en el futuro serían necesarios modelos mixtos que incluyan el proceso infeccioso y el tóxico. Sobre todo, considerando la adaptación del agave a climas secos con alta radiación solar posiblemente óptimos para la activación de la cercosporina (Daub y Ehrenshaft, 2000). Las implicaciones de toxinas fungosas y otros factores abióticos en procesos epidémicos y de patogénesis atípicos han sido reconocidos por Vanderplank (1984) y otros (Apoga *et al.*, 2002; Liljeroth, 1994; Kurppa, 1985; Ludwig, 1957). Sin embargo, a pesar de la limitada capacidad predictiva, aun de los mejores modelos generados, correspondientes a Los Altos y Sur (R^2_{adj} 0.51-0.60), se observaron tendencias analíticas consistentes: 1). Identificación de dos ventanas de inductividad de enfermedad siendo más importante la de enero-abril, posiblemente por las condiciones más ideales para el desarrollo de la infección primaria con limitado efecto de toxina (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). 2). Selección de un periodo LAG de 2 y 12 semanas que podrían estimar el periodo de incubación y latencia del hongo, respectivamente. En *Pseudocercospora opuntiae*, un hongo con similar comportamiento epidémico (Hernández-Sánchez *et al.*, 2014), se reporta un periodo de latencia de 14 semanas (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). 3). La inclusión de horas favorables acumuladas (HFav) respecto a la infección del hongo, lo cual sugiere que este indicador puede integrarse a SIVEA (www.sivea.org.mx) mediante un algoritmo que automatice su cálculo para representar un indicador de riesgo o inductividad. Este

posiblemente due to the most ideal conditions for the development of the primary infection with limited toxin effect (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). 2). Selection of a LAG period of 2 and 12 weeks that could estimate the incubation period and latency of the fungus, respectively. In *Pseudocercospora opuntiae*, a fungus with similar epidemic behavior (Hernández-Sánchez *et al.*, 2014), a latency period of 14 weeks is reported (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). 3). The inclusion of cumulative favorable hours (HFav) regarding the infection of the fungus suggests that this indicator can be integrated into SIVEA (www.sivea.org.mx) through an algorithm that automates its calculation to represent an indicator of risk or inductance. This indicator could activate the monitoring of diseased plants at parcel and regional level for their early elimination, a practice that agave producers already undertake on an observational basis. The elimination of damaged plants, assisted by HFav with emphasis on inductive periods (VI), can be successful considering that the disease has a strong contagion restriction, an idea reinforced by the absence of spore capture in the impact and deposition devices, limited to a maximum of 1-4 plants in initial to advanced foci. In this context, the use of drones can be a promising strategy for the surveillance of early foci at parcel level (Figure 3), for both leading producers and companies, as well as for personnel from the Campaign against Regulated Pests of the Agave (www.sivea.org.mx).

Finally, in spite of the low parasitic fitness and epidemic potential of *C. agavicola*, the estimation of the productive impact at commercial level (6 years) can be significant at regional level under the scenario of the epidemic rates found in this investigation, 84 % of affected plots after 3 years and the absence of sanitary jimas that reduce the inoculum load. Thus, at the average price/kilo 2018 of 24 pesos MXN and pineapples / 50 kg, regional

indicador, podría activar el monitoreo de plantas enfermas a nivel de predio y región para su temprana eliminación. Una práctica que los productores de agave ya realizan sobre la base observacional. La eliminación de plantas dañadas, asistida por HFav con énfasis en ventanas de inductividad (VI_t), puede ser exitosa considerando que la enfermedad tiene una fuerte restricción de contagio, idea reforzada por la ausencia de captura de esporas en los dispositivos de impacto y deposición, limitándose a un máximo de 1-4 plantas en focos iniciales a avanzados. En este contexto el empleo de drones pueden ser una estrategia promisoría para la vigilancia de focos tempranos a nivel de predio (Figura 3), tanto por productores líderes y empresas, como por personal de la Campaña contra Plagas Reglamentadas del Agave (www.sivea.org.mx).

Finalmente, a pesar de la baja aptitud parasítica y epidémica del *C. agavicola*, la estimación en el impacto productivo, a jima comercial (6 años), puede ser significativo a nivel regional bajo un escenario de las tasas epidémica encontradas en este trabajo, 84% de predios afectados a partir de los 3 años y ausencia de jimas sanitarias que reduzcan la carga de inóculo. Así, a precio/kilo promedio 2018 de 24 pesos MXN y piñas/50 kg, las pérdidas regionales pueden ser de 2,058,187,075 MXN (98.01 MDD) a 4,985,330 MXN (237 mil USD). A nivel de una hectárea, bajo los mismos supuestos, las pérdidas pueden oscilar entre 915,448 MXN a 124,500 MXN, respectivamente. Para una industria que depende de inventarios productivos planeados a mediano plazo; una creciente exportación de tequila, ubicándose en 2018 en cuarto lugar en captación de dividendos agrícolas; competencia con la industria de inulina de agave, y la reconversión de predios al cultivo de berries, hace imperativo la eficiencia sanitaria y productiva.

losses go from 2,058,187,075 MXN (98.01 MDD) to 4,985,330 MXN (237 thousand USD). At the level of one hectare under the same assumptions, the losses can range from 915,448 MXN to 124,500 MXN, respectively. For an industry that depends on medium-term productive inventories; growing exports of tequila, ranking in 2018 in fourth place on capturing agricultural divisions parasitic fitness and epidemic potential; competition with the agave insulin industry and the conversion of properties to the cultivation of berries make sanitary and productive efficiency imperative.

CONCLUSIONS

This work constitutes the first regional epidemiological study in Jalisco of *Cercospora agavicola*, the causal agent of the gray spot in blue agave (*Agave tequilana*). The regional epidemic inductivity of *C. agavicola* was heterogeneous with a greater risk for at least nine municipalities of Los Altos. However, all parameters, indicators and estimated variables consistently demonstrated the low epidemic potential of *C. agavicola*. Therefore a limited predictive capacity was found even with the best models generated (R^2_{adj} 0.51-0.60). The cumulative favorable hours variable (HFav) with respect to the infection of the fungus was consistent among the best models, which suggests that this indicator could be integrated into SIVEA (www.sivea.org.mx) for preventive and control purposes. It is necessary to strengthen the understanding of the biology of the fungus with an emphasis on pathogenesis, dispersion, inoculum charge, and the effect of cercosporin. In spite of the low parasitic fitness of *C. agavicola*, the regional losses can range between 98.01 MDD and 237 thousand US dollars.

CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer estudio epidemiológico regional en Jalisco de *Cercospora agavicola*, agente causal de la mancha gris del agave azul (*Agave tequilana*). La inductividad epidémica regional de *C. agavicola* fue heterogénea con mayor riesgo para al menos nueve municipios de Los Altos. Sin embargo, todos los parámetros, indicadores y variables estimadas demostraron consistentemente la baja capacidad epidémica de *C. agavicola*. Por lo anterior, se encontró una limitada capacidad predictiva aun con los mejores modelos generados (R^2_{adj} 0.51-0.60). La variable horas favorables acumuladas (HFav) respecto a la infección del hongo fue consistente entre los mejores modelos, lo cual sugiere que este indicador puede integrarse a SIVEA (www.sivea.org.mx) con fines preventivos y de control. Es necesario fortalecer la comprensión de la biología del hongo con énfasis en la patogénesis, dispersión, carga de inóculo, y el efecto de la cercosporina. A pesar de la baja aptitud parasítica de *C. agavicola*, las pérdidas regionales pueden oscilar entre 98.01 MDD y 237 mil dólares americanos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a COLPOS y CONACYT por la beca para estudios de maestría. Al LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto. A Miranda Mora Gutiérrez por la traducción al inglés.

LITERATURA CITADA

- Apoga D, Åkesson H, Jansson HB, Odham G. 2002. Relationship between production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 519-526. <https://doi.org/10.1023/A:1019976403391>
- Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, López-Bautista V, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, Mendoza-

ACKNOWLEDGMENTS

The first author thanks COLPOS and CONACYT for the scholarship for master's studies. To LANREF for its unconditional support in the development of the project. To Miranda Mora Gutiérrez for the English translation.

End of the English version

- Ramos C, Jiménez-González L y Mora-Aguilera G. 2017. Criterios epidemiológicos para implementar una red de monitoreo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en regiones agaveras de Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 176-177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Ángeles-Espino A, Virgen-Calleros G, Valencia-Botín J, Ramírez-Serrano C, Paredes-Gutiérrez L y Hurtado de la Peña S. 2016. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Cercospora agavicola* en vitroplántulas de agave azul tequilero irradiadas con rayos gamma Co⁶⁰. *Acta Universitaria* 26(6): 3-10. doi: 10.15174/au.2016.1121
- Ayala-Escobar V, Yañez-Morales M, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2005. *Cercospora agavicola* a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. *Mycotaxon* 93:115-121. <https://www.researchgate.net/publication/25481243>
- Carmona M, Moschini RC, Cazenave G y Sautua F. 2010. Relación entre la precipitación registrada en estados reproductivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikuchii*. *Tropical Plant Pathology* 35:71-78. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762010000200001&script=sci_abstract&tlng=es
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p.
- Chuang TY. and Jeger MJ. 1987. Predicting the rate of development of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) disease in southern Taiwan. *Phytopathology* 77: 1542-1547.
- Coakley SM, McDaniel LR and Shaner G. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75: 1245-1251.
- Daud ME and Ehrenshaft M. 2000. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* 38: 461-490. doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461.
- Franco-Navarro F y Zavaleta-Mejía E. 2001. Estado actual del conocimiento acerca del modo de acción de las toxinas no selectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(2): 237-244
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, López-Javier MA y González-

- Gómez R. 2017. APPS como herramientas de soporte epidemiológico aplicado a sistemas regionales de vigilancia epidemiológica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 178-179. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Hernández-Sánchez E, Mora-Aguilera G, Tlalpal-Bolaños B, Rodríguez-Leyva E y Alvarado-Rosales D. 2014. Effect of initial disease intensity of cactus black spot (*Opuntia ficus-indica*) in temporal and spatial characterization. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 132-146. http://rmf.smf.org.mx/Vol322014/AR/32-2_05.pdf
- Jens AE, Daub ME and Upchurch RG. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79: 213-219. DOI: 10.1094/Phyto-79-213.
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñalosa B, Coria-Contreras J, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Kurppa A. 1985. Reaction of spring barley cultivars grown in Finland to soil-borne infection by *Bipolaris sorokiniana* and to its toxic metabolites. *Journal of Agricultural Science in Finland* 57: 85-96. <file:///C:/Users/Editor%20en%20Jefe%20-%20RMF/Downloads/72189-Article%20Text-96272-1-10-20180618.pdf>
- Liljeroth E, Franzon-Almgren I, and Gustafsson M. 1994. Effect of prehelminthosporol, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana*, on barley roots. *Canadian Journal of Botany* 72: 558-563. <https://doi.org/10.1139/b94-074>
- Ludwig RA. 1957. Toxin production by *Helminthosporium sativum* and its significance in disease development. *Canadian Journal of Botany* 35: 291-304. <https://doi.org/10.1139/b57-026>
- Mora-Aguilera G y Acevedo-Sánchez G. 2016. Desarrollo de REG-NCafé v1.0 para determinar n-sitios de monitoreo-muestreo regional de roya del café en México usando criterios epidemiológicos ponderados. *Acta del 49° Congreso Brasileiro de Fitopatología*; 29 ago - 01 sep; Alagoas, Maceio, Brasil.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, González-Gómez R, López-Buenfil A y Javier-López MA. 2015. Alertas tempranas regionales para manejo de focos de roya del café en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(S): 62. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Coria-Contreras J, Flores-Sánchez J, Domínguez-Monje S, Acevedo-Sánchez G, Aguilar-Pérez L, Martínez-Bolaños M y Guzmán-Deheza A. 2014. Desarrollo y validación de una trampa pasiva para monitoreo de esporas de *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(S): 83. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Mora-Aguilera G, Nieto AD, Campbell CL, Téliz D, and García E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86:70-78. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.pdf
- Mora-Aguilera G, Téliz D, Nieto D, and Campbell CL. 1993. Development and validation of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, México. *Plant Disease* 77:1205-1211. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.pdf
- Quezada-Salinas A, Sandoval-Islas JS, Alvarado-Rosales D y Moreno-Velázquez, M. 2013. Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. *Rev. Mex. Micología* 38: 9-18. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802013000200003&lng=es&tln=es.
- Rubio CR. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Pp. 170-195. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de Denominación de Origen del Tequila. Rulfo VFO (ed.). Libro Técnico 4. INIFAP. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.
- SIAP. 2015 y 2018. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consultado enero 2015 y abril 2018).
- Sambrook JF and Russell DW (Eds). 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2100p. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Santana-Peñalosa B, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, Mora-Aguilera G, González-Gómez R y López-Buenfil A. 2015. CALCULA-HF V.1.0: Estimación de horas favorables de inductividad epidémica debido a la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(S): 117. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- SENASICA. 2017. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Manual operativo de la campaña contra plagas reglamentadas del agave. Dirección de Protección Fitosanitaria. Clave: MOP-DPF-PRAV. <http://www.sivea.org.mx/>
- Vanderplank JE. 1984. *Disease Resistance in Plants*. 2ed. Academic Press Inc. London. 208p.
- Valencia BA. 2011. Evolución histórica y situación actual de la mancha gris en el cultivo del Agave azul tequilero. *In: 1er Foro de discusión fitosanitaria en el cultivo del agave azul tequilero integrando esfuerzos para impulsar bienestar en el sector*. 31 de may-01 jun Guadalajara, Jalisco, México. <https://www.crt.org.mx/images/documentos/MEMORIA1erFORODEDISCUSIONFITOSANITARIA%28FINAL%29.pdf>
- White TJ, Brüns T, Lee S, Taylor J, Innis A, Gelfand HD and Sninsky J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ. (Eds). Academic Press, Inc. New York.

A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction

Un nuevo enfoque molecular en el estudio de la interacción parásito-hospedero

Roberto Padilla-Ramos, UAZ-Unidad Académica de Ciencias Biológicas; **Silvia Salas-Muñoz**, CONACYT-INIFAP, Km. 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo CP 98500. México; **Rodolfo Velásquez-Valle**, **Luis Roberto Reveles-Torres***, INIFAP-Campo Experimental Zacatecas, km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo CP 98500. México. *Autor para correspondencia: reveles.roberto@inifap.gob.mx

Recibido: 04 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 26 de Octubre, 2018.

Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R and Reveles-Torres LR. 2018. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 95-114.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-6

Primera publicación DOI: 17 de Noviembre, 2018.

First DOI publication: November 17, 2018.

Resumen. Los efectores, se han convertido en el eje fundamental de las investigaciones relacionadas a la interacción de los parásitos y sus hospederos, la manera en como regulan a nivel molecular los procesos de infección, y la forma en cómo estas moléculas han evolucionado, parecen ser las cuestiones más importantes que se tendrán que abordar en los siguientes años. Estas nuevas líneas de investigación, quedarán supeditadas al enorme progreso que tendrán la siguiente generación de tecnologías de secuenciación, y con ellas un cambio de paradigma en nuestra visión de los sistemas complejos. Sin embargo, aún quedan muchas cuestiones por dilucidar acerca de los efectores, por ejemplo,

Abstract. Effectors have become the cornerstone of all investigations related to the interaction of parasites and their hosts, how they regulate the processes of infection at a molecular level, and how these molecules have evolved seem to be the most important issues that will have to be addressed in the following years. These new lines of research will be subject to the enormous progress that the next generation of sequencing technologies will have, and with them a paradigm shift in our vision of complex systems. However, there remain many questions to be elucidated about effectors, for example, how these proteins interact spatially and temporally in their hosts, possible co-operation between effectors, and the existence of protein complexes within host cells. This leads to the following questions: Do the effectors have the capacity for phenotypic expression beyond the genes that encode them? And above all, why are these proteins so widespread on a huge range of evolutionarily distant pathogens?

Key words: coevolution, virulence, parasitism.

la manera en como estas proteínas interactúan de forma espacial y temporal en sus anfitriones, la posible cooperación entre los efectores, y la existencia de complejos proteicos dentro de las células huésped. De ello surgen las siguientes preguntas: ¿Los efectores tienen la capacidad de expresión fenotípica más allá de los genes que los codifican?, y sobre todo ¿Por qué estas proteínas se encuentran tan extendidas sobre una enorme gama de patógenos evolutivamente distantes?

Palabras clave: coevolución, virulencia, parasitismo

Los parásitos interactúan con sus huéspedes por medio de proteínas especiales, las cuales tienen efectos tanto en las células donde inciden como en los fenotipos de sus huéspedes. Los estudios de la interacción entre estas proteínas y el proceso de patogénesis se encuentran en rápido crecimiento dentro de la fitopatología en general, esto nos obliga a mantener actualizado el conocimiento de este enfoque emergente.

Relación parásito- hospedero. Cuando hablamos de la relación hospedero-parásito estamos tratando un tipo de asociación de dos protagonistas que desempeñan funciones activas y fundamentales. Sabemos que el parásito depende metabólicamente del hospedero; entre ellos se establece contacto biológico e intercambio molecular, donde se crea una relación mutua entre la defensa del hospedero y el ataque del parásito. Entre esta lucha armamentista, un éxito de los parásitos es la modulación que producen sus “efectores” sobre las defensas del hospedero; mediante el que, de forma potencial, ocasiona acciones patógenas o modificaciones del equilibrio homeostático del hospedero y de la respuesta adaptativa de su sistema inmune.

Parasites interact with their hosts through special proteins that have effects both on the cells they invade and on the host’s phenotype. Studies of the interaction between these proteins and the pathogenetic process are rapidly increasing within phytopathology in general and, therefore, we must keep our knowledge of this emerging approach up to date.

Parasite-host relationship. When referring to a host-parasite relationship, we mean a type of association between two players that perform active and essential roles. We know that a parasite depends metabolically and evolutionarily on its host, because they establish biological contact and molecular exchange to create a mutual relationship between the host’s defense and the parasite’s attack. In this arms race, parasites succeed because of the modulation produced by their “effectors” on the host’s defenses, potentially causing pathogenic actions or changes to the host’s homeostatic balance and adaptive response of its immune system.

Plant parasites and pathogens reprogram the host’s development and morphology (Le Fevre *et al.*, 2015), and in this way the effector proteins of certain bacteria, such as phytoplasmas, modify the ecosystem architecture (Tomkins *et al.*, 2018). Phytoplasmas cause phyllody in the host plants, supposedly to attract the insect vectors on which these bacteria’s transmission depends. Phytoplasma effectors in insects such as SAP54 improve their capacity to infect plants, and pathogens have a competitive advantage because their life cycle is extended (Sugio *et al.*, 2011). Certain effectors, identified as PexRD54 for the first time in *Phytophthora infestans*, cause cell death in plant tissue of *Nicotiana benthamiana* (Białas *et al.*, 2017) when the effectors are overexpressed as mature proteins. These are only some examples of the multiple studies that have revealed the

Los parásitos y patógenos de las plantas reprograman el desarrollo y morfología del hospedero (Le Fevre *et al.*, 2015), y con esto las proteínas efectoras de ciertas bacterias como los fitoplasmas modifican la arquitectura del ecosistema (Tomkins *et al.*, 2018). Los fitoplasmas inducen filodia en sus plantas hospederas, presumiblemente para atraer insectos vectores de los que dependen estas bacterias para su transmisión. Los efectores de fitoplasmas en insectos como (SAP54), mejoran la aptitud de éstos para que tengan mayor capacidad de infectar plantas, teniendo los patógenos una ventaja competitiva al extender su tiempo de vida (Sugio *et al.*, 2011). Ciertos efectores identificados por primera vez en *Phytophthora infestans* como *PexRD54*, activan la muerte celular del tejido vegetal de *Nicotiana benthamiana* (Białas *et al.*, 2017) cuando se sobreexpresan como proteínas maduras. Estos son solo algunos ejemplos de múltiples estudios que han podido revelar el funcionamiento molecular de los efectores como moduladores del metabolismo y de la expresión génica del hospedero. Otro sistema molecular que se ha vuelto un objetivo común de los parásitos, es el sistema de ubiquitinación, un sistema de regulación génica postraduccional, que en este caso es utilizado por éstos para degradar la inmunidad del hospedero, y así alterar la fisiología celular en beneficio del parásito invasor. La ubiquitina es una proteína pequeña que se une covalentemente a los residuos de lisina de otra proteína con la cual queda esta “marcada” para ser degradada por vía del proteosoma 26S. Ciertos patógenos han evolucionado para identificar y explotar las debilidades en este sistema, proporcionando una mayor capacidad patogénica al afectar las vías de ubiquitina en las plantas (Banfield, 2015).

La resistencia de los hospederos a las enfermedades dependerá de la interacción específica de los genes de resistencia (*R*) con los correspondientes genes de avirulencia (*Avr*). Se ha sugerido que los

molecular function of effectors as modulators of the host’s metabolism and gene expression. Another molecular system that has become a common target of parasites is the ubiquitination system, a post-translational gene regulation system which, in this case, is used by parasites to degrade the host’s immunity and alter its cell physiology, which benefits the invading parasite. Ubiquitin is a small protein that covalently binds to the lysine residues of other proteins, thereby “marking” them for degradation via the 26S proteasome. Certain pathogens have evolved to identify and exploit the weaknesses of this system and this has led to a greater pathogenic capacity to affect ubiquitin pathways in plants (Banfield, 2015).

Host resistance to diseases depends on the specific interaction between the resistance genes (*R*) and the corresponding avirulence genes (*Avr*). It has been suggested that the *R* genes encode for receptors that interact with ligands for the corresponding avirulence genes (De la Concepcion *et al.*, 2018). Some host genes encode for effector protein recognition, such as the *Solanum pimpinellifolium* and *Nicotiana paniculata* *MEcp2* gene that identifies the *Ecp2* effector of parasitic fungi of the Capnodiales class (*Cladosporium fulvum*) (Dagdas *et al.*, 2016). It also seems that the phyllody (leaf-shaped flowers) produced by effector proteins (effector SAP54) on phytoplasmas is genetically related to a strong preference for insect-egg laying on plants infected by these bacteria. These facts lead us to believe that the changes in morphology are adaptive and that the parasite and host genomes will be jointly selected by evolution (Amselem *et al.*, 2015). Other avirulence genes (such as *AvrK1* and *AvrA10*) encode for effector proteins in the fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*), which increase their pathogenicity in barley plants (Di *et al.*, 2017). Studies of rust fungi that affect many economically

genes *R* codifican para receptores que interactúan con ligandos para los correspondientes genes de avirulencia (De la Concepcion *et al.*, 2018). Algunos genes en los hospederos codifican para el reconocimiento de proteínas efectoras como el gen *MEcp2* de *Solanum pimpinellifolium* y *Nicotiana paniculata* que identifica al efector Ecp2 de hongos parásitos de la clase Capnodiales (*Cladosporium fulvum*) (Dagdas *et al.*, 2016). También parece que la filodia (flor en forma de hoja) producida por proteínas efectoras (efector SAP54) en fitoplasmas, esta genéticamente relacionada con una mayor preferencia de puesta de huevos de insectos en las plantas infectadas por estas bacterias. Estos hechos nos hace suponer que los cambios en la morfología son adaptativos, así los genomas de parásitos y hospederos serán seleccionados en conjunto por la evolución (Amselem *et al.*, 2015). Otros genes de avirulencia como *AvrK1* y *Avra10* codifican proteínas efectoras en el hongo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) que aumentan su patogenicidad en plantas de cebada (Di *et al.*, 2017). Estudios en los hongos de la roya que afectan muchas plantas de importancia económica como el café y la soja, han servido como excelentes modelos para comprender los mecanismos que sustentan la patogénesis, como en el caso del agente patógeno de la roya *Melampsora lini*, cuyos estudios demuestran como las secuencias que codifican los efectores, están conservados en todos los genomas de estas especies para promover la infección (Nemri *et al.*, 2014), lo que nos habla del papel tan importante de los efectores en la interacción parasito-hospedero.

El fenotipo extendido. El concepto de fenotipo extendido (genes cuyos efectos llegan más allá de las células en las que residen) presentado por Richard Dawkins en su libro clásico “El fenotipo extendido” (Dawkins, 2016) resume perfectamente la visión de que los efectores actúan fuera de los parásitos. Los efectores son los productos de los genes

important plants such as coffee and soybean have served as excellent models for understanding the mechanisms that support pathogenesis, such as *Melampsora lini*, a rust pathogen, whose studies have shown how the sequences that encode for effectors are conserved in the genome of all these species and promote infection (Nemri *et al.*, 2014), a fact that highlights the important role effectors play in the parasite-host interaction.

The extended phenotype. The concept of the extended phenotype (genes whose effects go beyond the cells in which they reside), introduced by Richard Dawkins in his classic book *The Extended Phenotype* (Dawkins, 2016), perfectly summarizes the idea that effectors act outside of parasites. Effectors are produced by genes residing in the pathogen’s genome, but they actually act in the interface with the host plant, or even inside the plant cells, providing an example of Dawkin’s extended genotype (Kamoun, 2007). Parasites can infect their hosts and cause severe changes in their appearance and performance, which are usually interpreted as being extended phenotypes that promote the parasite’s survival and ability (Le Fevre *et al.*, 2015).

Some phytoplasmas that infect plants, such as *Candidatus Phytoplasma trifolii*, produce phyllody, supposedly to attract the insect vectors on which these bacteria depend for transmission (MacLean *et al.*, 2014). However, the question remains as to whether plant morphological phenotypes, such as phyllody, directly benefit the vectors or whether they are secondary products of phytoparasitic infections (Hughes *et al.*, 2012) (Figure 1).

MacLean *et al.* (2014) found that the SAP54 effector of phytoplasma induces phyllody in host cells, creating ecological niches to promote the vector’s colonization, and that these modifications in the host can be considered as being an extended phenotype caused by these proteins.

que residen en los genomas de patógenos, pero que en realidad funcionan en la interfaz con la planta huésped o incluso dentro de las células vegetales, proporcionando un ejemplo del fenotipo extendido de Dawkins (Kamoun, 2007). Los parásitos pueden infectar a sus hospederos y desencadenar cambios severos en su apariencia y en el comportamiento que normalmente se interpretan como fenotipos extendidos para promover la supervivencia y la aptitud del parásito (Le Fevre *et al.*, 2015).

Algunos fitoplasmas como *Candidatus Phytoplasma trifolii* que infectan plantas, inducen filodia, presumiblemente para atraer insectos vectores de los que dependen estas bacterias para su transmisión (MacLean *et al.*, 2014). Sin embargo, sigue siendo discutible si los fenotipos morfológicos de los vegetales como la filodia, son directamente beneficiosos para los vectores, o son productos secundarios de la infección por fitoparásitos (Hughes *et al.*, 2012) (Figura 1).

Incidence in the host cell. Many pathogen effectors are extraordinary examples of biological innovation and include some of the most important proteins known to function within plant cells, as shown in the diagram (Figure 2). Some of these effector proteins can even be specifically directed towards defense mechanisms that provide immunity against pathogen virulence genes, such as the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector (McCann, 2016). Plant bacteria, fungi, oomycetes and nematodes have developed the ability to manage effector proteins within host cells using different mechanisms (Hogenhout *et al.*, 2009).

Biotrophic fungi and oomycetes have developed haustoria to manage effector proteins within the host cell (Whisson *et al.*, 2007). Phytoparasitic nematodes use a specialized feeding organ known as a stylet to inject their effector proteins into a parasitized vascular cell (Davis *et al.*, 2008).



Figura 1. Estructuras florales sanas de *Catharanthus roseus* (A), con filodia y virescencia causada por *Candidatus Phytoplasma trifolii* (B).

Figure 1. (A) Healthy structures of *Catharanthus roseus* flowers, and (B) with phyllody and virescence caused by *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

MacLean *et al.* (2014) encontraron que el efector SAP54 de fitoplasma, induce filodia en las células huésped creando nichos ecológicos para promover la colonización por el vector, entendiendo estas modificaciones en el huésped como un fenotipo extendido producido por estas proteínas.

Incidencia en la célula huésped. Muchos efectores de patógenos son ejemplos extraordinarios de innovación biológica e incluyen algunas de las proteínas más notables conocidas que funcionan dentro de las células vegetales, tal como se muestra en el diagrama (Figura 2). Algunas de estas proteínas efectoras pueden incluso dirigirse de forma específica a mecanismos de defensa conservados para la inmunidad contra genes de virulencia de patógenos, como el efector Avr2 de *Fusarium oxysporum* (McCann, 2016). Las bacterias, hongos, oomicetos, y nematodos patógenos de las plantas han desarrollado la capacidad de administrar proteínas efectoras dentro de las células huésped a través de una diversidad de mecanismos (Hogenhout *et al.*, 2009).

Los hongos biotróficos y los oomicetos han desarrollado haustorios para administrar proteínas efectoras dentro de la célula huésped (Whisson *et al.*, 2007). En el caso de los nematodos fitoparásitos utilizan un órgano especializado de alimentación conocido como el estilete, para inyectar sus proteínas efectoras dentro de una célula vascular parasitada (Davis *et al.*, 2008).

Algunas proteínas fúngicas, en particular la toxina selectiva ToxA del hospedero de *Pyrenophora tritici-repentis*, no requiere del patógeno para trasladarse dentro de las células vegetales (Sarma *et al.*, 2005). ToxA viaja dentro de las células huésped presumiblemente mediante la designación de un receptor de superficie vegetal que se une a un motivo proteínico conformado por los aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato. Otros efectores pueden suprimir la capacidad de autofagia selectiva en el

Some fungi proteins, particularly the selective toxin ToxA from the *Pyrenophora tritici-repentis* host, do not need the pathogen to move within plant cells (Sarma *et al.*, 2005). ToxA moves within the host cells supposedly by designating a plant area receptor that binds to a protein motif formed by arginine-glycine-aspartate amino acids. Other effectors can suppress the host's selective autophagy –plants use autophagy to protect themselves against pathogens– but how parasites are involved in these cell processes is still not known (Dagdas *et al.*, 2016). One example of autophagy suppression is the PexRD54 effector produced by *Phytophthora infestans*, the causal agent of potato late blight (Washington *et al.*, 2016).

Other effectors act in the apoplast. Some effectors act in the extracellular space of the plant-microbe interface, where they interfere with the plant's apoplastic defenses and facilitate infection (Misas-Villamil and Van der Hoorn, 2008). These examples include the protein effectors secreted by *Cladosporium fulvum* (Cooke), which is an extracellular parasitic fungus found on tomato leaves that only grows in the apoplast and does not form haustorial structures (Thomma *et al.*, 2005). All the known *Cladosporium fulvum* effectors (Avr2, Avr9, Avr4 and ECP2) are proteins rich in cysteine amino acid, which are believed to act exclusively in the apoplast (Thomma *et al.*, 2005). Oomycetes such as *Phytophthora infestans* secrete apoplastic effectors as well as displacement effectors (cytoplasmic) in their hosts (Damasceno *et al.*, 2008).

A common activity attributed to many *Cladosporium fulvum* apoplastic effects, as well as to other fungal pathogens and oomycetes, is the ability to protect themselves against plant hydrolytic enzymes such as proteases, glucanases and chitinases (Misas-Villamil and Van der

hospedero, las plantas usan la autofagia para protegerse contra los patógenos, no obstante aún se desconoce cómo los parásitos interfieren en estos procesos celulares (Dagdas *et al.*, 2016). Un ejemplo de supresión de autofagia es el efector PexRD54 producido por *Phytophthora infestans* que produce la enfermedad de “Tizón tardío de la papa” (Washington *et al.*, 2016).

Hoorn, 2008), which are the host plant’s defense mechanisms against exogenous agents such as parasites.

The *C. fulvum* Avr2 effector counteracts defense mechanisms because it is a cysteine-protease inhibitor directed at the Rcr3 and PIP1 tomato apoplastic enzymes, cysteines and proteases (van Esse *et al.*, 2008). *Phytophthora infestans*

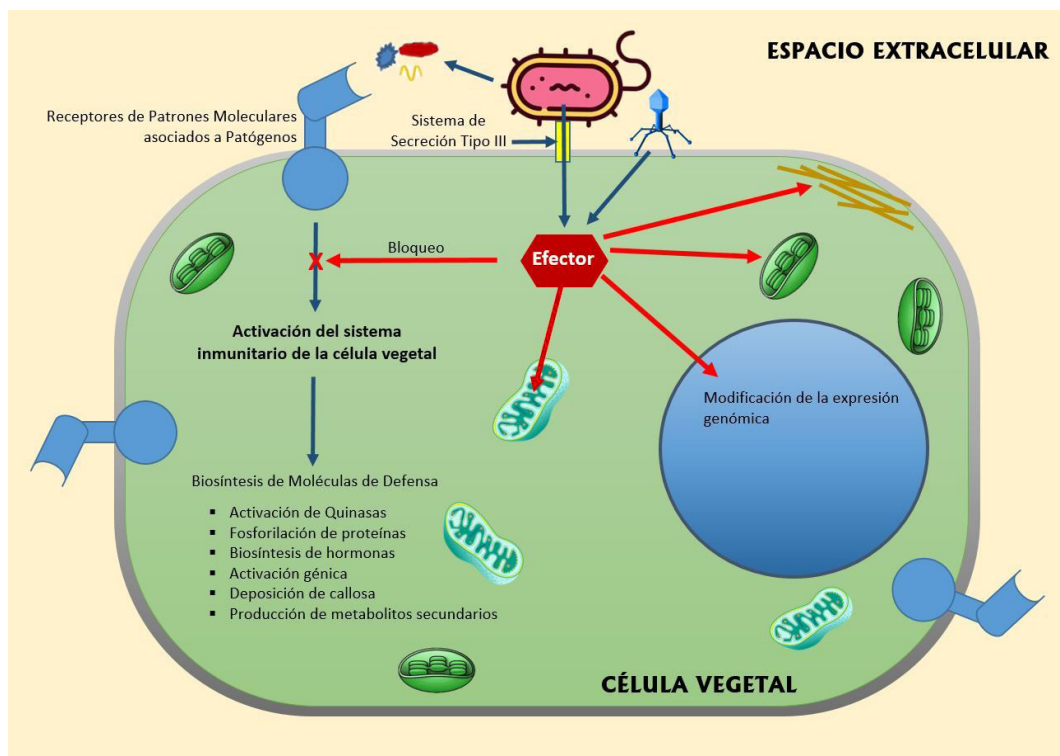


Figura 2. Vías de los efectores secretados por patógenos en el interior de células vegetales de la planta hospedera. Los patógenos pueden inyectar sus efectores a través del Sistema de Secreción tipo III hacia el citoplasma de la célula vegetal. Según el tipo de efector, este puede bloquear la activación del sistema inmune de la célula vegetal, el cual es mediado por los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos. Otro tipo de efectores pueden alterar cloroplastos, mitocondrias o al citoesqueleto de la célula hospedera en favor de la colonización del patógeno. Asimismo, los efectores pueden modificar la expresión genómica para la producción de proteínas que beneficien la patogenicidad.

Figure 2. Pathways of effectors secreted by pathogens inside the cells of the host plant. Pathogens can inject their effectors into the plant cell cytoplasm through the type III secretion system. Depending on the type of effector, they can block the immune system of the plant cell, which is mediated by the receivers of molecular patterns associated with pathogens. Other types of effectors can alter the chloroplasts, mitochondria and cytoskeleton of the host cell to facilitate pathogen colonization. Effectors are also able to modify genomic expression to produce proteins that benefit pathogenicity.

Otros efectores actúan en el apoplasto. Algunos efectores actúan en el espacio extracelular en la interface planta-microbio, donde interfieren con las defensas apoplásticas de la planta para infectarla (Misas-Villamil y Van der Hoorn, 2008). Los ejemplos incluyen los efectores proteicos secretados por *Cladosporium fulvum* (Cooke); este hongo es un parásito extracelular de hojas de tomate que crece exclusivamente en el apoplasto y no forma estructuras haustorias (Thomma *et al.*, 2005). Todos los efectores conocidos de *Cladosporium fulvum*, tales como Avr2, Avr9, Avr4 y ECP2, son proteínas ricas en el aminoácido cisteína, que se cree que funcionan exclusivamente en el apoplasto (Thomma *et al.*, 2005). Los oomicetos, tales como *Phytophthora infestans* segregan efectores apoplásticos además de efectores de desplazamiento (citoplásmicos) en sus hospedadores (Damasceno *et al.*, 2008).

Una actividad común atribuida a muchos efectores apoplásticos de *Cladosporium fulvum* y otros patógenos fúngicos y de oomicetos es su capacidad para protegerse contra enzimas hidrolíticas de plantas, tales como proteasas, glucanasas y quitinasas (Misas-Villamil y Van der Hoorn, 2008), las cuales son mecanismos de defensa de la planta hospedera contra agentes exógenos tales como los parásitos.

El efector Avr2 de *C. fulvum* contrarresta los mecanismos de defensa, ya que es un inhibidor de cisteína-proteasa dirigido a las enzimas cisteínas proteasas apoplásticas Rcr3 y PIP1 de tomate (van Esse *et al.*, 2008). *Phytophthora infestans* también secreta inhibidores de cisteína proteasa, tales como EPIC2B, que inhibe a la enzima PIP1 y otras proteasas apoplásticas de tomate (Tian *et al.*, 2007). Además, produce los efectores EPI1 y EPI10, que son inhibidores de la enzima serina-proteasa que se une e inhibe la proteína P69B relacionada con la patogénesis de *Phytophthora infestans*. Esta serina-proteasa es similar a la subtilisina del tomate que se cree funciona en mecanismos de defensa

also secretes protease-cysteine inhibitors, such as EPIC2B, which inhibits the PIP1 enzyme and other tomato apoplastic proteases (Tian *et al.*, 2007). It also produces EPI1 and EPI10 effectors, which are serine-protease enzyme inhibitors that bind to and inhibit the P69B protein that is related to *Phytophthora infestans* pathogenesis. This serine-protease is similar to tomato subtilisin which is believed to act in defense mechanisms against pathogens (Tian *et al.*, 2005). The genus *Phytophthora* spp. is also known to secrete glucanase inhibitors that inhibit the host's apoplastic enzyme endo- β -1,3 glucanase (Damasceno *et al.*, 2008).

Multiple targets in the cells of the host. Van der Hoorn and Kamoun defined operational targets as those host targets which, when manipulated by effectors, result in an altered defense or susceptible state. Therefore, it is important to distinguish operational targets from other types of host targets. These principles led to the idea that some decoy proteins of the host are not operational targets but that when disrupted by the effectors, they result in the host being recognized by the effector's similar R proteins (van der Hoorn and Kamoun, 2008). The *Pseudomonas syringae* (Hall) AvrRpt2 protein is an effector of the T3SS type, which is a system that forms multiproteic complexes that prevent the presence of the effector in the extracellular medium; as a result, substrates are secreted by the plant cytoplasm into the extracellular medium with proteolytic activity against at least five *Arabidopsis* proteins, including the negative defense regulator RIN4_ (Chisholm *et al.*, 2006). AvrPto, another *Pseudomonas syringae* T3SS effector, is a kinase inhibitor that disables tomato Pto kinase (Xing *et al.*, 2007). Other examples of multiple targets include Avr2 and EPIC2B protease inhibitors, which inhibit several tomato apoplastic proteases (van Esse *et al.*, 2008).

contra patógenos (Tian *et al.*, 2005). El género *Phytophthora* spp es también conocido por secretar inhibidores de glucanasa que inhiben la enzima apoplásica del hospedero endo- β - 1,3 glucanasa (Damasceno *et al.*, 2008).

Objetivos múltiples en las células del hospedero.

Van der Hoorn y Kamoun definieron los objetivos operativos como aquellos objetivos del hospedero que, cuando son manipulados por los efectores, resultan en un estado alterado de defensa o susceptibilidad. Por lo tanto, es importante distinguir los objetivos operativos de otros tipos de objetivos del hospedero. Estos principios condujeron al concepto de que algunas proteínas señuelo del hospedero, no son objetivos operativos, pero que, cuando son perturbadas por los efectores, desencadenan el reconocimiento del hospedero por las proteínas R afines del efector (van der Hoorn y Kamoun, 2008). La proteína AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* (Hall) es un efector del tipo T3SS, el cual es un sistema que forma complejos multiproteicos que evitan la presencia del efector en el medio extracelular, por lo que los sustratos son secretados desde el citoplasma vegetal hasta el medio extracelular, con actividad proteolítica contra al menos cinco proteínas de *Arabidopsis*, incluyendo el regulador de defensa negativo RIN4 (Chisholm *et al.*, 2006). AvrPto, otro efector de T3SS de *Pseudomonas syringae*, es un inhibidor de quinasa que inhabilita la quinasa Pto de tomate (Xing *et al.*, 2007). Otros ejemplos de objetivos múltiples incluyen los inhibidores de proteasa Avr2 y EPIC2B, los cuales inhiben varias proteasas apoplásicas de tomate (van Esse *et al.*, 2008).

Cada interacción de un efector y una proteína del hospedero pueden ser benéficas para el patógeno, tener consecuencias negativas o tener efectos neutrales en la interacción entre el patógeno y la planta (Cuadro 1).

Each interaction between an effector and a host protein can benefit the pathogen and have negative consequences or neutral effects on the pathogen-plant interaction (Table 1).

Molecular mimicry. Effectors produce analogous and imitators of plant hormones (Hogenhout *et al.*, 2009). An example of this is coronatine, a toxin secreted by several repetitive genes of the *Pseudomonas syringae* genome, which is a structural and functional imitator of the jasmono-iso-leucine (JA-ile) vegetal hormone (Bender *et al.*, 1999). Coronatine has effects that improve plant bacterial colonization. Its effects include phytohormone saturation, which stops inducing the salicylic acid-mediated resistance response, and causes the plants' stomata to open more, which in turn increases host infection. Other classic cases of hormone mimicry in plant pathogens include auxins and cytokinesins produced by different bacteria, such as *Agrobacterium* (Costacurta and Vanderleyden, 1995). There are also modified cytokinins produced by *Rhodococcus fascians* (Tilford) and *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima) fas operons (Hogenhout and Loria, 2008), and altered gibberellins produced by several fungi (Kawaide, 2006), such as *Gibberella fujikuroi*, a pathogen that affects rice seedlings (Tudzynski, 1999).

Besides hormone mimicry, effectors also include several surprising examples of molecular mimicry. The C-terminal region of the AvrPtoB effector of *Pseudomonas syringae* was found to be a structural and functional imitator of E3 ubiquitin-ligases in eukaryotes (Janjusevic *et al.*, 2006). Degradation mediated by AvrPtoB of Fen kinase of the target host depends on the activity of the E3 ubiquitin ligase of AvrPto (Rosebrock *et al.*, 2007).

Another example of molecular mimicry is the *Xanthomonas vesicatoria* Type III AvrBs3 effector

Cuadro 1. Proteínas efectoras que se reportan en estudios de interacción entre patógenos y plantas hospederas.
Table 1. Effector proteins reported in previous studies of pathogen-host plant interaction.

| Organismo | Efector (proteína) | Función en el hospedero (Objetivos operativos) | Referencia |
|---|-------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Cladosporium fulvum</i> (hongo) | Ecp2 | Reconocimiento de secuencias específicas | (Dagdas <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> (Bacteria) | SAP54 | Cambios en la morfología de la planta, inducen fenotipos adaptativos para los vectores (filodia). | (Amselem <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Blumeria graminis f.sp</i> (hongo) | AvrK1 y AvrA10 | Codifican proteínas que aumentan su patogenicidad en plantas de cebada. | (Di <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Avr2 | Interfieren de forma específica a mecanismos de defensa conservado para la inmunidad contra genes de virulencia de patógenos. | (McCann, 2016) |
| <i>Phytophthora infestans</i> | PexRD54 | Suprime la capacidad de autofagia selectiva en el huésped, las plantas usan la autofagia para protegerse contra los patógenos. | (Washington <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Cladosporium fulvum</i> (hongo) | Avr2, Avr9, Avr4 y ECP2 | Actúan en el espacio extracelular en la interface planta-microbio, donde interfieren con las defensas apoplásticas de la planta para infectarla. | (Thomma <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | AvrRpt2 | Actividad proteolítica contra al menos cinco proteínas de <i>Arabidopsis</i> , incluyendo el regulador de defensa negativo RIN4. | (Chisholm <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Xanthomonas vesicatoria</i> | AvrBs3 | Actúa como un activador transcripcional, uniéndose a una secuencia promotora. | (Römer <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | HopAF1 | Suprime la inmunidad de la planta, este efector se encuentra en los genomas de muchas bacterias de este tipo y posiblemente esté relacionado con la proteína deamidasada. | (Hughes y Banfield, 2014) |
| Orden <i>Tylenchida</i> (nematodos) | | Reprograman el desarrollo y la inmunidad en la planta. | (Lilley <i>et al.</i> , 2018) |
| <i>Phytophthora sojae</i> | Avr1b | Suprime la muerte celular programada. | (Dou <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Xanthomonas vesicatoria</i> | AvrBs3 | Hipertrofia celular. Se cree que estas lesiones cancerosas facilitan la liberación bacteriana del tejido infectado y aumentan su diseminación. | (Kay <i>et al.</i> , 2007) |

Mimetismo molecular. Los efectores producen análogos e imitadores de hormonas vegetales (Hogenhout *et al.*, 2009). Un ejemplo es la coronatina, una toxina secretada por varios genes repetitivos del genoma de *Pseudomonas syringae*, esta toxina es un imitador estructural y funcional de la hormona vegetal jasmonoil-isoleucina (JA-ile) (Bender *et al.*, 1999). La coronatina tiene efectos que mejoran la colonización bacteriana de las plantas. Estos incluyen la saturación de fitohormonas, conduce al cese de la inducción en la respuesta de resistencia mediada por ácido salicílico, lo que provoca el au-

which travels to the cell nucleus, where it acts as a transcriptional activator and binds to a conserved sequence promoter of the *Xanthomonas vesicatoria* genome, called upa box (Römer *et al.*, 2007). Given that this box is also conserved in different genes of the pepper genome (*Piper nigrum*), it is believed that AvrBs3 imitates one of the host's transcription factors (not yet discovered), which also points to this promoter sequence. Results of several studies have revealed that phytoparasitic nematodes secrete a series of proteins that imitate plant effectors, which allows the expression of

mento de la apertura de los estomas de las plantas, lo que provoca un incremento de la infección del hospedero. Otros casos clásicos de mimetismo de fitohormonas en patógenos de plantas, incluyen auxinas y citoquinas producidas por diversas bacterias, incluyendo a *Agrobacterium* (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Igualmente existen citoquinas modificadas producidas por los operones *fas* de *Rhodococcus fascians* (Tilford) y *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima) (Hogenhout y Loria, 2008), y giberelinas alteradas producidas por varios hongos (Kawaide, 2006) tales como *Gibberella fujikuroi*, patógeno de plántulas del arroz (Tudzynski, 1999).

Además del mimetismo hormonal, los efectores representan también varios ejemplos sorprendentes de mimetismo molecular. La región C-terminal del efector AvrPtoB de *Pseudomonas syringae*, resultó ser un imitador estructural y funcional de ubiquitina-ligasas E3 en eucariotas (Janjusevic *et al.*, 2006). La degradación mediada por AvrPtoB de la quinasa Fen del hospedero objetivo depende de la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 de AvrPto (Rosebrock *et al.*, 2007).

Otra demostración de mimetismo molecular es el efector AvrBs3 de tipo III de *Xanthomonas vesicatoria* el cual viaja al núcleo de la célula, donde actúa como un activador transcripcional, uniéndose a una secuencia promotora conservada del genoma de *Xanthomonas vesicatoria* llamada la caja upa (Römer *et al.*, 2007). Debido a que esta caja se conserva en varios genes también del genoma de la pimienta (*Piper nigrum*), se cree que el AvrBs3 imita un factor de transcripción del hospedero aún no descubierto, que también apunta a esta secuencia promotora. Los trabajos de varias investigaciones han revelado que los nematodos fitoparásitos secretan una batería de proteínas que imitan a efectores vegetales, lo que permite expresar genes vegetales que ayudan a la colonización del patógeno (Cai *et al.*, 2008).

plant genes that favor colonization by the pathogen (Cai *et al.*, 2008).

Suppressing plant immunity. Suppression of a plant's innate immunity has emerged as the primary function of effectors, particularly of T3SS effectors of plant pathogenic bacteria (Zhou and Chai, 2008). Some effectors, such as *Pseudomonas syringae* HopAF1, suppress a plant's immunity; this effector is found in the genomes of many bacteria of this type and may be related to the deamidase protein, since deamidation is the irreversible substitution of an amide group by a carboxylate group (Hughes and Banfield, 2014). The *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) pathogen translocates effector proteins to suppress host plant immunity (Wirthmueller *et al.*, 2018). The way in which these effectors act to produce virulence is by suppressing the basal defense of the host plant's immune system by not recognizing the molecular pattern associated with pathogens (known as PAMPs), which is one of the defense systems of plant cells (Kim *et al.*, 2005). Some species of plant parasitic nematodes of the *Tylenchida* order secrete effector proteins into their hosts during the infection process in order to reprogram the plant's development and immunity (Lilley *et al.*, 2018).

Other T3SS effectors of phytopathogenic bacteria suppress hypersensitive cell death caused by several Avr proteins, a fact that in some cases explains previous observations of epistatic interactions among Avr genes (Abramovitch *et al.*, 2006). The T3SS effectors are directed towards three plant processes that are essential for innate immunity, i.e., protein rotation, RNA homeostasis and phosphorylation pathways (Block *et al.*, 2008).

Some fungi and oomycetes produce effectors that suppress cell death (Panstruga, 2003). This is based on histological observations of susceptible interactions and the prevalence of cell death suppressors among the T3SS bacterial effectors

Supresión de la inmunidad en las plantas. La supresión de la inmunidad innata de la planta ha surgido como la función primaria de los efectores, particularmente de los efectores T3SS de las bacterias patógenas de las plantas (Zhou y Chai, 2008). Algunos efectores como HopAF1 de *Pseudomonas syringae* suprime la inmunidad de la planta, este efector se encuentra en los genomas de muchas bacterias de este tipo y posiblemente esté relacionado con la proteína deamidasa, la desamidación es la sustitución irreversible de un grupo amida con un grupo carboxilo (Hughes y Banfield, 2014). El patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) trasloca proteínas efectoras para suprimir la inmunidad de la planta huésped (Wirthmueller *et al.*, 2018). La forma de acción de estos efectores para provocar la virulencia, es suprimiendo la defensa basal del sistema inmunitario del hospedero vegetal, a través del no reconocimiento del patrón molecular asociado a patógenos (llamado PAMPs), que las células vegetales tienen como uno de los sistemas de defensa (Kim *et al.*, 2005). Algunas especies de nematodos parásitos de plantas dentro del orden *Tylenchida* secretan proteínas efectoras en sus hospederos en el proceso de infección para reprogramar el desarrollo y la inmunidad de la planta (Lilley *et al.*, 2018).

Otros efectores T3SS de las bacterias fitopatógenas suprimen la muerte celular hipersensible provocada por varias proteínas Avr, explicando en algunos casos, observaciones anteriores de las interacciones epistáticas entre los genes Avr (Abramovitch *et al.*, 2006). Los efectores T3SS se dirigen a tres procesos vegetales que son claves para la inmunidad innata a saber, la rotación proteica, homeostasis de ARN y vías de fosforilación (Block *et al.*, 2008).

Algunos hongos y oomicetos producen efectores que suprimen la muerte celular (Panstruga, 2003). Lo anterior se encuentra basado en observaciones

(Janjusevic *et al.*, 2006). The *Phytophthora infestans* Avr3a effector suppresses hypersensitive cell death caused by another *Phytophthora infestans* protein (INF1 elicitor), which suggests a possible virulence function (Bos *et al.*, 2006).

Another type of effectors is the RXLR type, which are characterized by having a domain with RXLR amino acids (Arginine-Leucine-Arginine) within their protein structure at the C-terminal end. The *Phytophthora sojae* effector of the RXLR type also suppresses programmed cell death caused by the BAX mouse protein in yeast and plants (Dou *et al.*, 2008). Sohn (2007) demonstrated that administering *Hyaloperonospora parasitica* (Pers) ATR1 and ATR13 effectors increases *Pseudomonas syringae* virulence. ATR13 also suppresses the deposition of unchained callose by *Pseudomonas syringae*, which suggests that its action affects the basal defenses against pathogens (Sohn *et al.*, 2007). These findings indicate that, like the bacterial T3SS effectors, the oomycetes RXLR effectors often act as plant immunity suppressors. However, the mechanisms through which the RXLR effectors interfere with immunity have not yet been correctly elucidated (Hogenhout *et al.*, 2009).

Effectors' influence on plant development and performance. Some effectors affect the host plant's performance and morphology (Hogenhout *et al.*, 2009). Effectors of the AvrBs3 family, which are *Xanthomonas* transcriptional activators, cause cell division and colonization of susceptible hosts (Kay *et al.*, 2007). Effectors can also activate a plant's immune receptors, especially the nucleotide binding domain and proteins that contain repetitive regions rich in leucine (NLR), which enables plants to fight against invasive organisms; this interaction among effectors, their host targets and simultaneous immunity receptors is caused by complicated molecular mechanisms and an

histológicas de las interacciones susceptibles, y la prevalencia de supresores de muerte celular entre los efectores bacterianos T3SS (Janjusevic *et al.*, 2006). El efector Avr3a de *Phytophthora infestans*, suprime la muerte celular hipersensible inducida por otra proteína de *Phytophthora infestans*, la INF1 elicitora, que apunta a una posible función de virulencia (Bos *et al.*, 2006).

Otra clase de efectores, son los del tipo RXLR, los cuales se caracterizan por tener dentro de su estructura proteica un dominio con aminoácidos RXLR (Arginina-Leucina-Arginina) en su extremo C-terminal. El efector Avr1b de tipo RXLR de *Phytophthora sojae*, también suprime la muerte celular programada inducida por la proteína de ratón BAX en levaduras y plantas (Dou *et al.*, 2008). Sohn (2007) demostró que la administración de los efectores ATR1 y ATR13 de *Hyaloperonospora parasitica* (Pers) aumenta la virulencia de *Pseudomonas syringae*. El ATR13 también suprime la deposición de calosa desencadenada por *Pseudomonas syringae*, lo que sugiere que su acción afecta defensas basales contra patógenos (Sohn *et al.*, 2007). Estos hallazgos indican que, similar a los efectores T3SS bacterianos, los efectores RXLR de oomicetos a menudo funcionan en la supresión de la inmunidad de las plantas. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los efectores RXLR que interfieren con esta inmunidad, aún no se han dilucidado correctamente (Hogenhout *et al.*, 2009).

Influencia de efectores en el desarrollo y comportamiento de la planta. Algunos efectores alteran el comportamiento y morfología de la planta huésped (Hogenhout *et al.*, 2009). Los efectores de la familia AvrBs3, los cuales son activadores transcripcionales de *Xanthomonas*, inducen la división celular y la colonización en hospederos susceptibles (Kay *et al.*, 2007). Los efectores también pueden activar los receptores inmunes de las plantas, especialmente el dominio de unión a nucleótidos

exceptionally dynamic coevolution (Białas *et al.*, 2017). The presence of *Xanthomonas citri* in citrus cells is enough to cause macroscopic hyperplastic lesions similar to canker symptoms caused by the pathogen (Duan *et al.*, 1999). Cankerous lesions cause bacteria to be released from infected tissue and favor their spread. The *Xanthomonas vesicatoria* AvrBs3 effector is also known to cause cell hypertrophy, although the impact of this symptom on bacterial ability is not very clear (Kay *et al.*, 2007). Other organisms associated with plants alter their host's morphology, which causes malformations that create a protective ecological niche or improve their spread. Classic examples include rhizobial nodules (Oldroyd and Downie, 2008), galls caused by *Agrobacterium* spp. (Chalupowicz *et al.*, 2006) and witch's broom caused by phytoplasmas (Hogenhout *et al.*, 2009) (Figure 3).

Natural selection will favor effectors that have effects on the hosts' phenotypes and will improve the pathogen's ability (Hogenhout *et al.*, 2009).

Effector genes evolve more rapidly than the nuclear genome. The rapid evolution of the gene is a hallmark of the pathogen's adaptation (De la Concepcion *et al.*, 2018). The biochemical adaptation of the effectors after they colonize the host is essential for the pathogen's diversification and speciation (Dong *et al.*, 2014). Genes that encode for effector proteins are direct targets of evolutionary forces that drive host and pathogen co-evolution (McCann and Guttman, 2008). Alleles of effectors that successfully increase the pathogen's reproduction will be immediately favored by natural selection. Directional selection or positive selection is a type of natural selection that favors only one allele, and for this reason, the allelic frequency of a population continuously goes in one direction, given that this mechanism can also lead to adaptations (Futuyma, 2013).

y las proteínas que contienen regiones repetitivas ricas en leucina (NLR), permitiendo a las plantas luchar contra los organismos invasores, está interacción entre los efectores, sus objetivos huéspedes y los receptores inmunitarios coincidentes está conformada por intrincados mecanismos moleculares y una coevolución excepcionalmente dinámica (Białas *et al.*, 2017). La presencia de *Xanthomonas citri*, en las células de cítricos, es suficiente para causar lesiones hiperplásicas macroscópicas, análogas a los síntomas de chancro causados por el patógeno (Duan *et al.*, 1999). Las lesiones cancerosas facilitan la liberación bacteriana del tejido infectado y aumentan su diseminación. El efector AvrBs3 de *Xanthomonas vesicatoria* también es conocido por causar hipertrofia celular, aunque el impacto de tal síntoma en la aptitud bacteriana es menos claro (Kay *et al.*, 2007). Otros organismos asociados a plantas alteran la morfología de su planta hospedera, dando como resultado malformaciones que crean un nicho ecológico protector o mejoran la dispersión. Los ejemplos clásicos incluyen nódulos rizobianos (Oldroyd y Downie, 2008), las agallas inducidas por *Agrobacterium* spp (Chalupowicz *et al.*, 2006) y la escoba de bruja causada por fitoplasmas (Hogenhout *et al.*, 2009) (Figura 3).

La selección natural favorecerá a los efectores que tengan efectos en los fenotipos de los hospederos generando una mejora en la aptitud del patógeno (Hogenhout *et al.*, 2009).

Los genes de efectores evolucionan a velocidades mayores en relación con el genoma nuclear. La evolución acelerada del gen es un sello distintivo de la adaptación del patógeno (De la Concepcion *et al.*, 2018). En los efectores la adaptación bioquímica después de la colonización en el hospedero, es de vital importancia para la diversificación y especiación del patógeno (Dong *et al.*, 2014). Los genes que codifican las proteínas efectoras son objetivos

Many effector genes have evolved more quickly than the pathogen's genome and often show extreme levels of positive selection with significantly higher rates of substitution of non-synonymous nucleotides for synonymous nucleotides (Ma and Guttman, 2008). In modular effector proteins, such as the bacterial T3SS effectors and oomycete RXLR effectors, their structural domains are under different selective pressure, depending on whether they function by secretion or conduct effector activity *per se* (Win, 2007). Therefore, terminal-N domains, such as the signal peptide, the RXLR domain and the T3SS directing sequence, typically show low levels of polymorphisms compared to those of the terminal-C effector region (Win *et al.*, 2007).

Besides acting on nucleotide polymorphisms, natural selection acts on the polymorphisms of the number of copies of the effector genes (presence and lack of polymorphisms, and a varying number of gene copies). The effector genes of phytopathogenic fungi are located in loci with a high level of genomic plasticity, including regions rich in transposons and telomerase (Gout *et al.*, 2006), which reduces the genetic recombination capacity and make the host more susceptible to phytopathogenic fungi. Recently, Yoshida *et al.* (2009) demonstrated that two loci of *Magnaporthe oryzae* (Herbert) effectors have a low diversity of nucleotides but a strong presence or lack of polymorphisms. This accelerated evolution of the parasites' genomes will allow pathogens to successfully colonize their hosts and be better adapted to possible changes that in the future may occur in the genome (Jiang *et al.*, 2006).

The association of effector genes with plastic genome loci could provide an adaptation mechanism to host resistance, thus increasing the genetic and epigenetic variation and enabling a rapid evolution (Hogenhout *et al.*, 2009).



Figura 3. Morfología de plantas causada por patógenos como A) vainas modificadas en plantas de *Sisymbrium irio* B) agallas inducidas por *Agrobacterium* spp y C) escoba de bruja causada por fitoplasmas en plantas de *Capsicum annuum*.
Figure 3. Plant morphology caused by pathogens, such as: A) modified sheaths in *Sisymbrium irio* plants; B) galls caused by *Agrobacterium* spp.; and C) witch's broom caused by phytoplasmas in *Capsicum annuum* plants.

directos de las fuerzas evolutivas que impulsan la coevolución entre el hospedero y el patógeno (McCann y Guttman, 2008). Los alelos de los efectores que aumentan el éxito reproductivo del patógeno, serán inmediatamente favorecidos por la selección natural. La selección direccional o selección positiva, es un tipo de selección natural que favorece a un solo alelo y por esto la frecuencia alélica de una población continuamente va en una dirección, dado que este mecanismo también puede conducir a adaptaciones (Futuyma, 2013).

Muchos genes efectores han evolucionado a mayores velocidades en comparación con el genoma del patógeno, y con frecuencia muestran niveles extremos de selección positiva con tasas significativamente más altas de sustitución de nucleótidos no sinónimos, a nucleótidos sinónimos (Ma y Guttman, 2008). En las proteínas efectoras modulares, tales como los efectores T3SS bacterianos y los efectores RXLR de oomicetos, sus dominios estructurales están bajo diferentes presiones selectivas, dependiendo de si funcionan en secreción o llevan la actividad efectora *per se* (Win, 2007). Por lo tanto, los dominios terminal-N, tales como

Evolution of effectors. Given that it is obvious that effectors increase the susceptibility to parasites, the host's target alleles will evolve to avoid them. Recessive mutations in the *xa13* rice gene make the promotor of this gene become insensitive to the effectors that activate *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* transcription, which results in disease resistance (Sugio *et al.*, 2007).

Another recessive gene of rice blight resistance (*xa5*) is caused by mutations in the IIIA transcription factor, which supposedly prevents actions performed by the related effector (Iyer-Pascuzzi and McCouch, 2007). Also, mutations in the eIF4E elongation factor evade interactions with the VPg effector of potyvirus (Charron *et al.*, 2008). An allele (Rcr3) of tomato cysteine-protease has also been identified as carrying a mutation that makes the protein insensitive to inhibition by the *Cladosporium fulvum* Avr2 effector (Shabab *et al.*, 2008).

Many more examples are expected to be available in the future, since next-generation sequencing technologies are currently being explored which could systematically probe the

la péptido señal, el dominio RXLR y la secuencia de direccionamiento T3SS, muestran típicamente niveles reducidos de polimorfismo en comparación con la región efectora terminal-C (Win *et al.*, 2007).

Además de actuar sobre los polimorfismos de nucleótidos, la selección natural actúa sobre los polimorfismos del número de copias de los genes efectores (presencia y ausencia de polimorfismos y variación en el número de copias de genes). Los genes efectores de hongos fitopatógenos se localizan en loci con alta plasticidad genómica incluyendo regiones ricas en transposones y telomerasa (Gout *et al.*, 2006), reduciendo la capacidad de recombinación genética y con ello hacer más susceptible al hospedero al ataque de hongos fitopatógenos. Yoshida *et al.* (2009) demostraron recientemente que dos loci efectores de *Magnaporthe oryzae* (Herbert), muestran baja diversidad de nucleótidos, pero un alto grado de presencia o ausencia de polimorfismos. Esta evolución acelerada de los genomas de los parásitos, les permitirá seguir colonizando de forma exitosa a sus hospederos, haciendo que los parásitos estén mejor adaptados a los posibles cambios que en el futuro presenten los genomas de éstos (Jiang *et al.*, 2006).

La asociación de genes de efectores con loci genómicos plásticos, podría conferir un mecanismo de adaptación a la resistencia del hospedero, aumentando la variación genética y epigenética y permitiendo una evolución acelerada (Hogenhout *et al.*, 2009).

Evolución de efectores. Dado que se hace evidente que los efectores aumentan la susceptibilidad a los parásitos, los alelos objetivos del hospedero evolucionarán para eludirlos. Las mutaciones recesivas en arroz en el gen *xal3*, hacen que el promotor de este gen sea insensible a los efectores activadores de la transcripción de *Xanthomonas oryzae pv. ory-*

variation in effector sequences as a mechanism to understand the selection evidence (Hogenhout *et al.*, 2009). It is important to completely understand how the tripartite interaction among effectors, target effectors and R proteins (proteins that confer resistance to the host through direct or indirect recognition of a pathogen protein) evolves, given the conflict among the selective forces that occur between plants and pathogens in natural populations (van der Hoorn and Kamoun, 2008).

PERSPECTIVES

The study of effectors promises to be the new synthesis of multidisciplinary studies of parasite-host interactions, and this will mark the beginning of a new epistemological revolution in phytopathology. Effectors are a source of biological innovation whose results are just beginning to be elucidated and will undoubtedly be a rich source of scientific findings in the years to come. Effectors have proved to be some of the most important proteins involved in the eukaryotic cells of plants and animals. Studies of these proteins will provide important knowledge of insects' immune system, bacterial virulence strategies, plant defense mechanisms against bacteria and herbivore insects, and reveal new pathways that affect plant vegetative growth and development. However, the biology of effectors is still in its infancy, and the available knowledge is limited to a few phytopathogen taxa and immunosuppression processes. But the gap could be filled soon by using new DNA sequencing technologies (next-generation sequencing) and the recently arrived "omics." The sequences of pathogen and host genomes could provide a wider phylogenetic scope and thus a more comprehensive understanding of the pathosystem. All this information reinforces the

zae, dando como resultado una resistencia a la enfermedad (Sugio *et al.*, 2007).

Otro gen recesivo de resistencia al tizón del arroz, el *xa5*, es origina por mutaciones en el factor de transcripción IIIA, que presumiblemente impide acciones por el efector afin (Iyer-Pascuzzi y McCouch, 2007). Además las mutaciones en el factor de elongación eIF4E evaden las interacciones con el efector VPg de potyvirus (Charron *et al.*, 2008). También se ha identificado un alelo (Rcr3) de la cisteína-proteasa de tomate, portador de una mutación que hace que la proteína sea insensible a la inhibición por el efector Avr2 de *Cladosporium fulvum* (Shabab *et al.*, 2008).

Se espera que muchos ejemplos adicionales surjan en el futuro, ya que en la actualidad se exploran tecnologías de secuenciación de próxima generación, estas podrán sondear sistemáticamente la variación en las secuencias de los efectores, como un mecanismo para comprender la evidencia de selección (Hogenhout *et al.*, 2009). Una cuestión importante es entender completamente cómo evoluciona la interacción tripartita entre efectores, objetivos efectores y proteínas R (Proteína que confiere resistencia al hospedero por medio del reconocimiento directo o indirecto de una proteína del patógeno), dado el conflicto de las fuerzas selectivas que se producen en las poblaciones naturales entre plantas y patógenos (van der Hoorn y Kamoun, 2008).

PERSPECTIVAS

El estudio de los efectores promete ser la nueva síntesis en los estudios multidisciplinarios de las interacciones parasito-hospedero y con esta la nueva revolución epistemológica dentro de la fitopatología. Los efectores representan una fuente de innovación biológica cuyos alcances apenas

importancia of effectors as a fundamental cog in the wheel of this tripartite interaction. Also, the use of new tools and concepts for studying effectors will have important impacts on evolutionary biology and some of its concepts will be redefined, not to mention the new approaches that are emerging from the current study of “omics,” a new field of genetics that attempts to understand the molecular organization, evolution and architecture of the whole genome. This discipline has started to branch out into the study of proteomics (the study of all the proteins that are produced by an organism) and transcriptomics (the study of all cell RNAm), besides the latest computer system technology that can extrapolate infinite amounts of data, so the new effector biology is about to become the mother of all research about pathosystems.

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

empiezan a ser dilucidados y que serán sin duda en los próximos años una rica fuente de descubrimientos científicos. Los efectores han demostrado ser algunas de las proteínas más importantes que tienen función en las células eucariotas de plantas y animales. Los estudios de estas proteínas aportarán importantes conocimientos sobre el sistema inmune de los insectos, estrategias de virulencia bacteriana, mecanismos de defensa de las plantas contra bacterias e insectos herbívoros y podrán revelar nuevas vías que afecten el crecimiento vegetativo y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, la biología de los efectores se encuentra aún en su infancia y el conocimiento sobre éstos se limita a unos pocos taxones de patógenos de plantas y a procesos de inmunosupresión. Pero la brecha podría ser pronto zanjada por el impulso de las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN (secuenciación de próxima generación) y las recién llegadas “ómicas”. Las

secuencias de los genomas de los patógenos y hospederos proporcionarán un panorama filogenético mayor y con este, un entendimiento más profundo del patosistema. Todos estos datos están reforzando la importancia de los efectores como engranaje fundamental de esta interacción tripartita. Además, el impulso de las nuevas herramientas y conceptos en el estudio de los efectores, tendrá repercusiones importantes en la biología evolutiva y la redefinición de algunos de sus conceptos, sin mencionar los nuevos enfoques que están surgiendo con el estudio actual de las “ómicas”, el nuevo campo de la genética que intenta comprender la organización, evolución y arquitectura molecular contenida en el genoma completo. Esta disciplina ha empezado a ramificarse en el estudio de la proteómica (el estudio de todas las proteínas del organismo) o la transcriptómica (el estudio de todos los ARNm de la célula), sumado a la nueva tecnología de sistemas computacionales de última generación que pueden extrapolar cantidades infinitas de datos, la nueva biología efectora esta por consolidarse como la madre de toda la investigación en torno a los patosistemas.

## LITERATURA CITADA

- Abramovitch RB, Anderson JC, and Martin GB. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 601-611. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1984>.
- Amsalem J, Vigouroux M, Oberhaensli S, Brown JK, Bindschedler LV, Skamnioti P, Wicker T, Spanu PD, Quesneville H, and Sacristán S. 2015. Evolution of the EKA family of powdery mildew avirulence-effector genes from the ORF 1 of a LINE retrotransposon. *BMC Genomics* 16: 917. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2185-x>.
- Banfield MJ. 2015. Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins. *Cellular microbiology* 17: 18-25. <https://doi.org/10.1111/cmi.12385>
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, and Gross DC. 1999. Pseudomonas syringae phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews* 63: 266-292. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98966/pdf/mr000266.pdf>
- Białas A, Zess EK, De la Concepcion JC, Franceschetti M, Pennington HG, Yoshida K, Upson JL, Chancelud E, Wu C-H, and Langner T. 2017. Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 34-45. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-17-0196-FI>.
- Block A, Li G, Fu ZQ, and Alfano JR. 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* 11: 396-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.007>.
- Bos JI, Kanneganti TD, Young C, Cakir C, Huitema E, Win J, Armstrong MR, Birch PR, and Kamoun S. 2006. The C-terminal half of Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in Nicotiana benthamiana. *The Plant Journal* 48: 165-176. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02866.x>.
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H, and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting Opuntia species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1448-1457. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65615-0>.
- Chalupowicz L, Barash I, Schwartz M, Aloni R, and Manulis S. 2006. Comparative anatomy of gall development on Gypsophila paniculata induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta* 224: 429-437. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0229-9>.
- Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, and Caranta C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal* 54: 56-68. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03407.x>.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, and Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.
- Costacurta A, and Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology* 21: 1-18. <http://dx.doi.org/10.3109/10408419509113531>.
- Dagdas YF, Belhaj K, Maqbool A, Chaparro-Garcia A, Pandey P, Petre B, Tabassum N, Cruz-Mireles N, Hughes RK, and Sklenar J. 2016. An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *Elife* 5: e10856. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10856.001>.
- Damasceno CM, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, and Rose JK. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from Phytophthora species suggests coevolution with plant endo-β-1, 3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 820-830. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0820>.
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, and Baum TJ. 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current opinion in plant biology* 11: 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.003>.
- De la Concepcion JC, Franceschetti M, Maqbool A, Saitoh H, Terauchi R, Kamoun S, and Banfield MJ. 2018. Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. *Nature plants* 4: 576. Disponible en línea:

- Di X, Cao L, Hughes RK, Tintor N, Banfield MJ, and Takken FL. 2017. Structure–function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist* 216: 897-914. <https://doi.org/10.1111/nph.14733>
- Dong S, Stam R, Cano LM, Song J, Sklenar J, Yoshida K, Bozkurt TO, Oliva R, Liu Z, and Tian M. 2014. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *Science* 343: 552-555. <http://doi.org/10.1126/science.1246300>.
- Dou D, Kale SD, Wang X, Chen Y, Wang Q, Wang X, Jiang RH, Arredondo FD, Anderson RG, and Thakur PB. 2008. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell* 20: 1118-1133. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057067>.
- Duan Y, Castaneda A, Zhao G, Erdos G, and Gabriel D. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 556-560. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.6.556>.
- Futuyma D. 2013. Evolution. 3rd edn. Sunderland, MA. Sinauer Associates, Inc.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, and Rouxel T. 2006. Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol Microbiol* 60: 67-80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x>.
- Hogenhout SA, and Loria R. 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology* 11: 449-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.007>.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, and Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 115-122. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>.
- Hughes DP, Brodeur J, and Thomas F. 2012. *Host manipulation by parasites*. Oxford University Press.
- Hughes R, and Banfield M. 2014. Production of RXLR effector proteins for structural analysis by X-ray crystallography. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1127: 231-253. Disponible en línea:
- Iyer-Pascuzzi AS, and McCouch SR. 2007. Recessive resistance genes and the *Oryza sativa*-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 731-739. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0731>.
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, and Stebbins CE. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-226. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120131>.
- Jiang RH, Weide R, van de Vondervoort PJ, and Govers F. 2006. Amplification generates modular diversity at an avirulence locus in the pathogen *Phytophthora*. *Genome research* 16: 827-840. <https://doi.org/10.1101/gr.5193806>.
- Kamoun S. 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current opinion in plant biology* 10: 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.017>.
- Kawaide H. 2006. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70: 583-590. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.583>.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, and Bonas U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318: 648-651. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1144956>.
- Kim MG, Da Cunha L, McFall AJ, Belkadir Y, DebRoy S, Dangi JL, and Mackey D. 2005. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* 121: 749-759. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.025>.
- Le Favre R, Evangelisti E, Rey T, and Schornack S. 2015. Modulation of host cell biology by plant pathogenic microbes. *Annual review of cell and developmental biology* 31: 201-229. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-102314-112502>.
- Lilley CJ, Maqbool A, Wu D, Yusup HB, Jones LM, Birch PR, Banfield MJ, Urwin PE, and Eves-van den Akker S. 2018. Effector gene birth in plant parasitic nematodes: Neofunctionalization of a housekeeping glutathione synthetase gene. *PLoS genetics* 14: e1007310. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007310>.
- Ma W, and Guttman DS. 2008. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current opinion in plant biology* 11: 412-419. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.001>.
- MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzanich K, Zdzarska AM, Angenent GC, Immink RG, and Hogenhout SA. 2014. Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS biology* 12: e1001835. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001835>.
- McCann HC, and Guttman DS. 2008. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist* 177: 33-47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02293.x>.
- Mccann L. 2016. Characterisation of the Cf-Ecp2 gene encoding for recognition of the conserved fungal effector Ecp2 in *Solanum pimpinellifolium* and *Nicotiana paniculata*. University of East Anglia.
- Misas-Villamil JC, and Van der Hoorn RA. 2008. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current opinion in plant biology* 11: 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.007>.
- Nemri A, Saunders DG, Anderson C, Upadhyaya NM, Win J, Lawrence G, Jones D, Kamoun S, Ellis J, and Dodds P. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Frontiers in plant science* 5: 98. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00098>.
- Oldroyd GE, and Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>.
- Panstruga R. 2003. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current opinion in plant biology* 6: 320-326. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00043-8).
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, and Lahaye T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter

- activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318: 645-648. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1144958>.
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, and Martin GB. 2007. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 448: 370-374. <http://doi.org/10.1038/nature05966>.
- Sarma GN, Manning VA, Ciuffetti LM, and Karplus PA. 2005. Structure of Ptr ToxA: An RGD-containing host-selective toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *The Plant Cell* 17: 3190-3202. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.034918>.
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, and van der Hoorn RA. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *The Plant Cell* 20: 1169-1183. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056325>.
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, and Jones JD. 2007. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 19: 4077-4090. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054262>.
- Sugio A, Yang B, Zhu T, and White FF. 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA $\gamma$ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 10720-10725. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701742104>
- Sugio A, MacLean AM, Grieve VM, and Hogenhout SA. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: E1254-E1263. Disponible en línea:
- Thomma BP, van Esse HP, Crous PW, and de Wit PJ. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular plant pathology* 6: 379-393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x>.
- Tian M, Benedetti B, and Kamoun S. 2005. A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138: 1785-1793. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061226>.
- Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, and Kamoun S. 2007. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* 143: 364-377. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090050>.
- Tomkins M, Kliot A, Marée AF, and Hogenhout SA. 2018. A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. *Current opinion in plant biology* 44: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.002>.
- Tudzynski B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied microbiology and biotechnology* 52: 298-310. <https://doi.org/10.1007/s002530051>.
- van der Hoorn RA, and Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* 20: 2009-2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>.
- van Esse HP, van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, Van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit PJ, and Thomma BP. 2008. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20: 1948-1963. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394>.
- Washington E, Mukhtar M, Finkel O, Wan L, Banfield M, Kieber J, and Dangel J. 2016. *Pseudomonas syringae* type III effector HopAF1 suppresses plant immunity by targeting methionine recycling to block ethylene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3577-3586. Disponible en línea:
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, Van West P, and Chapman S. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450: 115-118. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06203>.
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, and Kamoun S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell* 19: 2349-2369. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051037>.
- Wirthmueller L, Asai S, Rallapalli G, Sklenar J, Fabro G, Kim DS, Lintermann R, Jaspers P, Wrzaczek M, and Kangasjärvi J. 2018. *Arabidopsis* downy mildew effector HaRxL106 suppresses plant immunity by binding to RADICAL-INDUCED CELL DEATH1. *New Phytologist* 220: 232-248. Disponible en línea:
- Xing W, Zou Y, Liu Q, Liu J, Luo X, Huang Q, Chen S, Zhu L, Bi R, and Hao Q. 2007. The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature* 449: 243-247. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06109>.
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J et al. 2009. Association Genetics Reveals Three Novel Avirulence Genes from the Rice Blast Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* 21: 1573-1591. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066324>.
- Zhou J-M, and Chai J. 2008. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* 11: 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.004>.

# Biological, anaerobic and reductive soil disinfestation to the soil for control of harmful organisms to plants

## Desinfestación biológica, anaerobia y reductiva al suelo para el control de organismos dañinos a plantas

José Alfredo Samaniego-Gaxiola\*, Yasmín Chew-Madinaveitia, Arturo Gaytán-Mascorro, Campo Experimental La Laguna INIFAP, Boulevard. José Santos Valdez 1200 Pte., Colonia Centro Matamoros, Coahuila, México. C.P. 27440; Aurelio Pedroza-Sandoval<sup>2</sup>, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez Km 40, Bermejillo, Durango. C.P. 35230. \*Autor para correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

**Recibido:** 02 de Octubre, 2018.      **Aceptado:** 21 de Noviembre, 2018.

Samaniego-Gaxiola JF, Chew-Madinaveitia Y, Gaytán-Mascorro A and Pedroza-Sandoval A. 2018, Biological, anaerobic and reductive disinfestation to the soil for the control of organisms harmful to plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 115-134.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1810-1

Primera publicación DOI: 09 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 09, 2018.

**Resumen.** La necesidad de disminuir el uso de pesticidas sintéticos, bajar costos, incrementar eficiencia para el control de fitopatógenos y de realizar una agricultura orgánica, son razones para mejorar y desarrollar nuevas alternativas de control. La desinfestación biológica (DBS), anaerobia (DAS) o reductiva del suelo (DRS) son sinónimos; en ésta revisión, se utiliza el término DRS y se explica la razón. La DRS constituye un método aplicado al suelo para disminuir o eliminar bacterias, hongos, malezas y nematodos que dañan a los

**Abstract.** The need to reduce the use of synthetic pesticides, lower costs, increase efficiency for the control of phytopathogens and to carry out organic agriculture, are reasons to improve and develop new control alternatives. The biological disinfestation (BSD), anaerobic (ASD) or reductive soil (RSD) are synonymous; in this review, the term RSD is used and the reason explained. The RSD is a method applied to the soil to reduce or eliminate bacteria, fungi, weeds, and nematodes that damage agricultural crops. This technique consists in adding a source of easily oxidized organic carbon such as crop residues, seeds, green manure, etc., cover with plastic and saturate or flood the soil. In this way, the carbon source decomposes in an anaerobic condition, the soil acidifies, the oxidation-reduction potential reaches reductive values (-100 to -400 mV) and short-chain volatile fatty acids (VFAs) are generated. The VFAs are lethal for weeds and phytopathogens in the soil. In this essay the subject of the RSD, shows a historical approach, the principles that sustain it, proposals

cultivos agrícolas. Esta técnica consiste en agregar una fuente de carbono orgánico de fácil oxidación como residuos de cosecha, semillas, abonos, etc., cubrir con plástico y saturar o inundar el suelo. De esta manera, la fuente de carbono se descompone en condición anaerobia, el suelo se acidifica, el potencial oxido-reducción alcanza valores reductivos (-100 a -400 mV) y se generan ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs). Los AGVs son letales para malezas y fitopatógenos en el suelo. En este ensayo el tema de la DRS, muestra un enfoque histórico, los principios que la sustentan, se hacen propuestas de mejora y evaluación de sus variantes, y se presentan aplicaciones prácticas.

**Palabras clave:** ácidos grasos volátiles, inundación, potencial oxido-reducción, pH.

Antes del uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades, la rotación de cultivos y la incorporación de materia orgánica en el suelo fueron los dos métodos más utilizados en la agricultura para este fin (Bailey y Lazarovits, 2003). Esta última se sigue utilizando, pero los resultados para el control de enfermedades de plantas en el suelo tienen una amplia variación, relacionada con la cantidad y tipo de materia orgánica, cultivo a proteger y patógeno que se desee controlar (Bonanomi *et al.*, 2007). Recientemente, el control de plagas y enfermedades de plantas promovió el uso de materia orgánica selectiva o productos derivados de ésta (Meghvansi y Varma, 2015). Particularmente, la degradación de materia orgánica en el suelo bajo condición anaerobia, indujo la aparición de la biofumigación y paralelamente sus variantes; todas ellas, con la finalidad de sustituir al bromuro de metilo, pesticidas y contribuir con una agricultura orgánica (Meghvansi y Varma, 2015; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016).

for improvement and evaluation of its variants are made, and practical applications are presented.

**Key words:** Volatile fatty acids, flood, oxidation-reduction potential, pH.

Before the use of chemical products for the control of pests and diseases, crop rotation and the incorporation of organic matter in the soil were the two most widely used methods in agriculture for this purpose (Bailey and Lazarovits, 2003). The latter is still being used, but the results for the control of plant diseases in the soil have a wide variation related to the amount and type of organic matter, the crop to be protected and the pathogen to be controlled (Bonanomi *et al.*, 2007). Recently, the control of plant pests and diseases promoted the use of selective organic matter or its byproducts (Meghvansi and Varma, 2015). In particular, the decomposition of organic matter in the soil under anaerobic conditions led to the appearance of biofumigation and its variants, all of which have the intention of substituting methyl bromide and pesticides, and contributing towards organic agriculture (Meghvansi and Varma, 2015; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016).

Soil biofumigation has focused on the incorporation of residues, complete plants, or seeds of the species of the Brassicaceae family into the soil, some of the most important of which are *Brassica carinata*, *B. juncea* and *B. napus*, followed by covering the soil with plastic, where residues decompose, producing toxic compounds for organisms that are harmful to the crops (Ríos-Cano, 2017). Variations of biofumigation are the biological soil disinfestation (BSD), later named anaerobic soil disinfestation (ASD), and finally reductive soil disinfestation (RSD). The purpose of disinfestations is to eliminate or reduce organisms



La biofumigación se ha centrado en la incorporación al suelo de residuos, plantas completas, o semillas de las especies de la familia Brassicaceae, entre las que destaca *Brassica carinata*, *B. juncea* y *B. napus*, posteriormente cubrir el suelo con plástico, donde al descomponerse los residuos, se producen compuestos tóxicos para organismos perjudiciales de los cultivos agrícolas (Ríos-Cano, 2017). Variantes de la biofumigación, son la desinfección biológica del suelo (DBS), luego nombrada desinfección anaerobia del suelo (DAS) y finalmente desinfección reductiva del suelo (DRS). Las desinfecciones tienen la finalidad de eliminar o reducir organismos en el suelo que dañan los cultivos agrícolas, mediante la incorporación tanto de especies de Brassicaceae, como de otras plantas, compuestos orgánicos y residuos de cosecha, todo en un ambiente donde el suelo se satura con agua y se cubre con plástico (Momma *et al.*, 2008). En un principio, se denominó DBS, debido a que la degradación del material añadido implica un proceso microbiológico; luego se acuñó la DAS, por ser indispensable que el suelo careciera de oxígeno; finalmente, el término DRS, está sustituyendo a los anteriores, al determinar que además de una condición de anaerobiosis, es indispensable que el potencial oxido-reducción (POR) llegue a un nivel reductivo con valores de -100 a -400 mv, el pH de suelo se acidifique y que se produzcan ácidos grasos volátiles (AGVs). No obstante, los términos DBS y DAS continúan en uso y paulatinamente son sustituidos por DRS; en esta revisión se usará DRS como sinónimo de DBS y DAS.

La DRS es una técnica relativamente novedosa, poco conocida en México y cuyas causas no se conocen del todo, pero se investigan en distintos países; consecuentemente, los objetivos de ésta revisión son mostrar los avances, logros y proponer

in the soil that harm crops by incorporating species of Brassicaceae and of other plants, organic compounds and crop residues in an environment where the soil is saturated with water and covered with plastic (Momma *et al.*, 2008). It was initially named BSD, since the degradation of the material added implies a microbiological process; next, the term ASD was coined due to the importance of the lack of oxygen; finally, the term RSD is replacing the previous ones because, along with anaerobiosis, it is also crucial for the oxidation-reduction potential (ORP) to reach a reductive level with values of -100 to -400 mv, the pH of the soil to acidify and for volatile fatty acids (VFAs) to be produced. However, the terms BSD and ASD are still being used and are gradually being replaced with RSD; this revision will consider RSD as a synonym of BSD and ASD.

RSD is a relatively new technique, not widely known in Mexico, and with causes that are not entirely known, but they are being investigated in different countries. Therefore, the aims of this revision are to show the advances, achievements and to propose how to improve the efficiency and efficacy of this technique, used for the control of organisms in the soil that are harmful for crops. The topic of RSD has been revised before, evaluating different inputs for different types of pathogens, and even with an approach of meta-analysis (Momma *et al.*, 2013; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016), which supports the aim of this work.

In consequence, the approach of this revision places emphasis on: i) historical development; ii) principles that back them; iii) proposals to improve and evaluate their variants. All this, supported by the integration of part of the recently produced knowledge, as well as by the bases of additional modifications to improve RSD.

como mejorar la eficiencia y eficacia de esta técnica, utilizada para el manejo de organismos en el suelo perjudiciales para los cultivos agrícolas. Con anterioridad, el tema de la DRS ha sido revisado, en donde se evaluaron diferentes insumos, para distintos tipos de patógenos e incluso con un enfoque de meta-análisis (Momma *et al.*, 2013; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016), lo cual apoya al objetivo de este ensayo.

Consecuentemente, el enfoque de la presente revisión hace énfasis en: i) desarrollo histórico; ii) principios que la sustentan; iii) propuestas para mejorar y evaluar sus variantes. Todo ello, sustentado en integrar parte del conocimiento generado recientemente, así como fundamentar modificaciones adicionales para mejorar la DRS.

**Análisis retrospectivo de la DRS.** Recientemente, en México, se analizó el estatus de los pesticidas, incluidos los fumigantes, los criterios del análisis, se fundamentan en la peligrosidad detectada por agencias internacionales, entre las que destacan la Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Red Internacional de Plaguicidas; el Cuadro 1, destaca los fumigantes comúnmente utilizados en México, algunos como el Bromuro de Metilo, la Cloropicrina, el 1,3-Dicloropropeno y el metam-sodio son considerados altamente peligrosos; consecuentemente, la necesidad en México y el mundo de buscar nuevas alternativas para una agricultura sostenible (Bejarano-González, 2017).

Una alternativa para el manejo de fitopatógenos en el suelo es la DRS, que incluye inundación, la adición y descomposición de la materia orgánica, la anaerobiosis, los cambios de pH y POR y la producción de AGVs. En el pasado, cada tópico fue investigado por separado, como métodos para el control de fitopatógenos en el suelo y se abordarán como antecedentes de la DRS.

**Retrospective analysis of RSD.** Recently in Mexico, the status of pesticides was analyzed in a study including fumigants; the criteria of the analysis are based on the danger found by international agencies, the most important of which are the International Health Organization, the United Nations Food and Agriculture Organization, and the Pesticide Action Network. Table 1 highlights the most commonly used fumigants in Mexico, some of which – such as methyl bromide, Chloropicrin, 1,3-Dichloropropene and metham-sodium are considered highly dangerous. Hence the need throughout Mexico and the world to seek new alternatives for a sustainable agriculture (Bejarano-González, 2017).

An alternative for the management of plant pathogens in the soil is RSD, which includes flooding, adding and decomposing organic matter, anaerobiosis, changes in pH and ORP, and the production of VFAs. In the past, each topic was researched separately as methods for the control of plant pathogens in the soils and will be regarded as precedents of RSD.

Flooding soils planted with banana trees resulted in the eradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1955). It was later found that the sclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb died or were unable to reproduce in flooded soils, where organic matter decomposed in anaerobic conditions (Ioannou *et al.*, 1977; Menzies, 1962). In this way, the constants found were flooding and the decomposition of organic matter under anaerobic conditions, which induced the death of plant pathogens. At the same time, the decomposition of organic matter in flooded soils were related to the production of VFAs, which has been recorded in microbiology classics since the 1960s (Alexander, 1961); the same is true for changes in pH and ORP (Ponnamperuma, 1972).

**Cuadro 1. Fumigantes<sup>x,y,z</sup> o pesticidas del suelo utilizados en México y su peligrosidad.**  
**Table 1. Soil fumigants<sup>x,y,z</sup> or pesticide used in Mexico and their danger.**

| Ingrediente activo                      | Formula                                                      | Usos principales                                | Peligrosidad <sup>1</sup> | Peligrosidad <sup>2</sup>                  |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|
| Bromuro de metilo                       | CH <sub>3</sub> Br                                           | Fungicida, herbicida, insecticida y nematicida  | 0/0/0/1                   | ¿???                                       |
| Cloropicrina                            | C <sub>12</sub> CNO <sub>2</sub>                             | idem                                            | 1/0/0/0                   |                                            |
| 1,3-Dicloropropeno                      | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> C <sub>12</sub>                | idem                                            | 0/1/0/0                   |                                            |
| Dibromuro de etileno                    | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub>                | Insecticida, nematicida.                        | NI                        | Toxico a humanos efecto dañino al ambiente |
| Yoduro de metilo                        | CH <sub>3</sub> I                                            | Fungicida, herbicida, insecticida y nematicida. | NI                        | idem                                       |
| metam-sodio                             | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NNaS <sub>2</sub>              | idem                                            | 0/1/0/0                   |                                            |
| Dazomet                                 | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | idem                                            | NI                        | Toxico a humanos efecto dañino al ambiente |
| Dimetil disulfuro <sup>3</sup>          | CH <sub>3</sub> SSCH <sub>3</sub>                            | Fungicida, nematicida                           | NI                        | NI                                         |
| Tetratiocarbonato de sodio <sup>3</sup> | CNa <sub>2</sub> S <sub>2</sub>                              | Nematicida                                      | NI                        | NI                                         |

<sup>x</sup> Información obtenida de Bejarano-González (2017), el valor numérico entre las diagonales ( / / / / ), indican toxicidad aguda, efectos a largo plazo, toxicidad ambiental e infringir acuerdos internacionales de protección al ambiente, salud o derechos humanos por uso de pesticidas, respetivamente / Information obtained from Bejarano-González (2017); the numeric value between slashes ( / / / / ), indicate acute toxicity, long term effects, and the infringement of international environmental protection, health of human rights agreements due to the use of pesticides, respectively.

<sup>y</sup> Información obtenida de De la Cruz y Ramírez, (2018) / Information obtained from De la Cruz and Ramírez, (2018). NI = Peligrosidad no incluida en las fuentes de información <sup>1</sup> y <sup>2</sup>. / Harmness not included in information sources <sup>1</sup> and <sup>2</sup>.

<sup>z</sup> La peligrosidad del Dimetil disulfuro y Tetratiocarbonato de sodio, son expuestas en las ligas: [http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T.\\_PALADIN\\_JoLxNOq.pdf](http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T._PALADIN_JoLxNOq.pdf) y <http://www.afipa.cl/web/files/afipa/arysta2015/ENZONE.pdf>, respectivamente / The harmness of Dimethyl disulfide and sodium Tetrathiocarbonate are shown in the links [http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T.\\_PALADIN\\_JoLxNOq.pdf](http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T._PALADIN_JoLxNOq.pdf) and <http://www.afipa.cl/web/files/afipa/arysta2015/ENZONE.pdf>, respectively.

La inundación de los suelos cultivados con plantaciones de banano, resultó en la erradicación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1955). Posteriormente, se encontró que los esclerocios de *Verticillium dahliae* Kleb, morían o no podían reproducirse en suelo inundado, donde se descomponía materia orgánica en condición anaerobia (Ioannou *et al.*, 1977; Menzies, 1962). De tal manera que, se detectó como una constante la inundación y descomposición de la materia orgánica en condición de anaerobiosis, lo que inducían la muerte de fitopatógenos. Paralelamente, la descomposición de materia orgánica en suelo inundado se asoció con la generación de AGVs lo que fue consignado en el clásico de microbiología del suelo desde los años 60s (Alexander, 1961); además con cambios de pH y POR (Ponnamperuma, 1972).

VFAs are produced by microorganisms when these degrade the organic matter in the soil using a fermentative metabolism (Figure 1). Before RSD, acetic, butyric, formic, propionic acids and other VFAs were known to have biocide effects on fungi (Cochrane, 1958) and on bacteria (Goepfert and Hicks, 1969), and most recently, for other organisms (Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval, 2013). However, it was in Japan where Okazaki (1985) found that the addition of glucose and flooding of the soil produced volatile compounds that killed the *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* chlamydospores, in a device he designed (Figure 2); similarly, Samaniego-Gaxiola (1994) added glucose and flooded the soil, and observed the death of the *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert sclerotia. Meanwhile, Okazaki and

Los AGVs son producidos por los microorganismos al degradar la materia orgánica del suelo, mediante un metabolismo fermentativo (Figura 1). Anterior a la DRS, se sabía que los ácidos acético, butírico, fórmico, propiónico y otros AGVs tienen efecto biosida en hongos (Cochrane, 1958) y en bacterias (Goepfert e Hicks, 1969) y más recientemente para otros organismos (Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval, 2013). Pero fue en Japón, donde Okazaki (1985) encontró que adicionando glucosa en suelo e inundando se generaban compuestos volátiles, los que mataban las clamidosporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, en un dispositivo que diseñó (Figura 2); de manera similar, Samaniego-Gaxiola (1994), añadió glucosa en suelo e inundando observó que morían los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. Entretanto, Okazaki y Nose (1986) determinaron que los AGVs acético, propiónico y butírico se producían en esta condición y mataban a *F. oxysporum*; aunque éste trabajo y el de Okazaki (1985) aparecieron traducidos del japonés y publicados en inglés cerca del año 2000. De ésta manera se tuvo evidencia del efecto letal de los AGVs para organismos durante la DRS o simplemente *in vitro*; lo cual se ha confirmado con trabajos posteriores

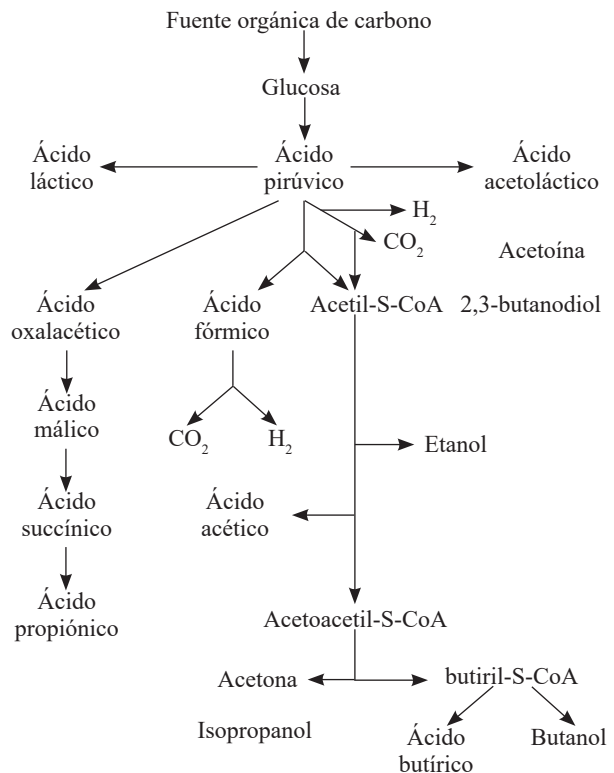


Figura 1. Ácidos grasos volátiles producidos donde al fermentar una fuente orgánica de carbono. Adaptado de Steiner *et al.*, 1977.

Figure 1. Volatile fatty acids produced the fermenting an organic source of carbon. Adapted from Steiner *et al.*, 1977.

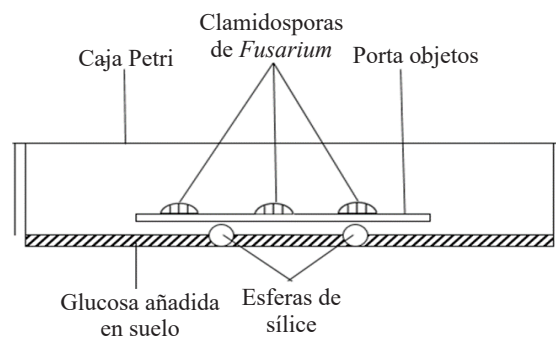


Figura 2. Dispositivo de Okazaki (1985) las clamidosporas de *Fusarium oxysporum* murieron al añadir glucosa en suelo e inundar.

Figure 2. Okazaki device (1985) when chlamydoconidia *Fusarium oxysporum* died when adding glucose to the soil and flooding.

(Momma 2008; Momma *et al.*, 2006; Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Cabe señalar, que la presencia de AGVs en residuos de plantas como la col (*Brassica oleracea*) ya se conocía desde los 50s (Barnett y Ducan, 1953); así como los efectos fitotóxicos de los AGVs en el suelo con residuos de paja de trigo y las cantidades de ácidos producidos (Lynch, 1977; Lynch *et al.*, 1980), lo cual es de importancia debido a que cascarilla de trigo y la col son residuos comúnmente utilizados para inducir la DRS y biofumigación, respectivamente.

Finalmente, los dos primeros trabajos donde se integraron los principios de la DRS fueron Shinmura *et al.* (1999) en Japón y Blok *et al.* (2000) en Holanda, ambos para el control de hongos fitopatógenos en el suelo. Posteriormente, se determinó que los AGVs contenidos en excretas de cerdo mataban a *Verticillium dahliae* (Tenuta *et al.*, 2002). La aplicación de cascarilla de trigo para inducir DRS y matar bacterias y hongos fitopatógenos en suelo (Momma *et al.*, 2006). También se ha utilizado etanol para generar DRS (Momma *et al.*, 2010), así como residuos de pastos, alfalfa, melaza, semillas, glucosa, entre otros (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana y Mazzola, 2016; Momma, *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2016).

**Los AGVs.** Estos ácidos que se generan en la DRS, son tóxicos para nematodos, hongos y bacterias, preponderantemente cuando se encuentran en forma no ionizada en la solución del suelo u otro medio (Goepfert e Hicks, 1969; Katase *et al.*, 2009; Tenuta *et al.*, 2002). Por ejemplo, el ácido acético en su forma no ionizada o disociada (AGV<sub>ni</sub>) se puede representar como CH<sub>3</sub>CCOH, mientras que en su forma ionizada (AGV<sub>si</sub>) como CH<sub>3</sub>CCO<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>, una u otra forma predominará en función del pH del medio donde se encuentren; los principios y

Nose (1986) determined that the acetic, propionic and butyric VFAs were produced under these conditions and killed *F. oxysporum*; although this work and Okazaki's (1985) appeared translated from Japanese and published in English around the year 2000. This provided evidence of the lethal effect of the VFAs for organisms during RSD, or at least *in vitro*, which has been confirmed in later works (Momma 2008; Momma *et al.*, 2006; Samaniego-Gaxiola and Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

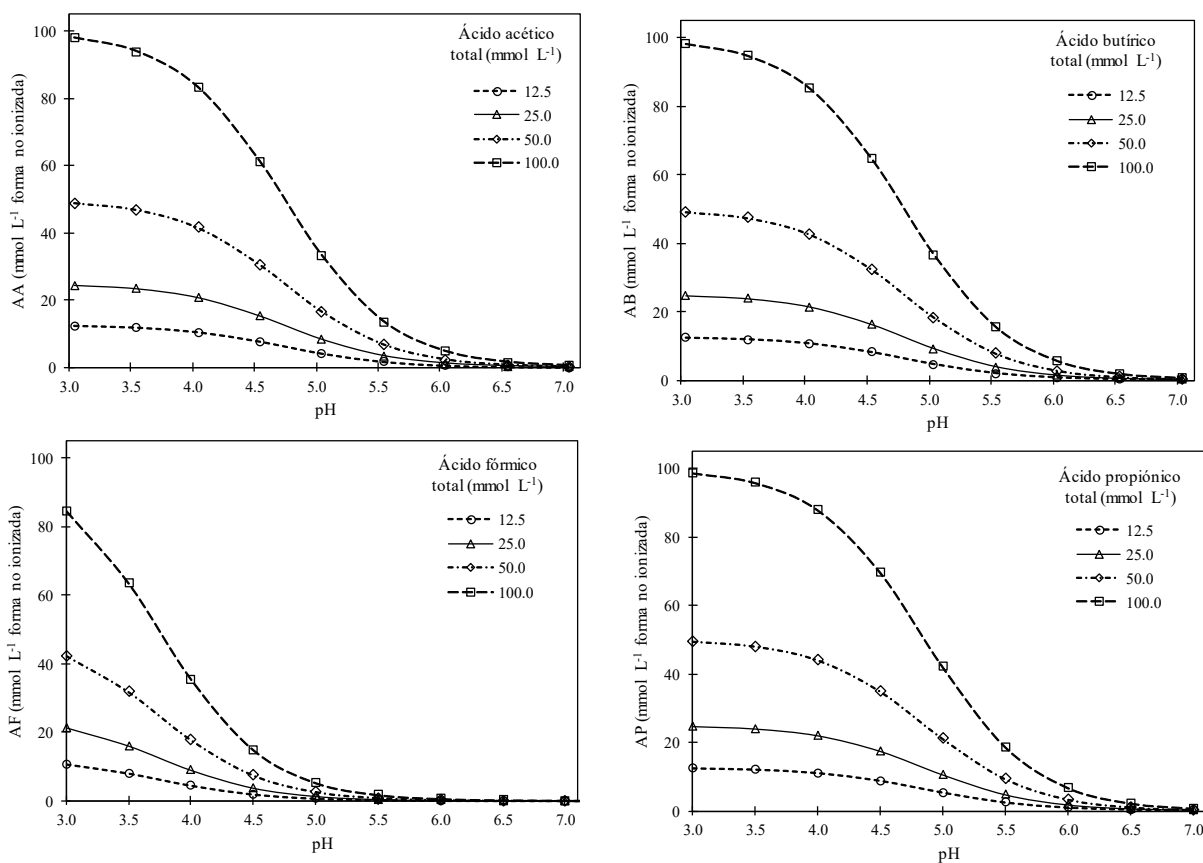
It is worth pointing out that the presence of VFAs in residues of plants such as cabbage (*Brassica oleracea*) has been known since the 1950s (Barnett and Ducan, 1953). The same is true for the phytotoxic effects of the VFAs in the soil in wheat bran residues and the amount of acids produced (Lynch, 1977; Lynch *et al.*, 1980), which is important, since wheat straw and kale residues are commonly used to induce RSD and biofumigation, respectively.

Finally, the first two authors that included the principles of RSD were Shinmura *et al.* (1999) in Japan and Blok *et al.* (2000) in the Netherlands, both for the control of pathogenic fungi in the soil. The VFAs found in pig slurry were later found to kill *Verticillium dahliae* (Tenuta *et al.*, 2002). Wheat bran was used to induce RSD and kill pathogenic bacteria and fungi in the soil (Momma *et al.*, 2006). Ethanol has also been used to produce RSD (Momma *et al.*, 2010); as well as grass, alfalfa, molasses, seeds, glucose, and others (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana and Mazzola, 2016; Momma, *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2016).

**The VFAs.** These acids, produced in the RSD, are toxic to nematodes, fungi and bacteria, mostly when in a non-ionized form in the soil solution or another medium (Goepfert and Hicks, 1969; Katase *et al.*, 2009; Tenuta *et al.*, 2002). For example, acetic acid,

cálculos para determinar las formas ionizada no ionizada se detallan por Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval (2013). La concentración de AGVsni en la solución del suelo desciende dramáticamente conforme el pH es menos ácido; la Figura 3, indica la concentración de cuatro AGVsni en función del pH. Este comportamiento de los AGVs es de suma importancia para predecir su toxicidad hacia los organismos; por ejemplo 100 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético a pH 5.5 genera alrededor de 13.7 mmol L<sup>-1</sup>

in its non-ionized or dissociated form (VFAsni) can be represented as CH<sub>3</sub>CCOH, whereas in its ionized form, (VFAsi) as CH<sub>3</sub>CCO<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>, and one or another will predominate based on the pH of the medium in which it is found; the principles and calculations to determine the ionized non-ionized forms are detailed by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013). The concentration of VFAsni in the soil solution decreases dramatically as the pH becomes less acidic; Figure 3 indicates



**Figura 3.** Formas no ionizadas de los ácidos acético, butírico, fórmico y propiónico, cuando se encuentran a concentraciones de 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 mmol L<sup>-1</sup>, todo en función del pH de la solución. Las gráficas fueron elaboradas por los autores utilizando los datos del peso molecular y pK de cada ácido y la ecuación Henderson-Hasselbalch, todo citado por Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval (2013).

**Figure 3.** Non-ionized forms of acetic, butyric, formic and propionic acids at concentrations of 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 mmol L<sup>-1</sup>, all based on the pH of the solution. The graphs were created by the authors using the data of the molecular weight and pH of each acid and the Henderson-Hasselbalch equation, all quoted by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013).

en su forma no ionizada (tóxica), mientras que 25 mmol L<sup>-1</sup> de ácido butírico a pH 4.5 genera 15.4 mmol L<sup>-1</sup>; es decir, la acidificación de una unidad (de 5.5 a 4.5) permitiría usar cuatro veces menos de ácido butírico que acético con similar generación de AGVsni. Cabe señalar, que cada AGVs tiene diferente comportamiento en función del pH, particularmente el ácido fórmico (Figura 3); asimismo, la toxicidad de *V. dahliae* y *P. omnivora* murieron en función del tipo, concentración y el tiempo de su exposición a los AGVs (Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

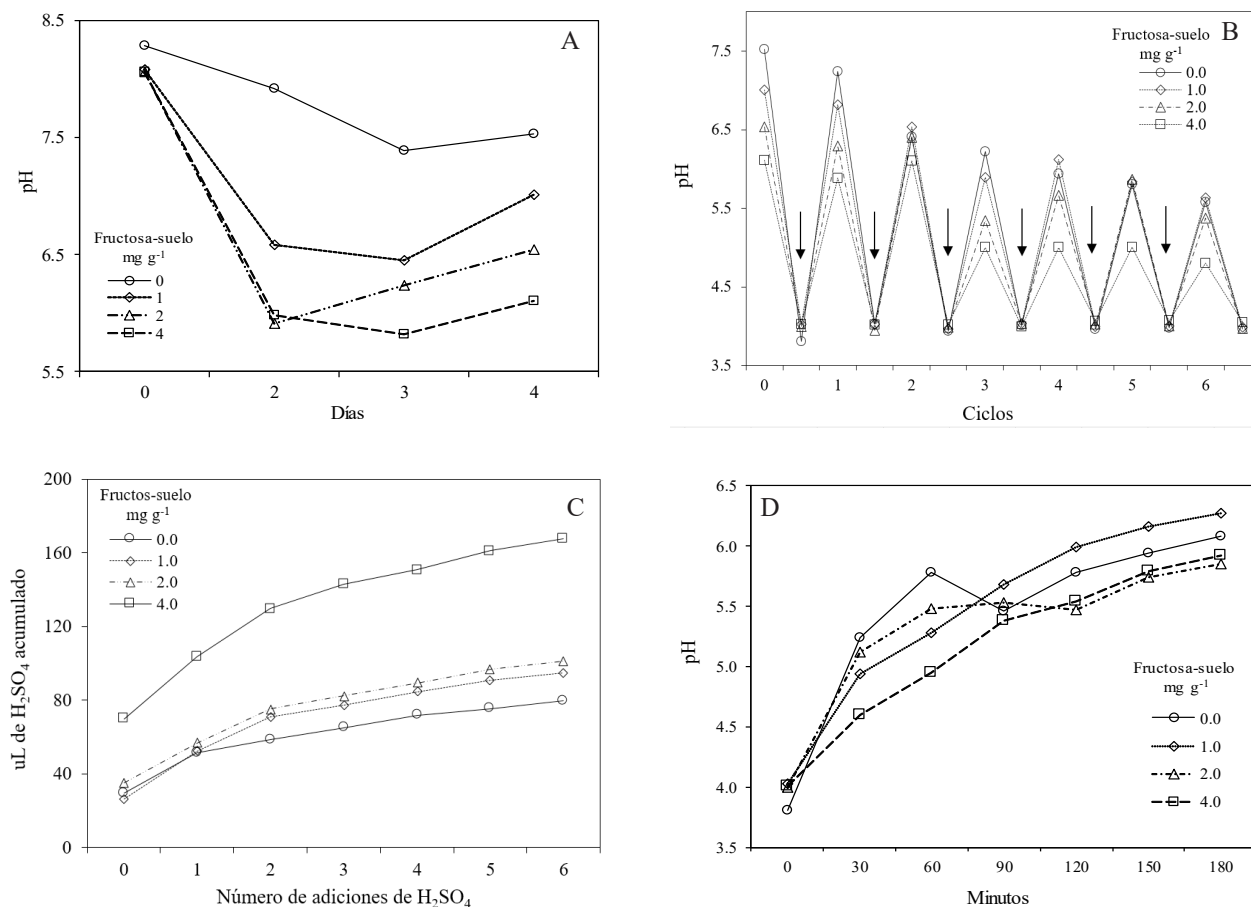
**Propuesta, AGVs modificando el pH.** Desde 1969, Goepfert e Hicks (1969) demostraron que al acidificar con HCl el medio que contenía AGVs únicamente moría la bacteria *Salmonella typhimurium*; recientemente, Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) registraron la muerte de los esclerocios de *P. omnivora* solo si se acidificaba con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> una solución obtenida del suelo tratado para DRS y que contenía AGVs. Por tanto, en condiciones de campo, la adición de algún ácido fuerte después de dos a siete días de iniciado el proceso de DRS muy probablemente incrementa la toxicidad de los AGVs, y consecuentemente, la muerte de los organismos susceptibles que se desee eliminar o disminuir su población. En el laboratorio, se determinó la cantidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> necesario para ajustar el pH ~4 en suelos con DRS (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018). Datos adicionales se muestran en este estudio, adaptados de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) donde se indujo cambios de pH en suelo adicionado con fructosa e inundación, posterior a ello, disminuciones adicionales del pH ~4 añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Figura 4 A-D.

De la Figura 4, se demuestra que el pH puede bajar ~4. Una agenda a investigar que proponemos, sería evaluar el cambio de pH~4 después de

the concentration of four VFAsni based on the pH. The behavior of the VFAs is crucial to understand its toxicity for organisms. For example, 100 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid, with a pH of 5.5 generates approximately 13.7 mmol L<sup>-1</sup> in its non-ionized form (toxic), whereas 25 mmol L<sup>-1</sup> of butyric acid at a pH of 4.5 generates 15.4 mmol L<sup>-1</sup>; in other words, the acidification of one unit (from 5.5 to 4.5) results in the use of four times less butyric than acetic acid with a similar production of VFAsni. It is worth pointing out that each VFAs has a different behavior based on the pH and particularly formic acid (Figure 3); likewise, the toxicity of *V. dahliae* and *P. omnivora* died based on the type, concentration and the time of exposure to the VFAs (Samaniego-Gaxiola and Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Figure 3. Non-ionized forms of acetic, butyric, formic and propionic acids at concentrations of 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 mmol L<sup>-1</sup>, all based on the pH of the solution. The graphs were created by the authors using the data of the molecular weight and pH of each acid and the Henderson-Hasselbalch equation, all quoted by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013).

**Proposal, VFAs modified by the pH.** In 1969, Goepfert and Hicks (1969) proved that only when acidifying with HCl the medium that contained VFAs, *Salmonella typhimurium* bacteria died; recently, Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) registered the death of the *P. omnivora* sclerotia only when acidifying with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a solution obtained from the soil treated for RSD that contained VFAs. Therefore, under field conditions, addition of a strong acid after 2 to 7 days of starting the RSD process may very likely increase the toxicity of VFAs, and consequently kill susceptible organisms that one wants to eliminate or reduce. In the laboratory, we determined the amount of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



**Figura 4. A-D. Cambios en el pH y cantidades de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> necesarias para ajustar el pH ~4 después de adicionar fructosa en suelo e inundar. A. Cambio de pH con distintas dosis de fructosa añadida al suelo inundado. B. Disminución de siete veces (seis ciclos) el pH ~4 añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (flechas) a las soluciones del suelo, las soluciones provienen del día cuatro de la Figura 4A. C. Cantidad acumulada (uL) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionado por siete veces para ajustar el pH ~4, lo que corresponden con las flechas de la Figura 4B. D. Tiempo de retorno del pH después de ajustarlo con el ácido a ~4, para las soluciones del día cuatro de la Figura 4A. Adaptado de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010).**

**Figure 4. A-D. Changes in pH and amounts of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> needed to adjust the pH ~4 after adding fructose to the soil and flooding it. A. Change in pH with different doses of fructose added to the flooded soil. B. Sevenfold reduction (six cycles) of the pH ~4 adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (arrows) to the soil solutions; solutions come from day 4 of Figure 4A. C. Accumulated amount (uL) of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> added sevenfold to adjust the pH ~4, which corresponds to the arrows in Figure 4B. D. Time of return of the pH after adjusting it with the acid to ~4, for the solutions of day 4 of Figure 4A. Adapted from Estupiñán-Herrera *et al.* (2010).**

la DRS al adicionar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; hacerlo en distintos tipos de suelo en campo, utilizando varios insumos, y determinando la viabilidad de los fitopatógenos. Asumiendo que un suelo una vez que alcanzó su máximo descenso de pH después de la DRS, que puede saturarse con agua en un 25 % de su volumen, entonces se requerirían alrededor de 3.3

required to adjust the pH ~4 in soils with RSD (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018). Additional data are shown in this study, adapted from Estupiñán-Herrera *et al.* (2010), where changes in pH were induced in soil with added fructose and flooding, followed by additional reductions of the pH ~4 by adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Figure 4 A-D.



toneladas de  $H_2SO_4$  para ajustar el pH  $\sim 4$ ; todo ello extrapolando a una hectárea los datos de la Figura 4C, los complementarios de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) y Samaniego *et al.* (2018).

**Uso de otros compuestos y/o AGVs directamente.** Durante la DRS, además de los AGVs, distintos compuestos letales para fitopatógenos en el suelo se han detectado y otros compuestos volátiles más que se han destacado por inhibir a fitopatógenos (van Agtmaal *et al.*, 2015). Por tanto, la DRS podría incrementar su eficiencia y eficacia al combinarla con la adición de los compuestos letales ya conocidos y aquellos por determinar. Algunos de esos compuestos podrían adicionarse justo después de que el pH y POR alcancen su máximo cambio.

En la DRS además de los AGVs se pueden formar compuestos biosidas como los isotiocianatos y nitrilos que son productos del hidrólisis (en el suelo) de los glucosinolatos, éstos últimos son metabolitos secundarios contenidos en las especies de plantas de la familia Brassicaceae, producidos en el suelo tanto en la biofumigación como en la DRS (Blok *et al.*, 2000; Ríos-Castaño, 2017). Los iones  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en agua en una condición reductiva alcanzada por la DRS, fueron letales para *F. oxysporum*, aunque Momma *et al.* (2011) sugiere confirmar e indagar el mecanismo por el que los iones tienen tal efecto. De acuerdo al pH alcalino o ácido del suelo, los AGVs pueden continuar descomponiéndose en compuestos igualmente letales para fitopatógenos en el suelo; a pH ácido y alcalino se formarán ácido nitroso y amoníaco, respectivamente (Lazarovits *et al.*, 2005; Tenuta y Lazarovits, 2002).

Los AGVs pueden estar presentes en grandes cantidades en medios como excretas líquidas de cerdo, las emulsiones de pescado procesado industrialmente y otras fuentes (Abbasi *et al.*, 2009; Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval, 2013;

Figure 4 shows that the pH can fall to  $\sim 4$ . An agenda to investigate what we propose would be to evaluate the change in pH  $\sim 4$  after RSD when adding  $H_2SO_4$ ; to do it in different types of soil in the field, using several inputs, and to determine the feasibility of the plant pathogens. Assuming that a soil type, after having reached its greatest reduction in pH after RSD, can be saturated with water in 25% of its volume, it would require around 3.3 tons of  $H_2SO_4$  to adjust the pH  $\sim 4$ ; all this, extrapolating to the data in Figure 4C to one hectare, complementary to Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) and Samaniego *et al.* (2018).

**Direct use of other compounds and/or VFAs.** During the RSD, along with the VFAs, different compounds, lethal to the plant pathogens in the soil, have been found, along with other volatile compounds that have stood out for inhibiting pathogens (van Agtmaal *et al.*, 2015). Therefore, the RSD may increase its efficiency and efficacy in combination with the addition of the known lethal compounds which are still to be determined. Some of these compounds may be added immediately after the pH and the ORP reach their maximum change.

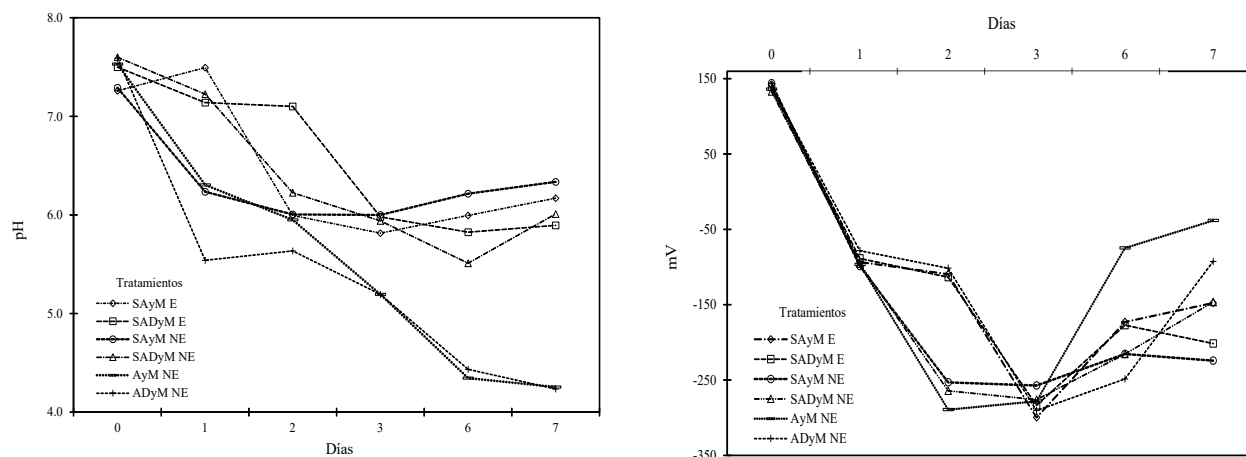
In the RSD, along with VFAs, biocidal compounds may be formed, such as isothiocyanates and nitriles, which are products of hydrolysis (in the soil) of the glucosinolates, the latter of which are secondary metabolites contained in the plant species of the Brassicaceae family, produced in the soil, both in biofumigation and in the RSD (Blok *et al.*, 2000; Ríos-Castaño, 2017).  $Fe^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  ions in water in a reductive condition reached by the RSD were lethal to *F. oxysporum*, although Momma *et al.* (2011) suggest the confirmation and investigation of the mechanism that give these ions such an effect. Depending on the alkalinity or

Tenuta *et al.*, 2002); por tanto, su uso potencial a partir de dichas fuentes. Adicionalmente, AGVs podrían generarse en suelo o solución acuosa utilizando melaza, para su uso posterior. En experimentos de nuestra autoría, utilizando la metodología de Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) y donde se mezclaron melaza, agua y suelo, o melaza y agua, fueron medidos el pH y el POR cómo se muestran en la Figura 5; el pH y el POR cambiaron de manera esperada, si bien, no se determinaron las cantidades de AGVs, de cualquier manera, es de esperar la formación de AGVs al mezclar melaza en suelo y/o agua.

Una modalidad de la DRS es el uso de etanol (Momma *et al.*, 2010). También podría utilizarse los ácidos acético, fórmico y otros de manera directa en suelo previamente saturado, como para incrementar

acidity of the soil, VFAs may continue decomposing in compounds equally lethal for plant pathogens in the soil; in an acid and alkaline pH, nitrous acid and ammonia will be formed, respectively (Lazarovits *et al.*, 2005; Tenuta and Lazarovits, 2002).

VFAs may be present in large amounts in media such as pig slurry, the emulsions of industrially processed fish and other sources (Abbasi *et al.*, 2009; Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval, 2013; Tenuta *et al.*, 2002); therefore, its potential use from previously mentioned sources. In addition, VFAs may be generated in the soil or aqueous solutions using molasses for later use. In earlier experiments carried out by us, using the method by Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) and where molasses, water and soil, or molasses and water were mixed, the pH and ORP were measured



**Figura 5.** Tratamientos donde se registraron cambios de pH y POR (mV). El suelo, agua corriente y melaza, permanecieron 20 min en autoclave antes de mezclarlos -◇- SAyM E; suelo, agua destilada y melaza permanecieron 20 min en autoclave antes de mezclarlos -□- SADyM E; suelo, agua corriente y melaza se mezclaron -○- SAyM NE; suelo, agua destilada y melaza se mezclaron -△- SADyM NE; mezcla de agua corriente y melaza - - - - AyM NE; mezcla de agua destilada y melaza - · - · - ADyM NE. Cuando se utilizó suelo, agua y melaza fue 150 g, 90 ml y 1% v/v (agua-melaza), respectivamente; y cuando se utilizó agua más melaza se utilizó 90 ml y 1% v/v, respectivamente. La autoclave estuvo a ~121 °C y 280 kPa.

**Figure 5.** Treatments which registered changes in pH and ORP (mV). The soil, tap water and molasses were kept in an autoclave for 20 min before mixing -◇- SAyM E; soil, distilled water and molasses were kept in -□- SADyM E; soil, tap water and molasses were mixed -○- SAyM NE; soil, distilled water and molasses were mixed -△- SADyM NE; mixture of tap water and molasses - - - - AyM NE; mixture of distilled water and molasses - · - · - ADyM NE. When using soil, water and molasses, it was 150 g, 90 ml and 1% v/v (water-molasses), respectively; and when using water and molasses, we used 90 ml and 1% v/v, respectively. The autoclave was kept at ~121 °C and 280 kPa.

o complementar los efectos de la DRS, tal es el caso de la patente en trámite solicitada por He *et al.* (2012). La distribución de AGVs también se ha realizado por el sistema de riego (Roskopf *et al.*, 2014).

El pH ácido, inducido por DRS, podría utilizarse para incrementar la toxicidad de fungicidas o pesticidas convencionales, es decir, combinar ambas prácticas, e incluso una práctica adicional podría ser la adición de un ácido fuerte posterior a la DRS y uso de pesticidas. Al respecto, se determinó que en solución amortiguador a pH 4 (base de acetato-ácido acético) y 1000 ppm del fungicida Propiconazole (Tilt®), los esclerocios de *P. omnivora* murieron en 20 min hasta en un 60%; bajo la misma condición, pero a pH 7 se necesitó de 72 horas para que los esclerocios murieran en similar porcentaje (Samaniego-Gaxiola, 2008). Asimismo, la DRS se ha utilizado combinándola con la solarización, como una alternativa para sustituir la fumigación con Bromuro de Metilo (Butler *et al.*, 2014).

**Inoculación de suelo y planta con otros organismos después de la DRS.** Numerosos cambios biológicos se han reportado después de la DRS, como la aparición de antagonistas de los fitopatógenos, aumento del ciclo de nutrientes, mayor crecimiento de los cultivos, la disminución de los índices de diversidad de bacterias y hongos y la aparición de microorganismos dominantes, todo con respecto a suelos sin DRS (Huang *et al.*, 2015, 2016; Hewavitharana y Mazzola, 2016; Liu *et al.*, 2016). Después de la DRS, se ha registrado el establecimiento de manera espontánea o inducida de especies de *Trichoderma* colonizando fitopatógenos como *P. omnivora* y *Sclerotium rolfsii* (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2013); pero también, el restablecimiento de fitopatógenos previamente eliminados, tal es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y *Monosporascus* en un

as shown in Figure 5; the pH and the ORP changed as expected, although the amounts of VFAs were not determined. Regardless of this, the formation of VFAs is expected when mixing molasses in soil and/or water.

A way to induce RSD is the use of ethanol (Momma *et al.*, 2010). Acetic, formic, and other acids could also be used directly in previously saturated soil to increase or complement the effects of the RSD, as in the case of the patent pending requested by He *et al.* (2012). The distribution of VFAs has also been carried out with the system of irrigation (Roskopf *et al.*, 2014).

The acidic pH, induced by the RSD, could be used to increase the toxicity of conventional fungicides or pesticides, i.e., combining both practices, and even an additional practice could be the addition of a strong acid after RSD and use of pesticides. In this regard, it was determined that in a buffer solution at a pH of 4 (base of acetate-acetic acid) and 1000 ppm of the fungicide Propiconazole (Tilt®), the *P. omnivora* sclerotia died in 20 min by up to 60%; under the same condition, but at a pH of 7, 72 hours were required for the sclerotia to die in a similar percentage (Samaniego-Gaxiola, 2008). Likewise, the RSD has been used in combination with solarization as an alternative to substitute dusting with methyl bromide (Butler *et al.*, 2014).

**Inoculation of soil and plant with other organisms after RSD.** Several biological changes have been reported after RSD, such as the appearance of antagonists of plant pathogens, an increase in nutrient cycles, an increase in crop growth, the reduction of the diversity of bacteria and fungi, and the appearance of dominant microorganism, all of this regarding soils without RSD (Huang *et al.*, 2015, 2016; Hewavitharana and Mazzola, 2016; Liu *et al.*, 2016). After RSD, we recorded the spontaneous or induced establishment of species

segundo ciclo del cultivo de sandía *Citrullus lanatus* (Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, después de la DRS, la inoculación al suelo, semillas y plántulas con especies de *Trichoderma* u otros hongos y bacterias, probablemente tendría efectos benéficos para el control de enfermedades de plantas; particularmente al evaluar bacterias obtenidas de la DRS que muestren antagonismo hacia fitopatógenos (Ueki *et al.*, 2017, 2018), los endofíticos de *Trichoderma*, bacterias y otros hongos (Druzhinina *et al.*, 2011; Eljounaidi *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016). Una gran cantidad de compuestos tóxicos para los fitopatógenos y benéficos para las plantas son producidos por bacterias y hongos en el suelo tanto *in vitro* como en la DRS (Hayat *et al.*, 2010; Hewavitharana *et al.*, 2014; Siddiquee *et al.* 2012); tanto los compuestos como los microorganismos, después de la DRS, podrían seguir evaluándose, introduciéndolos o favoreciendo su producción para el control de los fitopatógenos. Por ejemplo, de *Trichoderma harzianum* se detectaron 258 compuestos volátiles, con 50 % de abundancia de ácido acético cuando la extracción para su detección se realizó con metanol (Siddiquee *et al.* 2012), es decir, se podría investigar si el hongo es capaz de producir este ácido en cantidad significativa posterior a una DRS.

**Aplicaciones prácticas de la DRS.** Los cultivos próximos a rastrear, como la alfalfa en su último año de cultivo; residuos de cultivo como los cereales; la poda del césped; residuos de cosecha como los ruznos de la nuez pecanera; así como materiales orgánicos abundantes en cada región de México, son algunas de las múltiples fuentes de Carbono que se podrían usar y evaluar para una DRS.

Habría que considerar para una evaluación en particular, la temperatura a la que la DRS es más efectiva, y aunque está poco estudiada, temperaturas del suelo de 17 a > 30 °C ha funcionado

of *Trichoderma* colonizing pathogens such as *P. omnivora* and *Sclerotium rolfsii* (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2013); but also the reestablishment of previously eliminated pathogens such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Monosporascus* in a second cycle of the watermelon crop *Citrullus lanatus* (Liu *et al.*, 2018). Moreover, after RSD, the inoculation of soil, seeds and seedlings with species of *Trichoderma*, or other fungi, and bacteria may have beneficial effects in the control of plant diseases; particularly when evaluating bacteria obtained from the RSD that show antagonism towards phytopathogens (Ueki *et al.*, 2017, 2018), the endophytes of *Trichoderma*, bacteria and other fungi (Druzhinina *et al.*, 2011; Eljounaidi *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016).

A large amount of compounds, toxic to plant pathogens and beneficial to plants, are produced by bacteria and fungi in the soil, both *in vitro* and in the RSD (Hayat *et al.*, 2010; Hewavitharana *et al.*, 2014; Siddiquee *et al.* 2012); both the compounds and the microorganisms, after the RSD, may continue to be evaluated, introducing them or promoting their production for the control of pathogens. For example, 258 volatile compounds of *Trichoderma harzianum* were found, with an abundance of 50% of acetic acid when the extraction for their detection was carried out using methanol (Siddiquee *et al.* 2012), i.e., it is possible to investigate if the fungus is capable of producing this acid in a significant amount after an RSD.

**Practical applications of the RSD.** The next crops to be studied, such as alfalfa in its last year of planting, residues of crops such as cereals, grass trimmings, residues of crops such as pecan shells, as well as organic materials abundant in each region of Mexico, are some of the multiple sources of carbon that could be used and evaluated for an RSD.

satisfactoriamente (Shennan *et al.*, 2014; Yossen *et al.*, 2008). Los tipos de materia orgánica y sus cantidades son también factores que afectan la DRS, de manera general, se necesitan 4 mg de Carbono por cada gramo de suelo (4 mg g<sup>-1</sup>), lo que equivale a 2 Kg m<sup>-2</sup> de paja de arroz/suelo (salvado) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017). El carbono orgánico fácilmente oxidado (CFO) es una forma altamente apropiada para incorporarse al suelo y provocar una exitosa DRS. Por ejemplo, la glucosa y la cascarilla de trigo tienen 276 y 122 g Kg<sup>-1</sup> de CFO, respectivamente, pero la primera induce los cambios más grandes y efectividad de la DRS para controlar a *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2016). Composta de estiércol (11 Mg ha<sup>-1</sup>) no fue efectiva para inducir los cambios típicos de la DRS y no controló a *R. solani* y *Pratylenchus penetrans* (Hewavitharana y Mazzola, 2016); entretanto, estiércol y otros tipos de materia orgánica descompuestos en condiciones aerobias han tenido efectos inconsistentes y algunas veces han favorecido fitopatógenos como *R. solani* (Bonanomi *et al.*, 2007). Por tanto, no se ha determinado que estiércol (maduro o compostado) induzcan DRS, aunque evaluaciones adicionales podrían determinar que si lo puede ser.

Es importante mencionar que los AGVs se pierden por volatilización y degradación microbiana, como ocurrió entre uno a dos días a concentraciones hasta ~ 500 mmol L<sup>-1</sup> contenido en estiércoles frescos de cerdo y ganado lechero (Kirchmann & Lundvall, 1993); sin embargo, cuando el suelo tiene un suministro constante de AGVs su degradación puede retrasarse meses (Hrapovic y Rowe, 2002). Consecuentemente, el uso y aplicación continua de excretas frescas de ganado que contengan AGVs podría evaluarse, tomando en cuenta si bacterias patógenas de animales y humanos sobreviven.

En los últimos 10 años, la investigación en la DRS se ha enfocado en mejorar su eficiencia, pero en México aún falta por evaluarse en distintos

For a particular evaluation, it may be worth considering the temperature at which RSD is most effective, and although it is scarcely studied, soil temperatures of 17 to > 30 °C have worked in a satisfactory manner (Shennan *et al.*, 2014; Yossen *et al.*, 2008). The types of organic matter and their amounts are also factors that have an effect on the RSD; in general terms, 4 mg of carbon are required for every gram of soil (4 mg g<sup>-1</sup>), which is equal to 2 Kg m<sup>-2</sup> of rice hay/soil (bran) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017). Easily oxidized organic carbon (EOC) is a highly appropriate method that can be incorporated to the soil and could lead to a successful RSD. For example, glucose and wheat hay have 276 and 122 g Kg<sup>-1</sup> of EOC, respectively; the former induces the greatest changes and effectiveness of RSD to control *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2016). Manure compost (11 Mg ha<sup>-1</sup>) was not effective to induce the typical changes of the RSD and did not control *R. solani* and *Pratylenchus penetrans* (Hewavitharana and Mazzola, 2016); meanwhile, manure and other types of organic matter decomposed in aerobic conditions have had inconsistent effects, and have occasionally favors phytopathogens such as *R. solani* (Bonanomi *et al.*, 2007). Currently, manure (mature or composted) has not consistently showed induction of RSD, although additional approaches have to be explored.

It is important to mention that VFAs are lost by volatilization and microbial degradation, as it occurred from one to two days with concentrations of up to ~ 500 mmol L<sup>-1</sup> contained in fresh pig and dairy cow manures (Kirchmann & Lundvall, 1993); however, when the soil has a constant supply of VFAs, its degradation could be delayed for months (Hrapovic and Rowe, 2002). Consequently, the constant use and application of fresh cattle slurry containing VFAs could be evaluated, taking into account whether or not pathogenic animal and human bacteria survive.

cultivos, suelos y fitopatógenos. No obstante, la DRS podría ser particularmente útil en la zona sur de México, en donde la lluvia es abundante y los suelos son ácidos, ambos factores favorables para la DRS.

En el Cuadro 2, se ejemplifican algunos insumos utilizados para generar la DRS y el control de organismos. Ésta información, puede servir como base para evaluarse en suelos, donde cultivos son

For the last 10 years, investigation on RSD has focused on improving its efficiency, although in Mexico, it is yet to be evaluated in different crops, soils and phytopathogens. However, the RSD could be particularly useful in southern Mexico, where rainfalls are abundant and soils are acidic, both of which are favorable factors for RSD.

Table 2 shows examples of inputs used to generate RSD and the control of organisms. This

**Cuadro 2. Insumos utilizados para inducir la DRS, para controlar organismos perjudiciales para cultivos agrícolas.**  
**Table 2. Inputs used to induce RSD to control harmful organisms to agricultural crops.**

| Insumos                                                                              | Cantidades                                                                        | Organismos a controlar                                                                     | Cultivo         | Referencia                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| <i>Brassica oleracea</i> y <i>Lolium perenne</i> .                                   | 5 y 8 Mg/ton peso seco para <i>Brassica</i> y <i>Lolium</i> , respectivamente.    | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> | Ninguno (suelo) | Blok <i>et al.</i> 2000.            |
| Paja de trigo                                                                        | 1-1.6 % (paja-suelo, p/p)                                                         | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> and <i>Ralstonia solanacearum</i>            | Ninguno (suelo) | Momma <i>et al.</i> , 2006.         |
| Melaza                                                                               | 13.9-27.7 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>                                         | Nematodos                                                                                  | Tomate          | Di Gioia <i>et al.</i> , 2016.      |
| Melaza                                                                               | 8.2 Mg ha <sup>-1</sup>                                                           | <i>Macrophomina phaseolina</i> F. <i>oxysporum</i>                                         | Fresa           | Roskopf <i>et al.</i> , 2014        |
| Pajas de trigo y arroz, etanol, orujo de uva, residuos de cebolla, pasta de mostaza. | ~ 9 Mg ha <sup>-1</sup> como carbono contenido, excepto el etanol, aplicado (1%). | <i>V. dahliae</i>                                                                          | Ninguno (suelo) |                                     |
| Etanol                                                                               | 2-0.5% (v/v), 50-200 L m <sup>-2</sup>                                            |                                                                                            |                 |                                     |
| Paja de arroz                                                                        | 4.9 Mg ha <sup>-1</sup>                                                           | Bacterias, hongos, malezas y nematodos                                                     | Hortalizas (8)  | Shennan <i>et al.</i> , 2014.       |
| Etanol                                                                               | 8.9 kL ha <sup>-1</sup>                                                           |                                                                                            | Frutas (4)      |                                     |
| <i>B. junacea</i>                                                                    | 4.9 Mg ha <sup>-1</sup>                                                           |                                                                                            |                 |                                     |
| Césped                                                                               | Hasta Mg ha <sup>-1</sup>                                                         |                                                                                            |                 |                                     |
| Paja de arroz                                                                        | 4.4 Mg ha <sup>-1</sup>                                                           | <i>Pratylenchus penetrans</i> y <i>R. solani</i>                                           | Manzano         | Hewavitharana y Mazzola, 2016.      |
| <i>B. junacea</i>                                                                    | 4.4 Mg ha <sup>-1</sup>                                                           |                                                                                            |                 |                                     |
| Paja de arroz                                                                        | 2 kg m <sup>-2</sup>                                                              |                                                                                            |                 |                                     |
| Pasta de <i>B. junacea</i>                                                           | 2 kg m <sup>-2</sup>                                                              |                                                                                            |                 |                                     |
| Orujo de uva                                                                         | 4 kg m <sup>-2</sup>                                                              | <i>Phytophthora nicotianae</i>                                                             | Pimiento        | Serrano-Pérez <i>et al.</i> , 2017. |
| Residuos de cebada fermentada                                                        | 3.5 kg m <sup>-2</sup>                                                            |                                                                                            |                 |                                     |

afectados negativamente por organismos. La Figura 6, muestra algunos aspectos de DRS en la alfalfa, nogal e higuera que actualmente están en evaluación.

## CONCLUSIONES

La DRS tiene un enorme potencial de uso en México, debido a las grandes extensiones de cereales cultivados, a partir de los cuales se pueden obtener las fuentes de Carbono necesarias. Adicionalmente, el re-uso de plástico negro convencional y la posible adaptación a sistemas de riego sub-superficiales, pueden complementar esta tecnología; particularmente, la DRS es altamente rentable en cultivos de invernadero. La melaza es otra fuente de Carbono sumamente económica en algunas regiones de México, así como la disponibilidad de excretas de cerdos y ganado. De esta manera, la DRS tiene la ventaja de poder usar una gran diversidad de fuentes de Carbono en comparación con la biofumigación.

information could serve as a basis to be evaluated in soils, where organisms negatively affect crops. Figure 6 shows some aspects of RSD in alfalfa, chestnut and fig trees that are currently being evaluated.

## CONCLUSIONS

RSD has an enormous potential for use in Mexico, due to the large extensions of cereal planted, from which necessary sources of carbon can be obtained. In addition, reusing regular black plastic and the possible adaptation of sub-surface irrigation may complement this technology; in particular, RSD is highly profitable in greenhouse crops. Molasses are another very cheap source of carbon in some areas of Mexico, along with the availability of pig and cattle slurry. In this way, RSD has the advantage of being able to use a large diversity of carbon sources in comparison with biofumigation.



**Figura 6.** Izquierda, plástico en parcela experimental cubriendo suelo después de aplicar melaza para inducir DRS, en donde posteriormente se estableció alfalfa. Centro, Melaza adicionada en suelo en microparcela en donde se sembraría nueces de nogal. Derecha, plástico cubriendo suelo donde se aplicó melaza, donde previamente murió una higuera atacada por *P. omnivora*.

**Figure 6.** Left, plastic in experimental field covering the soil after applying molasses to induce RSD, where alfalfa was later planted. Center, molasses added on soil in micro plot where chestnut trees were to be planted. Right, plastic covering soil on which molasses were added, and where a fig tree died previously by a *P. omnivora*.

## AGRADECIMIENTOS

Al fondo SAGARPA-CONACYT, a través del proyecto clave 2011-13-175247, financiando parte de la información. Además, a Daniela Samaniego Castruita por revisar el manuscrito y su versión en inglés.

## LITERATURA CITADA

- Abbasi, P. A., Lazarovits, G., & Jabaji-Hare, S. (2009). Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology*, 99(3), 274-281. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0274>
- Alexander, M. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc. 472 p.
- Bailey, K. L., & Lazarovits, G. (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and tillage research*, 72(2), 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00086-2)
- Barnett, A. J. G., & Duncan, R. E. B. (1953). The volatile fatty acids present in fresh and in fermented marrow-stem kale. *Plant and Soil*, 4(4), 370-376. <https://doi.org/10.1007/BF01435506>
- Bejarano-González, F. (Editor). (2017). *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. 358 p. [https://www.researchgate.net/profile/Omar\\_Arellano-Aguilar/publication/319515704\\_Los\\_Plaguicidas\\_Altamente\\_Peligrosos\\_en\\_Mexico/links/59b04922a6fdcc3f8889aca4/Los-Plaguicidas-Altamente-Peligrosos-en-Mexico.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Omar_Arellano-Aguilar/publication/319515704_Los_Plaguicidas_Altamente_Peligrosos_en_Mexico/links/59b04922a6fdcc3f8889aca4/Los-Plaguicidas-Altamente-Peligrosos-en-Mexico.pdf) (consulta, Octubre 2018).
- Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J., & Bollen, G. J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90(3), 253-259. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2000.90.3.253>
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., & Scala, F. (2007). Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology*, 89(3), 311-324. <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0307/030701.pdf>
- Butler, D. M., Kokalis-Burelle, N., Albano, J. P., McCollum, T. G., Muramoto, J., Shennan, C., & Roskopf, E. N. (2014). Anaerobic soil disinfestation (ASD) combined with soil solarization as a methyl bromide alternative: vegetable crop performance and soil nutrient dynamics. *Plant and soil*, 378(1-2), 365-381. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2030-z>
- Cochrane, V. W. (1958). *Physiology of fungi*. John Wiley & Sons Inc.; London. 524 p.
- Conn, K. L., Tenuta, M., & Lazarovits, G. (2005). Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology*, 95(1), 28-35. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0028>

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the SAGARPA-CONACYT fund, through the project code 2011-13-175247, financing part of the information. Also, to Daniela Samaniego Castruita for revising the manuscript and its version in English.

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

- De la Cruz, E., Bravo, V., & Ramírez, F. (2018). Manual plaguicida de Centroamérica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional. Costa Rica. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/> (consulta, Octubre 2018).
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *NATURE REVIEWS| MICROBIOLOGY*, 9, 749-759. <https://doi.org/10.1038/nrmi.cro2637>
- Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>
- Estupiñán-Herrera, C., Samaniego-Gaxiola, J. A., Cueto-Wong, C., y Balagurusamy, N. (2010). Inducción del cambio temporal del pH en la solución de suelos inundados y adicionados con fructosa y ácido sulfúrico. Pp. 710-714. Memoria de la XXII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED. Noviembre 10-12. Gómez Palacio, Durango, México. 1277 p. http://faz.ujed.mx/files/Memoria_XXII_FAZ_UJED_2010.pdf
- Goepfert, J. M., & Hicks, R. (1969). Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 97(2), 956-958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249784/pdf/jbacter00392-0512.pdf>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- He, Z. L., Roskopf, E. N., Lin, Y., Powell, C. A., Hu, C., Iriarte, F., & Kokalis-Burelle, N. (2012). U.S. Patent No. US 20120015809 A1. <https://patentimages.storage.googleapis.com/2c/6b/12/21ba1c21271ff4/US20120015809A1.pdf>
- Hewavitharana, S. S., & Mazzola, M. (2016). Carbon source-dependent effects of anaerobic soil disinfestation on soil microbiome and suppression of *Rhizoctonia solani* AG-5 and *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology*, 106(9), 1015-1028. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0329-R>

- Hewavitharana, S. S., Ruddell, D., & Mazzola, M. (2014). Carbon source-dependent antifungal and nematocidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. *European journal of plant pathology*, 140(1), 39-52. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0442-5>
- Hrapovic, L., & Rowe, R. K. (2002). Intrinsic degradation of volatile fatty acids in laboratory-compacted clayey soil. *Journal of contaminant hydrology*, 58(3-4), 221-242. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(02\)00038-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(02)00038-4)
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhu, R., Zhang, J., & Cai, Z. (2015). Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation. *Microbiological research*, 181, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.004>
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhang, J., Wang, F., & Cai, Z. (2016). Changes in the soil microbial community after reductive soil disinfestation and cucumber seedling cultivation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5581-5593. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7362-6>
- Ioannou, N. S. R. W., Schneider, R. W., & Grogan, R. G. (1977). Effect of flooding on the soil gas composition and the production of microsclerotia by *Verticillium dahliae* in the field. *Phytopathology*, 67, 651-656. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n05_651.pdf
- Katase, M., Kubo, C., Ushio, S., Ootsuka, E., Takeuchi, T., & Mizukubo, T. (2009). Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfestation. *Nematological Research*, 39(2), 53-62. <https://doi.org/10.3725/jjn.39.53>
- Kirchmann, H., & Lundvall, A. (1993). Relationship between N immobilization and volatile fatty acids in soil after application of pig and cattle slurry. *Biology and fertility of soils*, 15(3), 161-164. <https://doi.org/10.1007/BF00361605>
- Lazarovits, G., Conn, K. L., Abbasi, P. A., & Tenuta, M. (2005). Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soil-borne plant pathogens. *Acta Horticulturae*, 698, 215-224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.698.29>
- Liu, L., Kong, J., Cui, H., Zhang, J., Wang, F., Cai, Z., & Huang, X. (2016). Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of *Fusarium oxysporum* and microbial communities during reductive soil disinfestation. *Biological Control*, 101, 103-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.011>
- Liu, L., Chen, S., Zhao, J., Zhou, X., Wang, B., Li, Y., Zheng, G., Zhang, J., Cai, Z., & Huang, X. (2018). Watermelon planting is capable to restructure the soil microbiome that regulated by reductive soil disinfestation. *Applied Soil Ecology*, 129, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.004>
- Lynch, J. M. (1977). Phytotoxicity of acetic acid produced in the anaerobic decomposition of wheat straw. *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), 81-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00672.x>
- Lynch, J. M., Gunn, K. B., & Panting, L. M. (1980). On the concentration of acetic acid in straw and soil. *Plant and soil*, 56(1), 93-98. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02197956>
- Meghvansi, M. K., & Varma, A. (Eds.). (2015). *Organic amendments and soil suppressiveness in plant disease management* (Vol. 46). Dordrecht: Springer, Switzerland. 531p.
- Menzies, J. D. (1962). Effect of anaerobic fermentation in soil on survival of sclerotia of *Verticillium dahliae* (Abst). *Phytopathology*, 52(8), 743. <http://www.apsnet.org/meetings/meetingarchives/Pages/default.aspx>
- Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., & Shishido, M. (2006). Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). *Journal of General Plant Pathology*, 72(4), 247-252. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0274-z>
- Momma, N. (2008). Biological soil disinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 42(1), 7-12. <https://doi.org/10.6090/jarq.42.7>
- Momma, N., Momma, M., & Kobara, Y. (2010). Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *Journal of general plant pathology*, 76(5), 336-344. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0252-3>
- Momma, N., Kobara, Y., & Momma, M. (2011). Fe²⁺ and Mn²⁺, potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfestation. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 331-335. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0336-8>
- Momma, N., Kobara, Y., Uematsu, S., Kita, N., & Shinmura, A. (2013). Development of biological soil disinfestations in Japan. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(9), 3801-3809. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4826-9>
- Okazaki, H. (1985). Volatile (s) from glucose-amended flooded soil influencing survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 51(3), 264-271. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/51/3/51_3_264/pdf/-char/ja
- Okazaki, H., & Nose, K. (1986). Acetic acid and n-butyric acid as causal agents of fungicidal activity of glucose-amended flooded soil. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52(3), 384-393. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/52/3/52_3_384/pdf
- Ponnamperuma, F. N. (1972). The chemistry of submerged soils. In *Advances in agronomy* (Vol. 24, pp. 29-96). Academic Press. <https://pdfs.semanticscholar.org/ed7f/45fc78cfd694ed285e17590058c6c7aa2e62.pdf>
- Ríos-Castaño, P. (2017). Control de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en dehesas mediante biofumigación con *Brassica* spp. Tesis Doctoral. Córdoba España. Pp. 176. <http://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/15073/2017000001669.pdf?sequence=1>
- Roskopf, E. N., Burrelle, N., Hong, J., Butler, D. M., Noling, J. W., He, Z., Booker, B., & Sances, F. (2014). Comparison of Anaerobic Soil Disinfestation and Drip-Applied Organic Acids for Raised-Bed Specialty Crop Production in Florida. Proc. VIIIth IS on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation. *Acta Horticulturae*, 1044:221-228. Doi: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.26
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (1994). Viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dugg. en suelos inundados y complementados con glucosa. *Revista*

- Mexicana de Fitopatología*, 12(1), 125-133. <http://rmf.smf.org.mx/#>
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2008). Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* Dugg Hennebert II expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, (1) 32-39. <http://www.redalyc.org/html/612/61226106/>
- Samaniego Gaxiola, J. A., Ordóñez-Meléndez, H. J., Pedroza Sandoval, A., & Cueto-Wong, C. (2010). Relationship between the drying of the sclerotia of *Phymatotrichopsis omnivora* and its survival. *Revista Mexicana de Micología*, 32(1), 49-58. <http://www.redalyc.org/pdf/883/88319899006.pdf>
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2013). Supervivencia de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* en función del pH in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 337-351. <http://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/2631/263127575001/1>
- Samaniego-Gaxiola, J. A., & Balagurusamy, N. (2013). Survival of soil-borne fungus *Phymatotrichopsis omnivora* after exposure to volatile fatty acids. *Journal of general plant pathology*, 79(2), 105-109. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-013-0436-8>
- Samaniego-Gaxiola, J. A., & Pedroza-Sandoval, A. (2013). Usos potenciales de los ácidos grasos volátiles en suelo, agua y aire. *Terra Latinoamericana*, 31(2), 155-163. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000300155
- Samaniego-Gaxiola, J. A., Pedroza-Sandoval, A., Chew-Madaveitia, Y., & Gaytán-Mascorro A. (2018). Reductive disinfestation, desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery. *Revista Mexicana de Fitopatología*, (sometido para publicación).
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Serrano-Pérez, P., Rosskopf, E., De Santiago, A., & del Carmen Rodríguez-Molina, M. (2017). Anaerobic soil disinfestation reduces survival and infectivity of *Phytophthora nicotianae* chlamydospores in pepper. *Scientia horticulturae*, 215, 38-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.003>
- Shennan C, Muramoto J, Lamers J, Mazzola M, Rosskopf EN, Kokalis-Burelle N, Momma N, Butler DM, and Kobara Y. (2014). Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: Current knowledge and future directions. *Acta Hort.* 1044:165-175. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1044.20>
- Shinmura, A., Sakamoto, N., & Abe, H. (1999). Control of *Fusarium* root rot of Welsh onion by soil reduction. (Abstract in Japanese). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65(3), 352-353. <https://ci.nii.ac.jp/els/contents110002733276.pdf?id=ART0003023797>
- Shrestha, U., Ownley, B. H., Rosskopf, E. N., Dee, M. E., & Butler, D. M. (2013). Optimization of amendment C: N ratio in anaerobic soil disinfestation for control of *Sclerotium rolfsii*. In Proceedings of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, San Diego, CA (pp. 14-1).
- Shrestha, U., Augé, R. M., & Butler, D. M. (2016). A Meta-Analysis of the Impact of Anaerobic Soil Disinfestation on Pest Suppression and Yield of Horticultural Crops. *Frontiers in plant science*, 7, article 1254, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01254>
- Siddiquee, S., Cheong, B. E., Taslima, K., Kausar, H., & Hasan, M. M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of chromatographic science*, 50(4), 358-367. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms012>
- Stanier, R. Y., Doudoroff, M., y Adelberg, E. A. (1977). *Microbiología*. Aguilar. España. 932 p.
- Stover, R. H. (1955). Flood-fallowing for eradication of *Fusarium oxysporum* f. *cubense*: III. Effect of oxygen on fungus survival. *Soil Science*, 80(5), 397-412. https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1955/11000/FLOOD_FALLLOWING_FOR_ERADICATION_OF_Fusarium.7.aspx
- Tenuta, M., & Lazarovits, G. (2002). Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92(3), 255-264. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.3.255>
- Tenuta, M., Conn, K. L., & Lazarovits, G. (2002). Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92(5), 548-552. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2002.92.5.548>
- Ueki, A., Takehara, T., Ishioka, G., Kaku, N., & Ueki, K. (2017). Degradation of the fungal cell wall by clostridial strains isolated from soil subjected to biological soil disinfestation and biocontrol of *Fusarium* wilt disease of spinach. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(22), 8267-8277. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8543-7>
- Ueki, A., Kaku, N., & Ueki, K. (2018). Role of anaerobic bacteria in biological soil disinfestation for elimination of soil-borne plant pathogens in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 102 (15), 6309-6318. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9119-x>
- van Agtmaal, M., van Os, G. J., Hol, W. G., Hundscheid, M. P., Runia, W. T., Hordijk, C. A., & de Boer, W. (2015). Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. *Frontiers in microbiology*, 6, article 701, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00701>
- Yossen, V., Zumelzu, G., Gasoni, L., & Kobayashi, K. (2008). Effect of soil reductive sterilization on *Fusarium* wilt in greenhouse carnation in Córdoba, Argentina. *Australasian Plant Pathology*, 37(5), 520-522. <https://doi.org/10.1071/AP08039>

Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds

Evaluación de la transmisión de begomovirus por semilla de jamaica y malezas asociadas

Candelario Ortega-Acosta, Daniel L. Ochoa-Martínez*, Javier Hernández-Morales, Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 56230. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México; Sergio Ramírez-Rojas, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. Colonia Centro Zacatepec, Morelos; Jorge A. Gutiérrez-Gallegos, Herbario JES, Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, 56230, Estado de México.
*Correspondence author ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 20 de Junio, 2018.

Aceptado: 12 de Octubre, 2018.

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J, Ramírez-Rojas S and Gutiérrez-Gallegos JA. 2018. Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 135-146.
DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1806-3

Primera publicación DOI: 23 de Octubre, 2018.
First DOI publication: October 23, 2018.

Resumen. En el estado de Guerrero, México, los begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) y *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) se han encontrado asociados al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). El objetivo de este estudio fue conocer si OYMMV y WfaBV3 pueden infectar malezas presentes en cultivos comerciales de esta especie y si se transmiten por semilla. En 2016, se recolectaron plantas de jamaica y malezas con síntomas de amarillamiento y mosaico en Guerrero. Se extrajo DNA total y se realizó PCR

Abstract. In the state of Guerrero, Mexico, the begomoviruses *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) and *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) have been found in association with roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). The objective of this study was to determine if OYMMV and WfaBV3 can infect weeds commonly found in roselle commercial crops and if they are seed-transmitted. Roselle plants and weeds showing yellowing and mosaic were collected in Guerrero in 2016. Using universal primers for begomoviruses and specific primers for the 18s rRNA gene as an internal control, total DNA was analyzed by PCR. Begomovirus positive samples were later analyzed with primers specific for OYMMV and WfaBV3. One hundred of the roselle and weed seeds collected from symptomatic plants was analyzed for begomoviruses by PCR; 100 seeds from each roselle cultivar and 40 seeds from each weed were planted in seedling beds. Young leaves of roselle seedlings were analyzed by PCR after circular DNA amplification by the Rolling Circle. The

con iniciadores universales para begomovirus y específicos para el gen 18s rRNA como control interno. Las muestras positivas se analizaron posteriormente con iniciadores específicos para OYMMV y WfaBV3. Cien semillas de jamaica y de malezas que presentaban síntomas se analizaron por PCR para begomovirus; cien semillas de cada cultivar de jamaica y 40 semillas de cada maleza se sembraron en almácigos para obtener plántulas. Hojas jóvenes de las plántulas de jamaica se analizaron por PCR después de la amplificación de DNA por círculo rodante. En plantas maduras de jamaica se detectó a WfaBV3 y OYMMV. En *Sida collina*, *S. aggregata*, *S. acuta*, *S. haenkeana* y *Malacra fasciata* se detectó al OYMMV en planta madura, semilla y plántulas. Este es el primer reporte de cuatro nuevos hospedantes del OYMMV y su transmisión por semilla.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, amplificación por círculo rodante.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es afectada por virus del género Begomovirus (*Geminiviridae*), los cuales poseen un genoma circular de DNA, monopartita (DNA-A) o bipartita (DNA-A y DNA-B), infectan una amplia gama de especies vegetales y se transmiten por un complejo de especies crípticas de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Brown *et al.*, 2015). Entre las especies de begomovirus asociadas a jamaica se encuentran: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Hibiscus variegation virus* (HiVV, nombre provisional) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Chatterjee y Ghosh, 2008; Muhammad *et al.*, 2017) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). Este último se reportó recientemente en el estado de Guerrero, México, asociado con el

WfaBV3 and OYMMV were detected in roselle mature plants and in the weed species *Sida collina*, *S. aggregata*, *S. acuta*, *S. haenkeana* and *Malacra fasciata*, OYMMV was detected in mature plants, in seeds and in seedlings. This is the first report of four new hosts for OYMMV and its transmission by seed.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, *Whitefly-associated begomovirus 3*, Rolling Circle Amplification.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is known to be affected by viruses in the genus Begomovirus (*Geminiviridae*), which possess a circular monopartite (DNA-A) or a bipartite DNA genome (DNA-A and DNA-B), infect a wide range of plant species and are transmitted by a complex of cryptic species of whiteflies (*Bemisia tabaci*) (Brown *et al.*, 2015). Among the begomovirus species that have been reported in association with roselle are: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Hibiscus variegation virus* (HiVV, provisional name) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Chatterjee and Ghosh, 2008; Muhammad *et al.*, 2017) and *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV). The latter was recently reported in the state of Guerrero, Mexico in association with yellowing of roselle at incidences of up to 90 to 100 % (Velázquez *et al.*, 2016). This virus was also detected in *Abutilon permolle*, *Corchorus siliquosus* and *Sida acuta* in Yucatán, Mexico (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). In addition to infecting cultivated plants, begomoviruses can also infect weeds. Weeds are a potential reservoir of economically important viruses and different host weeds are crucial in the epidemiology of begomoviruses (Prajapat *et al.*, 2014); additionally, several of them can transmit

amarillamiento de la jamaica con incidencias del 90 al 100% (Velázquez *et al.*, 2016). Este virus también fue detectado en *Abutilon permolle*, *Corchorus siliquosus* y *Sida acuta* en Yucatán, México (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). Además de infectar especies cultivadas, los begomovirus también pueden infectar malezas. Las malezas son un reservorio potencial de virus económicamente importantes y varias de ellas son cruciales en la epidemiología de los begomovirus (Prajapat *et al.*, 2014); además, varias pueden transmitir virus por semilla (Dikova, 2005; Sharman *et al.*, 2009). *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV, un virus de DNA) en camote dulce (*Ipomoea batatas*) (Kim *et al.*, 2015), *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV, un virus de DNA) en *Vigna mungo* (Kothandaraman *et al.*, 2016) y el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, un virus de DNA) en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kil *et al.*, 2016) son transmitidos por semilla. En Guerrero, una alta incidencia de plantas de jamaica con amarillamiento o mosaico estuvo asociada con la infección de OYMMV (Velázquez *et al.*, 2016) y *Whitefly-associated begomovirus 3*, respectivamente, ambos con genoma bipartita. Asimismo, diferentes malezas asociadas al cultivo presentaban amarillamiento pero se desconoce si son hospedantes de estos begomovirus o si se transmiten por semilla. Por lo anterior, el propósito de este estudio fue determinar si los begomovirus detectados en plantas de jamaica también se encuentran en las malezas asociadas al cultivo y si se transmiten por semilla. En agosto y noviembre de 2016 se recolectaron plantas de tres cultivares de jamaica con síntomas de amarillamiento o mosaico de un cultivo comercial en Guerrero, México. También se recolectaron malezas que se encontraban en el interior o en la periferia del cultivo que mostraban amarillamiento y distorsión foliar. Como testigo también se colectaron plantas asintomáticas de jamaica y malezas; estas últimas

viruses by seed (Dikova, 2005; Sharman *et al.*, 2009). *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV, a DNA virus) in sweet potato (*Ipomoea batatas*) (Kim *et al.*, 2015), *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV, a DNA virus) in *Vigna mungo* (Kothandaraman *et al.*, 2016) and of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, a DNA virus) in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Kil *et al.*, 2016) are transmitted by seed. In Guerrero, a high incidence of roselle plants showing yellowing or mosaic were infected with OYMMV (Velázquez *et al.*, 2016) and *Whitefly-associated begomovirus 3*, respectively, both with bipartite genome. Additionally, different weeds associated to the crop show yellowing but it is unknown if they are hosts of these begomoviruses or if they are transmitted by seed. The purpose of this study was to determine if begomoviruses detected in roselle plants are also found in weeds associated to the crop and if they are transmitted by seed. During August and November of 2016, roselle plants of three cultivars with yellowing or mosaic symptoms were collected from a commercial field in Guerrero, Mexico. Weeds showing yellowing and foliar distortion were also collected from inside and on the periphery of the field. Asymptomatic plants of both roselle and the weeds were collected as controls, and weeds were identified at the species level. Total nucleic acids were extracted from young roselle and weed leaves with Concert™ Plant RNA Reagent (Cat. 12322-012, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Universal primers for begomoviruses Av494 (5'-GCCYATR TAYAGRAAGCCMAG-3') and Ac1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHG TACATG-3') were used to amplify a 550 bp fragment of the protein coat (CP) gene (Wyatt and Brown 1996). The reaction mixture consisted of 2 µL of reaction buffer (5X Green GoTaq®), 0.6 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL of dNTPs (10 mM), 0.55 µL (10 µM) of each begomovirus primer,

se identificaron a especie. Se extrajeron ácidos nucleicos totales de hojas jóvenes de jamaica y malezas con el reactivo Concert™ Plant RNA Reagent (Cat. 12322-012, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los iniciadores universales para begomovirus Av494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') y Ac1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3') para amplificar un fragmento de 550 pb de la cubierta proteica (CP) (Wyatt y Brown 1996). La mezcla de reacción consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.55 µL (10 µM) de cada iniciador, 0.05 µL (10 µM) de cada iniciador del gen 18s rRNA utilizado como indicador de la efectividad de la PCR que amplifican un fragmento de 844pb (Gambino y Gribaudo 2006), 4.9 µL de agua ultra pura, 0.1 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) y 1 µL de ácidos nucleicos totales (20 ng / µL) en un volumen final de 10 µL. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C/4 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/1 min y una extensión final de 72 °C/10 min. Los productos obtenidos de PCR se secuenciaron (Macrogen Inc., Corea), las secuencias fueron editadas con el programa DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>) y se compararon con las de la base de datos del GenBank®. Las muestras de jamaica y malezas positivas a begomovirus por PCR se sometieron a un segundo análisis con iniciadores específicos para WfaBV3 y OYMMV utilizando la secuencia de la CP de cada virus (KT099127.1 y HM035059.1). Con el programa Primer-blast tool del NCBI se diseñaron los iniciadores específicos VEM-3-F 5'-AGTCCTACGAGCAACGTCAC-3'/ VEM-3-R 5'-TCTCGTACTTCGCAGCTTCC-3' y OYMMV-F 5'-AAAGGTGAGCCGCAATGC TA-3'/ OYMMV-R 5'- GTCGCGTAGGTCGTTCT TCA-3', que amplifican un fragmento de 438 y

0.05 µL (10 µM) of each 18s rRNA gene primer that amplify an 844bp fragment as an indicator of PCR effectiveness (Gambino and Gribaudo 2006), 4.9 µL ultra-pure water, 0.1 µL GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) and 1 µL DNA (20 ng / µL) in a final volume of 10 µL. PCR was done with the following conditions: initial denaturation at 95 °C/4 min, followed by 30 cycles at 95 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/1 min and a final extension of 72 °C/10 min. The PCR products obtained were sequenced (Macrogen Inc., Korea), the sequences were edited with DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>) and they were compared with those from the GenBank® database. The samples of roselle and weeds positive to begomovirus by PCR were subjected to a second analysis with specific primers for WfaBV3 and OYMMV by using the sequence of the CP of each virus (KT099127.1 and HM035059.1). Specific primers were designed with the NCBI primer-blast tool: VEM-3-F 5'-AGTCCTACGAGCAACGTCAC-3'/ VEM-3-R 5'-TCTCGTACTTCGCAGCTTCC-3' and OYMMV-F 5'-AAAGGTGAGCCGCAA TGCTA-3'/ OYMMV-R 5'- GTCGCGTAGG TCGTTCTTCA-3', which amplified a product size of 438 and 463 bp, respectively. The reaction mixture consisted of 2 µL reaction buffer (5X Green GoTaq®), 0.6 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL of dNTPs (10 mM), 0.6 µL (10 µM) of each primer, 4.9 µL of ultra-pure water, 0.1 µL of GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) and 1 µL of DNA (20 ng/µL) in a final volumen of 10 µL. PCR was performed as follows: initial denaturation at 95 °C/5 min, 40 cycles at 95 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C /30 s and a final extension cycle of 72 °C/5 min for both viruses. Three samples of roselle positive to OYMMV and three positive to WfaBV3, as well as five weeds positive to OYMMV were sequenced (Macrogen Inc., Korea). To corroborate the specificity of the viruses, tomato plants infected

463 pb, respectivamente. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.6 µL (10 µM) de cada iniciador, 4.9 µL de agua ultra pura, 0.1 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) y 1 µL de DNA (20 ng/µL) en un volumen final de 10 µL. El programa de PCR para ambos virus fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C/5 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C/30 s y un ciclo de extensión final de 72 °C/5 min. Tres muestras de jamaica positivas al OYMMV y tres positivas al WfaBV3, así como cinco malezas positivas al OYMMV fueron secuenciadas (Macrogen Inc., Corea). Para corroborar la especificidad de los iniciadores diseñados, plantas de tomate infectadas con el *Tomato severe leaf curl virus* y plantas de chile infectadas con el *Pepper golden mosaic virus* o *Pepper huasteco yellow vein virus* respectivamente, se analizaron mediante PCR con VEM-3-F/VEM-3-R y OYMMV-F/OYMMV-R. Se recolectaron y analizaron semillas de cada uno de los tres cultivares de jamaica y de cinco especies de malezas positivas a begomovirus de la siguiente manera: a) Se extrajeron ácidos nucleicos totales de 10 muestras de semillas de cada cultivar de jamaica (10 semillas por muestra) y cuatro muestras de semillas de cada maleza (10 semillas por muestra) y se analizaron por PCR con los iniciadores universales para begomovirus como se describió anteriormente. Asimismo, la semilla de maleza se analizó por PCR con iniciadores específicos para OYMMV. b) Se sembraron 100 semillas de cada cultivar de jamaica y 40 semillas de cada una de las cinco malezas en charolas que contenían suelo estéril. Para evitar la contaminación de algún virus presente en la testa, las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% y se enjuagaron con agua destilada (Kim *et al.*, 2015). Las charolas se mantuvieron

with *Tomato severe leaf curl virus* and pepper plants infected with either *Pepper golden mosaic virus* or *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectively, were analyzed by PCR with both VEM-3-F/VEM-3-R and OYMMV-F/OYMMV-R. Seeds from each of three roselle cultivars and from five weed species tested positive to begomoviruses were collected and analyzed as follows: a) Total nucleic acids were extracted from 10 seed samples of each roselle cultivar (10 seeds per sample) and four seed samples of each weed (10 seeds per sample too) and analyzed by PCR with universal primers for begomoviruses as previously described. In addition, the weed seed was analyzed with specific primers for OYMMV. b) One hundred seeds from each roselle cultivar and 40 seeds from each of the five weeds were planted in trays containing sterile soil. To avoid contamination by a virus present on the seed coat, seeds were surfaced sterilized with 10% sodium hypochlorite and rinsed with distilled water (Kim *et al.*, 2015). The trays were kept at 27° C and a 16 h photoperiod (Albrechtsen 2006). As controls, 200 seeds of each roselle cultivar were sown from roselle plants that were negative to begomoviruses. Three months after seeding, young leaves were harvested and total nucleic acids were extracted from ten of seedlings of each roselle cultivar. In the case of the weeds, young leaves of ten seedlings of each of the five species were randomly selected at 40 days after seeding. Roselle and weed seedlings were analyzed by PCR with universal primers for begomoviruses as described previously. Additionally, young leaves of weeds seedlings were analyzed with specific primers to OYMMV. Extraction of total nucleic acids from seeds and seedlings was performed according to Dellaporta *et al.* (1983), with some modifications. The products were sequenced, edited and compared with those at the GenBank® database as previously described. Total nucleic acids from young leaves

a 27 °C con un fotoperiodo de 16 h (Albrechtsen 2006). Como testigo, se sembraron 200 semillas de cada cultivar de jamaica colectadas de plantas sanas. Tres meses después de la siembra, se recolectaron hojas jóvenes de 10 plántulas de cada cultivar de jamaica y se extrajeron ácidos nucleicos totales. En el caso de las malezas, se colectaron hojas jóvenes de diez plántulas seleccionadas al azar de cada una de las cinco especies 40 días después de la siembra. Las plántulas de jamaica y de malezas se analizaron mediante PCR con iniciadores universales para begomovirus como se describió anteriormente. Además, las hojas jóvenes de plántulas de malezas se analizaron con iniciadores específicos para OYMMV. La extracción de ácidos nucleicos totales de semillas y plántulas se realizó de acuerdo con Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Los productos se secuenciaron, editaron y compararon con los de la base de datos del GenBank® de la manera antes indicada. Los ácidos nucleicos totales de las hojas jóvenes de las plántulas de jamaica se sometieron a amplificación por círculo rodante con el kit TempliPhi 100 Amplification® (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante con el fin de enriquecer el DNA circular que pudiera estar presente y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

En total se recolectaron 34 plantas de jamaica con amarillamiento o mosaico y 10 asintomáticas así como seis malezas con amarillamiento y distorsión foliar (Figura 1) y seis sin síntomas. Todas las plantas de jamaica con síntomas amplificaron el fragmento esperado (550 pb) para begomovirus y 26 de ellas tuvieron una similitud de 97-98% con el *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) (números de acceso MF632074, MF632075, MF632076 y MF632077). Estas 26 plantas de jamaica con síntomas se analizaron también por PCR con los iniciadores VEM-3-F/VEM-3-R y

of roselle seedlings were subjected to RCA with the TempliPhi 100 Amplification® kit (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions with the purpose of enriching the circular DNA that could be present and verified by 0.8% agarose gel electrophoresis.

A total of 34 roselle plants with yellowing or mosaic and 10 with no symptoms were collected. Additionally, six weeds with yellowing and foliar distortion (Figure 1) and six with no symptoms were collected. All symptomatic roselle plants amplified the expected fragment (550 bp) for begomovirus and 26 of them had a similarity of 97-98% with *Whitefly-associated begomovirus 3* (WfaBV3) (Accession number MF632074, MF632075, MF632076 and MF632077). These 26 symptomatic roselle plants were analyzed by PCR with VEM-3-F/VEM-3-R primers and all amplified the expected product of 438 bp. Sequence of the latter (Accession number MH090700) had a similarity of 98% with *Whitefly-associated begomovirus 3*. Rosario *et al.* (2015) reported this begomovirus in *Bemisia tabaci* and it was named VEM-begomovirus 3 because it had not previously been detected in plant species, however, the name of this species at the present time accepted by the ICTV is *Whitefly-associated begomovirus 3*. The remaining eight plants showed a 93-94% similarity with OYMMV (Accession number MF315084, MF315085, MF315086 and MF315087). These eight symptomatic roselle plants were analyzed by PCR with OYMMV-F/OYMMV-R primers and all amplified the expected product of 463 bp. Sequence of the latter (Accession number MH090684) had a similarity of 92% with OYMMV, a virus previously reported by Velázquez *et al.* (2016) in roselle cultivars in the same area. In the case of begomoviruses it has been established that a sequence with a similarity $\geq 91\%$ with the whole genome or part of the DNA-A component, it means that it is the same species,

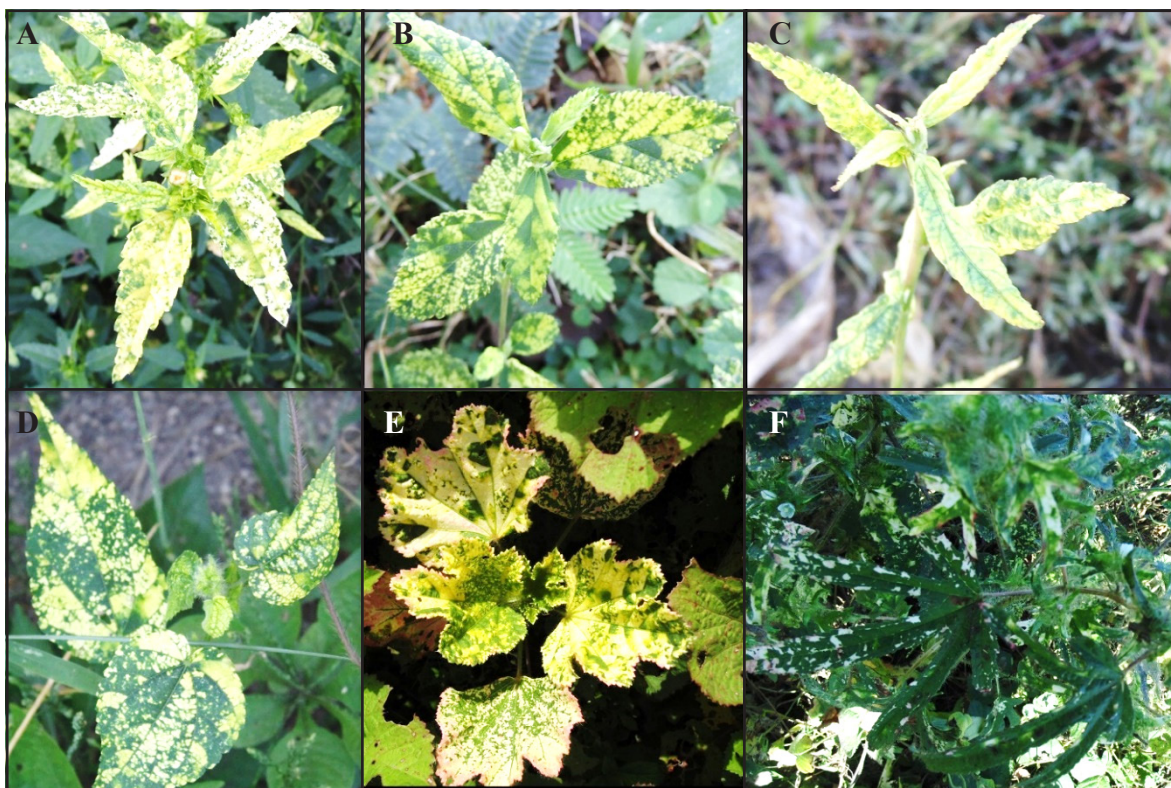


Figura 1. Síntomas de malezas asociadas al cultivo de jamaica. A) *Sida acuta*, B) *S. haenkeana*, C) *S. collina*, D) *S. aggregata*, E, F) *Malachra fasciata*.
Figure 1. Symptoms in weeds associated to a roselle crop. A) *Sida acuta*, B) *S. haenkeana*, C) *S. collina*, D) *S. aggregata*, E, F) *Malachra fasciata*.

todas amplificaron el producto esperado de 438 pb. La secuencia de este último (número de acceso MH090700) tuvo una similitud del 98% con el *Whitefly-associated begomovirus 3*. Rosario *et al.* (2015) reportaron este begomovirus en *Bemisia tabaci* y lo denominaron VEM-begomovirus 3 ya que no se había detectado previamente en plantas, sin embargo, el nombre de esta especie actualmente aceptado por el ICTV es *Whitefly-associated begomovirus 3*. Las ocho plantas restantes mostraron una similitud del 93-94% con el OYMMV (número de acceso MF315084, MF315085, MF315086 y MF315087). Estas ocho plantas de jamaica se analizaron mediante PCR con los iniciadores OYMMV-F / OYMMV-R

whereas if it has a similarity <91% then it should be considered a new species (Brown *et al.*, 2015). The CP gene is the most highly conserved gene in the family *Geminiviridae* (Wyatt and Brown 1996). This gene sequence, which effectively predicts discrete strains, species, and taxonomic lineages of begomoviruses, has been accepted by the ICTV as a desirable marker for virus identity when a full-length genomic sequence is not available (Brown *et al.*, 2001). There was no amplification with primers VEM-3-F/VEM-3R and OYMMV-F/OYMMV-R in the tomato sample infected with *Tomato severe leaf curl virus* nor in the pepper plants infected with *Pepper golden mosaic virus* and *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectively. Roselle

y todas amplificaron el producto esperado de 463 pb. La secuencia de este último (número de acceso MH090684) tuvo una similitud de 92% con OYMMV, un virus reportado previamente por Velázquez *et al.* (2016) en el cultivo de jamaica en la misma zona de estudio. En el caso de los begomovirus, se ha establecido que la secuencia de una especie con una similitud $\geq 91\%$ con todo el genoma o parte del componente DNA-A, significa que se trata de la especie en cuestión, mientras que si se tiene una similitud $< 91\%$, entonces debe considerarse una especie nueva (Brown *et al.*, 2015). El gen de la CP es el mejor conservado de la familia *Geminiviridae* (Wyatt y Brown 1996) y permite discriminar efectivamente variantes, especies y otras categorías taxonómicas de begomovirus, por lo que ha sido aceptada por el ICTV como una referencia confiable para identificar un virus cuando no se dispone de la secuencia completa de su genoma (Brown *et al.*, 2001). No hubo amplificación con los iniciadores VEM-3-F/VEM-3R y OYMMV-F/OYMMV-R en plantas de tomate infectadas con el *Tomato severe leaf curl virus* ni en plantas de chile infectadas con el *Pepper golden mosaic virus* y *Pepper huasteco yellow vein virus*, respectivamente. Las plantas de jamaica positivas a OYMMV inicialmente mostraron clorosis en la nervadura y luego un mosaico amarillo que cubrió toda la hoja. En el caso de las plantas de jamaica positivas a WfaBV3, siempre se observó un mosaico que se hizo más evidente con el tiempo. Se identificaron seis especies de malezas asociadas a jamaica pertenecientes a dos familias, siendo la familia *Malvaceae* la que tuvo el mayor número de especies: *Sida aggregata* K., *S. collina* S., *S. haenkeana* (C.) Presl., *S. acuta* Burm. f., *Malachra fasciata* Jacq. y *Euphorbia heterophylla* L. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios en los que se han encontrado diferentes begomovirus asociados con malezas que pertenecen

plants positive to OYMMV initially showed venial chlorosis and then a yellow mosaic that covered the entire leaf surface. In the case of the roselle plants positive for WfaBV3, a mosaic was always observed and it became more evident over time. Six weed species belonging to two families associated with roselle were identified, with the *Malvaceae* family having the highest number of species: *Sida aggregata* K., *S. collina* S., *S. haenkeana* (C.) Presl., *S. acuta* Burm. f., *Malachra fasciata* Jacq. and *Euphorbia heterophylla* L. These results are similar to those reported in other studies in which different begomoviruses associated with weeds belonging to the *Malvaceae* family have been found (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2016). The expected fragment for begomoviruses (550 bp) was amplified from all symptomatic weed samples, as well as that of the 18s rRNA gene (844 bp) used as the internal control; the latter is essential for the detection of false negatives, DNA degradation or presence of inhibitors in the PCR (Gambino and Gribaudo 2006). In *Sida aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana*, *S. acuta* and *Malachra fasciata* expected PCR product of 463 bp obtained with primers OYMMV-3-F/OYMMV-3-R was observed (Data not shown) and their sequences were 93 to 95 % similar for OYMMV. In *Euphorbia heterophylla* the begomovirus *Euphorbia mosaic virus* was detected. From the positive weeds to OYMMV, only *Sida acuta* had previously been reported as a host of this virus (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007), while, *S. aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana* and *Malachra fasciata* are reported for the first time as hosts. Most of the weeds have a high adaptability to the environment and several of them, have been reported as hosts of a large number of begomoviruses and they are considered an important factor in epidemiological studies (Prajapat *et al.*, 2014). In addition, to know the range of alternative virus hosts is essential for

a la familia *Malvaceae* (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2016). El fragmento esperado para begomovirus (550 pb) se obtuvo en todas las muestras de malezas con síntomas, así como el del fragmento del gen 18s rRNA (844 pb) utilizado como control interno; este último es esencial para la detección de falsos negativos, degradación del DNA o presencia de inhibidores de la PCR. (Gambino y Gribaudo 2006). En *Sida aggregata*, *S. collina*, *S. haenkeana*, *S. acuta* y *Malachra fasciata* se obtuvo el producto esperado de PCR de 463 pb con los iniciadores OYMMV-3-F / OYMMV-3-R (datos no mostrados) y sus secuencias tuvieron de 93 a 95% de similitud con el OYMMV. En *Euphorbia heterophylla* se detectó al begomovirus *Euphorbia mosaic virus*. De las malezas positivas al OYMMV, solo *Sida acuta* se había reportado previamente como hospedante de este virus (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007), mientras que *S. aggregata*, *S. collina*, *S. hankeana* y *Malacra fasciata* se reportan por primera vez como hospedantes. La mayoría de las malezas tienen una alta adaptabilidad al ambiente y varias de ellas se han reportado como hospedantes de un gran número de begomovirus por lo que se consideran un factor importante en estudios epidemiológicos (Prajapat *et al.*, 2014). Además, conocer la gama de hospedantes alternos de virus es esencial para diseñar estrategias efectivas de manejo (Kai-Shu *et al.*, 2011). La transmisión del OYMMV por semilla de malezas favorece su permanencia en campo y las plántulas que se originan de ellas son un reservorio potencial para colonias de moscas blancas virulíferas en las primeras etapas del cultivo. Ninguna de las especies de malezas analizadas en el presente estudio fue positiva a WfaBV3 a pesar de que este virus se detectó en plantas de jamaica con mosaico. Es posible que WfaBV3 esté limitado al género *Hibiscus*, como en el caso de SPLCV que se encontró únicamente en plantas del género

designing effective virus management strategies (Kai-Shu *et al.*, 2011). Transmission of OYMMV by seed of weeds favoring its continuous permanence in the field and seedlings originated from them are a potential reservoir for viruliferous whitefly colonies in the early stages of the crop. None of the weed species analyzed in the present study was positive to WfaBV3 though this virus was detected in roselle plants with mosaic. It is possible that WfaBV3 might be limited to the *Hibiscus* genus, like in the case of SPLCV, which was found only in plants of the *Ipomoea* genus from a total of 111 species belonging to 30 families (Kai-Shu *et al.*, 2011). WfaBV3 and OYMMV were not detected by PCR in the different roselle cultivars in both seeds and seedlings and only amplification of the 18s rRNA gene was obtained, so false negatives or the presence of PCR inhibitors were excluded. No amplification was obtained by RCA, which supports the previous results of non-transmission of these begomoviruses by roselle seed. These results differ from those obtained for the begomoviruses *Sweet potato leaf curl virus* and *Mung bean yellow mosaic virus* that were detected in asymptomatic seedlings by PCR; however, in the field such seedlings may be permissive and act as a source of inoculum for the infection of healthy seedlings (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). OYMMV was detected in seed of *Sida aggregata* (Accession MF632078, MH090690), *S. collina* (Accession MF632079, MH090691), *S. haenkeana* (Accession MF632080, MH090692), *Sida acuta* (Accession MF632081, MH090693) and *Malachra fasciata* (Accession MF632082, MH090694) with both universal primers for begomoviruses and specific primers for OYMMV. OYMMV was detected by PCR with OYMMV-3-F/OYMMV-3-R primers in seedlings of the five weed species in different relative rate (positive seedlings/analyzed seedlings; Accession number): *Sida aggregata*

Ipomoea de un total de 111 especies pertenecientes a 30 familias (Kai-Shu *et al.*, 2011). WfaBV3 y OYMMV no se detectaron por PCR en semilla y plántulas de los diferentes cultivares de jamaica y sólo se obtuvo la amplificación del segmento del gen 18s rRNA, por lo que se descarta la posibilidad de falsos negativos o la presencia de inhibidores de PCR. No se obtuvo ninguna amplificación a partir de ACR, lo que respalda los resultados anteriores de la no transmisión de estos begomovirus por semilla de jamaica. Estos resultados difieren de los obtenidos para los begomovirus *Sweet potato leaf curl virus* y *Mung bean yellow mosaic virus* que se detectaron por PCR en plántulas asintomáticas; sin embargo, en campo, éstas pueden ser permisivas y actuar como una fuente de inóculo para la infección de plántulas sanas (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). El OYMMV fue detectado en semilla de *Sida aggregata* (número de acceso MF632078, MH090690), *S. collina* (número de acceso MF632079, MH090691), *S. haenkeana* (número de acceso MF632080, MH090692), *Sida acuta* (número de acceso MF632081, MH090693) y *Malachra fasciata* (número de acceso MF632082, MH090694) con iniciadores universales para begomovirus y específicos para OYMMV. El OYMMV se detectó por PCR con los iniciadores OYMMV-3-F/OYMMV-3-R en plántulas de las cinco especies de malezas en diferentes tasas relativas (plántulas positivas/plántulas analizadas; número de acceso): *Sida aggregata* (3/10; MH090695) *S. collina* (2/10; MH090696), *S. haenkeana* (1/10; MH090697), *Sida acuta* (5/10; MH090698) y *Malachra fasciata* (1/10; MH090699) y no se observaron síntomas en ellas. De manera similar, las plántulas asintomáticas de *Ipomoea batatas* y *Vigna mungo* fueron positivas para *Sweet potato leaf curl virus* y *Mung bean yellow mosaic virus*, respectivamente (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). La detección de OYMMV en semillas y plántulas de

(3/10; MH090695), *S. collina* (2/10; MH090696), *S. haenkeana* (1/10; MH090697), *Sida acuta* (5/10; MH090698) and *Malachra fasciata* (1/10; MH090699) and no symptoms were observed in them. Similarly, asymptomatic seedlings of *Ipomoea batatas* and *Vigna mungo* were positive for *Sweet potato leaf curl virus* and *Mung bean yellow mosaic virus*, respectively (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2016). Detection of OYMMV in seed and seedlings of five weed species suggests that this virus is inside the seed and it can be transmitted from one generation to another through the embryo (Kim *et al.*, 2015). It is known that many viruses that are transmitted by seed do so only in certain plant species and not others, such as the TYLCV that is transmitted by seed of *Solanum lycopersicum* (Kil *et al.*, 2016) but not of *Nicotiana benthamiana* (Rosas-Diaz *et al.*, 2017). The latter could explain the detection of OYMMV in weed seeds but not in roselle WfaBV3 was detected in roselle plants exhibiting mosaics, whereas OYMMV was associated to plants showing yellow mosaics. Five species of *Malvaceae* considered as weeds were identified to harbor OYMMV and it was transmitted by seed in all them. WfaBV3 was not detected in weeds and there was no transmission of this virus or OYMMV to roselle seeds nor seedlings. To our knowledge, this is the first report of four new weed hosts of OYMMV and its transmission by seed.

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

cinco especies de malezas sugiere que este virus está dentro de la semilla y puede transmitirse de una generación a otra a través del embrión (Kim *et al.*, 2015). Se sabe que muchos virus transmitidos por semilla lo hacen solo en ciertas especies de plantas y no en otras, como el TYLCV que se transmite por

semilla de *Solanum lycopersicum* (Kil *et al.*, 2016) pero no de *Nicotiana benthamiana* (Rosas- Díaz *et al.*, 2017). Lo anterior podría explicar la detección de OYMMV en semillas de malezas pero no en semillas de jamaica.

WfaBV3 se detectó en plantas de jamaica con mosaico, mientras que OYMMV se asoció con plantas que mostraban mosaicos amarillos. Se identificaron cinco especies de *Malvaceae* consideradas como malezas infectadas por OYMMV y éste se transmitió por semilla en todas ellas. WfaBV3 no se detectó en malezas y no hubo transmisión de este virus ni del OYMMV en semilla ni plántulas de jamaica. Este es el primer reporte de cuatro nuevas malezas hospedantes de OYMMV y de su transmisión por semilla.

## LITERATURA CITADA

- Albrechtsen SE. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. London, UK. CAB International. DOI:10.1079/9780851990163.0000.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JCF, Fiallo-Olivé E, Briddon RW, Hernández-Zepeda C, Idris A, Malathi VG, Martin DP, Rivera-Bustamante R, Ueda S and Varsani A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160 (6):1593-1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>.
- Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks GK and Wyatt SD. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* 146:1581-98. <https://doi.org/10.1007/s007050170080>.
- Chatterjee A and Ghosh SK. 2008. Alterations in biochemical components in mesta plants infected with yellow vein mosaic disease. *Brazilian journal of plant physiology* 20(4):267-275. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202008000400002>.
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21. <https://doi.org/10.1007/BF027126>
- Dikova B. 2005. Tobacco rattle virus (TRV) transmission by sugar beet seeds. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 19(2):87-90. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817196>.
- Dikova B. 2005. Tobacco rattle virus (TRV) transmission by sugar beet seeds. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 19(2):87-90. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817196>.
- Gambino G and Gribaudo I. 2006. Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology* 96(11):1223-1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35(3):825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Kai-Shu L, Harrison HF, Simmons AM, Zhang SC and Jackson DM. 2011. Experimental host range and natural reservoir of *Sweet potato leaf curl virus* in the United States. *Crop Protection* 30:1055-1062. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.009>.
- Kil E.-J, Kim S, Lee Y.-J, Byun H.-S, Park J, Seo H, Kim C.-S, Shim J.-K, Lee J.-H, Kim, J.-K, Lee K.-Y, Choi H.-S and Lee S. 2016. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports* 6:19013. <http://dx.doi.org/10.1038/srep19013>.
- Kim J, Kil E.-J, Kim S, Seo H, Byun H.-S, Park J, Chung M.-N, Kwak H.-R, Kim M.-K, Kim C.-S, Yang J.-W, Lee K.-Y, Choi H.-S and Lee S. 2015. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathology* 64:1284-1291. <https://doi.org/10.1111/ppa.12366>.
- Kothandaraman SV, Devadason A. and Ganesan MV 2016. Seed-borne nature of a begomovirus, *Mung bean yellow mosaic virus* in black gram. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1925–1933. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7188-7>.
- Muhammad A, Wenzhong L, Lihuang L, Waqar I, Zhang J, Zifu H, Zhenguo D and Zujian W. 2017. *Cotton leaf curl Multan virus* infecting *Hibiscus sabdariffa* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40 (1):128-131, DOI: 10.1080/07060661.2017.1389770.
- Nascimento LD, Silva SJC, Sobrinho RR, Ferro MMM, Oliveira MHC, Zerbini FM, Assunção IP and Lima GSA. 2016. Complete nucleotide sequence of a new begomovirus infecting a malvaceous weed in Brazil. *Archives of Virology* 161:1735-1738. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2822-y>.
- Prajapat R, Marwal A and Gaur RK. 2014. Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal Begomovirus associated with alternative host weeds: *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47:157-170. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.805497>.
- Rosario K, Seah Y, Marr C, Varsani A, Kraberger S, Stainton D, Moriones E, Polston J, Duffy S, and Breitbart M. 2015. Vector-Enabled Metagenomic (VEM) Surveys Using Whiteflies (Aleyrodidae) Reveal Novel Begomovirus Species in the New and Old Worlds. *Viruses* 7:5553-5570. <https://doi.org/10.3390/v7102895>.
- Rosas-Díaz T, Zhang D and Lozano-Durán R. 2017. No evidence of seed transmissibility of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 18:437-440. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600463>.
- Sharman M, Persley DM and Thomas JE. 2009. Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus*

- in *Parthenium hysterophorus*. Plant Disease 93:708-712.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-93-7-0708>
- Velázquez-Fernández P, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Negrete-Fernández G y Hernández-Morales J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34:200–207. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1>.
- Wyatt SD and Brown JK. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288-1293. Disponible en línea: [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12\\_1288.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n12_1288.PDF).

# Performance of native accessions of *Carica papaya* inoculated with PRSV-p using *Aphis nerii*

## Comportamiento de accesiones nativas de *Carica papaya* inoculadas con PRSV-p mediante *Aphis nerii*

**Rodrigo Flores-Bautista, Catarino Ávila-Reséndiz<sup>†</sup>, Juan A. Villanueva-Jiménez\***, Programa de Agroecosistemas Tropicales, Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados, Km 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Manlio F. Altamirano, Veracruz, CP 91690, México; **Cristian Nava-Díaz**, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; **Enrique Noé Becerra Leor**, Campo Experimental Cotaxtla, CIRGOC, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 34 Carretera Federal Veracruz-Córdoba, Municipio Medellín, Veracruz, C.P. 94274, México. \*Autor para correspondencia: javj@colpos.mx.

**Recibido:** 23 de Agosto 2018.

**Aceptado:** 14 de Diciembre, 2018.

Flores-Bautista R, Ávila-Reséndiz C, Villanueva-Jiménez JA, Nava-Díaz C and Becerra-Leor EN. 2018. Performance of native accessions of *Carica papaya* inoculated with PRSV-p using *Aphis nerii*. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 147-158.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1808-5

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

**Resumen.** Es posible que exista tolerancia al virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p) en plantas nativas de *Carica papaya*. Se evaluó la respuesta de 13 accesiones (Acc) de papayo nativo y la variedad Maradol roja respecto a la incidencia y severidad del PRSV-p, inoculado con el insecto vector *Aphis nerii*, y su relación con el manejo de la planta observado durante su colecta. Las Acc se colectaron en estado silvestre, en traspatio o cultivadas. A los tres meses de edad se inocularon las

**Abstract.** Tolerance to the papaya ring spot virus (PRSV-p) may exist in native *Carica papaya* plants. The response of 13 native papaya accessions (Acc) and the commercial variety Red Maradol to the incidence and severity of the PRSV-p, inoculated with the vector insect *Aphis nerii*, and their relation with the observed plant management during their collection were evaluated. Acc were collected in the wild, in backyards or in production fields. Three months old-plants were infected with the virus. Disease incidence and severity were measured nine times weekly. Acc 203 and 205 showed the lowest disease severity index (1.0), followed by 147a and 60 (both with 1.7), 94a (2.0) and 197a (2.2); Acc 64a (2.5) and 150 (2.8) reached intermediate severity, followed by 65 and 210b (with 3.3), and by 80, 169 and 188a (with 4.3). Red Maradol variety showed the highest severity index (4.8). In relation to the management in which plants were collected, mean severity in Acc coming from the wild was significantly lower ( $P=0.032$ ) than in Red Maradol,

plantas con el virus. Se evaluó semanalmente la incidencia y severidad en nueve ocasiones. Las Acc 203 y 205 mostraron el menor índice de severidad (1.0), seguidas de 147a y 60 (con 1.7), 94a (2.0) y 197a (2.2); las Acc 64a (2.5) y 150 (2.8) alcanzaron una severidad intermedia, seguidas de la 65 y 210b (con 3.3), y de 80, 169 y 188a (con 4.3). La var. Maradol roja presentó el mayor índice de severidad (4.8). La severidad promedio en las Acc colectadas en manejo silvestre fue significativamente menor ( $P = 0.032$ ) que en Maradol roja, aunque no fue diferente en las Acc que provenían de manejo de plantaciones cultivadas o de traspatio. Es posible que entre las Acc silvestres se encuentren genes de tolerancia al PRSV-p.

**Palabras clave:** incidencia, severidad, tolerancia, áfidos.

El papayo (*Carica papaya* L.) es un frutal originario de Centroamérica y del Sur de México, aunque su área de domesticación no se ha definido completamente (Fuentes y Santamaría, 2014). La introducción de la variedad (var) Maradol en México desplazó y puso en riesgo de extinción a los genotipos nativos que carecen de propiedades adecuadas para el mercado, pero que presentan diversidad de caracteres, entre los que se encuentran el cera, mamey y coco, comercializados en mercados locales (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015); en estado silvestre se puede colectar al papayo de monte o pajarito (Romero, 2013). El germoplasma de papayo nativo no se ha evaluado a profundidad, especialmente la susceptibilidad al virus de la mancha anular (PRSV-p), Potyvirus que reduce entre 5 y 100% el rendimiento, impide el crecimiento de la planta y afecta drásticamente el tamaño y calidad del fruto. Este virus es transmitido de manera no

although they were not different from Acc coming from cultivated orchards or from backyards. It is possible that PRSV-p tolerance genes might be found in wild Acc.

**Key words:** incidence, severity, tolerance, aphids.

Papaya (*Carica papaya* L.) is originally from Central America and southern Mexico, although its area of domestication has not been entirely defined (Fuentes and Santamaría, 2014). Introduction of Maradol variety (var) in Mexico displaced and put at risk of extinction those native genotypes that lack adequate properties for the market, but displaying character diversity, including “cera”, “mamey” and “coco”, sold in local markets (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015); in the wild is still possible to find “papaya de monte” or “pajarito” (Romero, 2013). Native papaya germplasm has not been evaluated in depth, especially their susceptibility to the papaya ring spot virus (PRSV-p), Potyvirus that reduces yield between 5 and 100%, hinders plant growth and drastically affects fruit size and quality. This virus is transmitted in a non-persistent manner by aphids (Hemiptera: Aphididae), being *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* and *A. nerii* some of the most important (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015; Hernández-Castro *et al.*, 2015). The Papaya Network of the National System for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (SINAREFI, 2017) rescues native Mexican germplasm in which material tolerant to PRSV-p may exist. Therefore, the objective posed was to evaluate the response of 13 accessions (Acc) of native papaya trees and the red Maradol var regarding the incidence and severity of the PRSV-p, inoculated with the vector insect *A. nerii*, and its relation to plant management during its collection.



persistente por áfidos (Hemiptera: Aphididae), entre los que resaltan *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* y *A. nerii*. (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015; Hernández-Castro *et al.*, 2015). La Red Papaya del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI (2017) rescata el germoplasma nativo de México, en el que pudiera existir material tolerante al PRSV-p. Por tanto, se planteó como objetivo evaluar la respuesta de 13 accesiones (Acc) de papayo nativo y la var Maradol roja respecto a la incidencia y severidad del PRSV-p, inoculado con el insecto vector *A. nerii*, y su relación con el manejo de la planta durante su colecta.

**Material utilizado.** Las Acc originales las colectó el Dr. Catarino Ávila Reséndiz (†), ex coordinador de la Red Papaya del SINAREFI (2017). El Centro de Conservación de Semillas Ortodoxas Sur Sureste de la Red proveyó un número limitado de semillas de estas colectas. Por ser recalcitrantes, estas semillas presentan problemas de germinación después de periodos prolongados de conservación. Se obtuvo un bajo número de individuos por accesión, por lo que se utilizaron las Acc que produjeron al menos tres plantas. El Cuadro 1 presenta las características de cada accesión y el tipo de manejo en que fueron colectadas. Además, se utilizó la var Maradol roja de Semillas del Caribe®, por ser la más cultivada en México. La semilla se remojó por 48 h con cambios de agua cada 8 h, y en ácido giberélico 0.1% por 12 h; se colocaron sobre una franela húmeda estéril (15 x 20 cm) doblada, a 35 °C y 80 % de humedad relativa. Las que germinaron, se sembraron en charolas con mezcla (1:1) de Peat Moss® y suelo rico en materia orgánica. Las plántulas se mantuvieron en malla sombra (75%), se regaron y trasplantaron a macetas (20 x 15 cm); al desarrollar entre 8 y 10 hojas verdaderas se pasaron al invernadero del Campus Veracruz, Colegio

**Material used.** The original Acc were collected by Dr. Catarino Ávila Reséndiz (†), ex coordinator of the Papaya Network of SINAREFI (2017). Network's South Southeast Orthodox Seed Conservation Center provided a limited number of seeds from these collections. Being recalcitrant, these seeds face germination problems after extended periods of conservation. We obtained a low number of individuals per accession, and therefore used the Acc that produced at least three plants. Table 1 presents the characteristics of each accession and the type of management in which they were collected. In addition, the var Red Maradol by Semillas del Caribe® was used, since it is the most widely grown in Mexico. Seeds were soaked for 48 h, replacing water every 8 h, and in gibberellic acid 0.1% for 12 h; they were placed on a folded sterilized moist cloth (15 x 20 cm) at 35 °C and 80 % relative humidity. Those that germinated were grown in trays with a mixture (1:1) of Peat Moss® and soil rich in organic matter. Seedlings were kept under a shade screen (75 %), irrigated and transplanted into pots (20 x 15 cm); after growing 8 to 10 true leaves, they were taken to a greenhouse at the Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. PRSV-p was obtained from papaya leaves gathered in a commercial orchard in Jamapa, Veracruz, Mexico. The presence of the pathogen was confirmed with RT-PCR, technique for the extraction of RNA from PRSV-p, with retrotranscription to generate complementary DNA and PCR with reverse transcriptase, performed using the Zymo Research® RNA extraction kit, as indicated by the manufacturer. RT-PCR was carried out in a Multigene and Labnet® thermocycler with the Promega RT-PCR System ®: PRSV-p CP region was amplified with 3F and 11R primers described by Noa-Carranza *et al.* (2006). Aphids (*A. nerii*) from a virus-free culture were placed on leaves with PRSV-p for an acquisition period of 45

de Postgraduados. El PRSV-p se obtuvo de hojas de papayo colectadas en una huerta comercial en Jamapa, Veracruz, México. La presencia del patógeno se confirmó mediante la técnica RT-PCR para extracción del RNA del PRSV-p, con retrotranscripción para generar DNA complementario y PCR con transcriptasa reversa, el cual se realizó con el kit de extracción de RNA Zymo Research®, según indicaciones del fabricante. La RT-PCR se realizó en un termociclador Multigene y Labnet® con el producto de Promega RT-PCR System®: se amplificó la región CP del PRSV-p con primer 3F y 11R descrito por Noa-Carrazana *et al.* (2006). Se colocaron áfidos (*A. nerii*) provenientes de una colonia libres de virus en hojas con PRSV-p por un período de adquisición de 45 a 55 s (Gonsalves *et al.*, 2010; Osorio-Acosta *et al.*, 2010). Se pasaron 10 áfidos a cada una de 13 plantas sanas de papayo Maradol, se mantuvieron durante 2 h, y se eliminaron manualmente. Veinte días después se confirmó la eficiencia de la transmisión mediante RT-PCR, en muestras de hoja de cada planta. Se utilizaron diez plantas positivas al PRSV-p como fuente de inóculo.

**Ensayo de invernadero.** El ensayo se estableció con tres plantas por Acc o var, las que se inocularon tres veces con áfidos infectivos con la metodología de Osorio-Acosta *et al.* (2010). 1ª inoculación: 31/10/2017; 2ª 21/11/2017; 3ª 22/01/2018. La planta con los áfidos infectivos se confinó en una jaula entomológica de 20 a 30 min. En seguida, se retiraron los insectos.

Las plantas se mantuvieron a 24±3 °C en un invernadero con malla antiáfido durante 63 días después de la inoculación. Se realizaron evaluaciones semanales de la incidencia y severidad de síntomas del PRSV-p en hojas, tallo y peciolas (Cuadro 2).

**Incidencia.** La incidencia final evaluada por síntomas se confirmó con el kit para PRSV-p de

to 55 s (Gonsalves *et al.*, 2010; Osorio-Acosta *et al.*, 2010). Ten aphids were moved to each of 13 healthy Maradol papaya plants, kept there for 2 h, and then eliminated manually. Twenty days later, the transmission efficiency was confirmed via RT-PCR in leaves samples from each plant. Ten native plants PRSV-p positive were used as a source of inoculum.

**Greenhouse test.** It was established with three plants per Acc or var, which were inoculated three times with infective aphids with the methodology by Osorio-Acosta *et al.* (2010). 1st inoculation: 31/10/2017; 2nd 21/11/2017; 3rd 22/01/2018. A plant with infective aphids was confined 20 to 30 min in an entomological cage. Immediately afterwards, insects were removed.

Plants were kept at 24±3 °C in a greenhouse with an anti-aphid mesh for 63 days after inoculation. Weekly evaluations of PRSV-p incidence and severity of symptoms were carried out on leaves, stems and petioles (Table 2).

**Incidence.** The final incidence evaluated by symptoms was confirmed using the PRSV-p AGDIA® kit. Tissue was taken from 42 plants of the 13 Acc and the Red Maradol var; it was placed in bags and taken cold to the Virology Laboratory (Plant Health Program, Colegio de Postgraduados). Each sample was processed in a grinding mill (Dayton Electric®, Mod: 4Z522); the extract was gathered with 100 µl of the extraction buffer. Two replications were added per sample in a 96-well plate along with positive and negative controls. For the incubations, the enzyme-substrate mixture and the buffer washings were carried out following indications according to the manufacturer. Wells were read at 405 nm (Thermo Scientific®, Multiskan FC). A<sub>405</sub>≥2.0 nm value was considered positive for PRSV-p. The percentage of incidence (*I*%) of the disease was determined using the formula:

**Cuadro 1. Accesoión o variedad, ubicación geográfica, tipo de fruto y grado de manejo de la colecta de *Carica papaya*.  
Table 1. Accession or variety, geographic location, type of fruit and degree of management of *Carica papaya* collected.**

| Fecha   | Accesión/<br>Variedad | Localidad-<br>Municipio,<br>Estado                          | Latitud N<br>Longitud O (°) | Altitud<br>(m) | Tipo                | Manejo    | Peso<br>fruto (g) | Color pulpa             | °Brix | Grosor<br>pulpa (cm) |
|---------|-----------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------|-----------|-------------------|-------------------------|-------|----------------------|
| 07/2010 | 60                    | Ahuateno-<br>Chicontepec,<br>Veracruz                       | 20.97-98.17                 | 642            | Mamey               | Traspatio | 2020              | Amarilla-<br>anaranjada | 11    | 3.7                  |
| 08/2011 | 64a                   | Chilpancingo-<br>Acapulco,<br>Guerrero                      | 17.22-99.53                 | 646            | Papaya              | Traspatio | 650               | Amarilla-<br>anaranjada | 9     | 3.1                  |
| 08/2011 | 65                    | Col. San José-<br>Tierra Colorada,<br>Guerrero              | 17.16-99.53                 | 273            | Criolla<br>colorada | Traspatio | 800               | Amarilla-<br>anaranjada | 8     | 3.0                  |
| 09/2011 | 80                    | El Pericón-<br>Tecoanapa,<br>Guerrero                       | 16.98-99.32                 | 627            | Papayo              | Traspatio | 78                | Amarilla                | 13    | 2.1                  |
| 09/2011 | 94a                   | Cariedad-<br>San Marcos,<br>Guerrero                        | 16.75-99.31                 | 56             | Pico de<br>pajarito | Silvestre | 7.1               | Amarilla                | 21    | 0.6                  |
| 07/2012 | 147a                  | Col. José María<br>Pino Suarez-<br>Huimanguillo,<br>Tabasco | 17.78-93.64                 | 25             | Papayitas           | Silvestre | 8.5               | Amarilla-<br>anaranjada | 18    | 0.9                  |
| 07/2012 | 150                   | Miguel<br>Hidalgo-<br>Huimanguillo,<br>Tabasco              | 17.67-93.74                 | 24             | Papaya              | Cultivada | 457               | Amarilla-<br>anaranjada | 10    | 2.6                  |
| 07/2012 | 169a                  | La Venta-<br>Huimanguillo,<br>Tabasco                       | 18.1-94.04                  | 15             | Papaya              | Cultivada | 834               | Amarilla                | 11    | 3.4                  |
| 07/2012 | 188a                  | San Carlos-<br>Tenosique,<br>Tabasco                        | 17.43-91.49                 | 42             | P. Zapote           | Cultivada | 2004              | Amarilla                | 11    | 2.8                  |
| 07/2012 | 197a                  | Tamulté de las<br>Sabana-Centro,<br>Tabasco                 | 18.16-92.79                 | 8              | P. Zapote           | Cultivada | 1980              | Amarilla                | 9     | 2.9                  |
| 11/2012 | 203                   | Becan-<br>Calakmul,<br>Campeche                             | 18.51-89.46                 | 277            | -                   | Silvestre | 7.2               | Amarilla                | 17    | 0.6                  |
| 11/2012 | 205                   | El Plan de San<br>Luis-Calakmul,<br>Campeche                | 18.53-89.56                 | 255            | -                   | Silvestre | 11.5              | Amarilla                | 14    | 1.3                  |
| 12/2012 | 210b                  | Conguas-<br>Calakmul,<br>Campeche                           | 18.54-89.92                 | 176            | -                   | Silvestre | 8.0               | Amarilla                | 18    | 1.1                  |
| 08/2017 | Maradol<br>roja       | Cuba                                                        | -                           | -              | Variedad            | Comercial | 1800              | Rojizo-anaranjada       | 12    | 4.0                  |

**Cuadro 2. Escala de severidad y descripción de síntomas para la evaluación de plantas de papaya (*C. papaya*) infectadas por el virus del PRSV-p. Ajustado de Rodríguez *et al.* (2013).**

**Table 2. Scale of severity and description of symptoms for the evaluation of papaya trees (*C. papaya*) infected by the PRSV-p virus. Adjusted from Rodríguez *et al.* (2013).**

| Severidad | Descripción de síntomas                                                                                  | Rango promedio para calcular severidad |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 0         | Ausencia de síntomas (0%)                                                                                | 0                                      |
| 1         | Síntoma inicial del virus, aún sin estar bien definido (1-9%)                                            | 5                                      |
| 2         | Síntoma evidente, pero puntual en un órgano (10-24%)                                                     | 17                                     |
| 3         | Síntoma que no se encuentra generalizado en todos los órganos y que abarca el 25-50% del órgano afectado | 38                                     |
| 4         | Síntoma severo y generalizado en el órgano, aunque sólo en 51-75% del órgano                             | 63                                     |
| 5         | Síntoma severo y generalizado en todos los órganos (76-100%).                                            | 88                                     |

AGDIA®. Se colectó tejido vegetal de 42 plantas de las 13 Acc y la var Maradol roja; se etiquetó en bolsas y transportó en frío al Lab. de Virus, Programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Cada muestra se maceró en un molino de rodillos (Dayton Electric®, Mod: 4Z522); el extracto se recolectó con 100 µl del buffer de extracción. Se adicionaron dos repeticiones por muestra en una placa de 96 pozos junto a controles positivos y negativos. Para las incubaciones, el conjugado enzima-sustrato y los lavados con buffer se siguieron las indicaciones del fabricante. Los pozos se leyeron a 405 nm (Thermo Scientific®, Multiskan FC). El valor  $\geq 2.0$  nm se consideró positivo a PRSV-p. El porcentaje de incidencia ( $I\%$ ) de la enfermedad se determinó mediante la fórmula:  $1\% = (n_i/N_j)*100$ , donde:  $n_i$  = Número de plantas enfermas por parcela experimental en el momento de la observación; y  $N_j$  = Número total de plantas evaluadas por parcela experimental. Las plantas de las Acc y la var Maradol inoculadas mostraron síntomas visuales del PRSV-p en 64.29 %, confirmado mediante DAS-ELISA. El número de plantas enfermas en las 13 Acc y la var Maradol roja aumentó en el tiempo, con incidencias final del PRSV-p inoculado con *A. nerii* de entre 33.3 y 100 %. Es decir, todas las Acc fueron susceptibles al PRSV-p en condiciones de

$1\% = (n_i/N_j)*100$ , where:  $n_i$  = number of diseased plants per experimental plot during observation, and  $N_j$  = total number of plants evaluated per experimental plot. Visual symptoms of the PRSV-p were displayed in 64.29% of inoculated plants from the Acc and Maradol var, confirmed by DAS-ELISA. Number of diseased plants in the 13 Acc and Red Maradol var increased with time, with final incidences of the PRSV-p inoculated with *A. nerii* between 33.3 and 100%. In other words, all Acc were susceptible to PRSV-p under greenhouse conditions, with clear differences in the proportion of infected plants (Table 3). Acc 65, 94a, 205 were the first to show symptoms of PRSV-p in a plant, on the 3rd week after inoculation (WAI), while red Maradol began with symptoms in two plants; Acc 80a, 210b, 147a, 60 and 203 displayed a plant with symptoms on the 4th WAI, and Acc 188a and 169a displayed two plants with symptoms; Acc 64, 150 and 197a were the last to show the first symptoms of PRSV-p, both in two plants up to the 5th WAI.

The proportion of plants affected in red Maradol and in Acc 188a and 80 increased gradually until they reached a final incidence of 100 %, while in Acc 169, 65, 210b, 94a, 64a, 150 and 197a, incidence increased slowly until it reached 67 %. Acc 147a, 60, 203 and 205 maintained the same proportion

invernadero, con claras diferencias en la proporción de plantas infectadas (Cuadro 3). Las Acc 65, 94a, 205 fueron las primeras en mostrar síntomas del PRSV-p en una planta durante la 3ª semana después de la inoculación (SDI), mientras que Maradol roja inició con síntomas en dos plantas; las Acc 80a, 210b, 147a, 60 y 203 mostraron una planta con síntomas a la 4ª SDI, y las Acc 188a y 169a mostraron dos plantas con síntomas; las Acc 64, 150 y 197a fueron las últimas en manifestar los primeros síntomas del PRSV-p, ambas en dos plantas hasta la 5ª SDI.

La proporción de plantas afectadas en Maradol roja y en las Acc 188a y 80 aumentaron gradualmente hasta alcanzar 100% en incidencia final, mientras que en las Acc 169, 65, 210b, 94a, 64a, 150 y 197a incrementaron más lento su incidencia hasta alcanzar 67%. Las Acc 147a, 60, 203 y 205 se mantuvieron con la misma proporción de plantas afectadas durante todo el periodo (33%), y resultaron menos afectadas por el virus. Esto pudo deberse

of affected plants during the entire period (33%), and they were less affected by the virus. This might be due to a lower susceptibility to transmission by *A. nerii* on these accessions. Selecting Acc with transmission indices of less than 100% might guarantee the production of fruit in the orchard; this factor, although it is not the strongest, might provide tolerance to the virus. Rodríguez *et al.* (2013) also mentioned that all Acc of papaya plants evaluated in the field were sensitive to PRSV-p, with differences in time of infection between them. It is therefore likely that the differences in tolerance of the Acc to the PRSV-p have a genetic origin. Gonsalves *et al.* (2010) indicate that no natural resistance to this virus has been found in *C. papaya*, although tolerant lines have been found in the Philippines, Taiwan, Thailand, and Florida, USA, which, once are diseased, do not produce adequate fruits for the market, either. However, delaying the beginning of the infection allows for a production of quality fruits (Hernández-Castro *et*

**Cuadro 3. Incremento temporal de la incidencia del PRSV-p en 13 accesiones de papayo nativo y var Maradol roja en condiciones de invernadero.**

**Table 3. Temporary increase of the incidence of PRSV-p in 13 accessions of native papaya and the var red Maradol under greenhouse conditions.**

| Accesiones | Inicio de la incidencia (Semana) | Incidencia inicial (%) | Incidencia final (%) | Área bajo la curva de incidencia vs. severidad |
|------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------------------------|
| Maradol    | 3                                | 67                     | 100                  | 242                                            |
| 188a       | 4                                | 67                     | 100                  | 201                                            |
| 80         | 4                                | 33                     | 100                  | 139                                            |
| 169        | 4                                | 67                     | 67                   | 155                                            |
| 65         | 3                                | 33                     | 67                   | 155                                            |
| 210b       | 4                                | 33                     | 67                   | 132                                            |
| 64a        | 5                                | 67                     | 67                   | 107                                            |
| 94a        | 3                                | 33                     | 67                   | 101                                            |
| 150        | 5                                | 67                     | 67                   | 92                                             |
| 197a       | 5                                | 67                     | 67                   | 57                                             |
| 147a       | 4                                | 33                     | 33                   | 77                                             |
| 60         | 4                                | 33                     | 33                   | 57                                             |
| 203        | 4                                | 33                     | 33                   | 41                                             |
| 205        | 3                                | 33                     | 33                   | 39                                             |

a que estas accesiones son menos susceptibles a ser transmitidas por *A. nerii*. Al seleccionar Acc con índices de transmisión menores a 100% se podría garantizar la producción de fruta en la huerta; este factor, aunque no es el más fuerte, podría aportar tolerancia al virus. Rodríguez *et al.* (2013) también mencionaron que todas las Acc de papayo que evaluaron en campo resultaron sensibles al PRSV-p, con diferencias en tiempo de infección entre ellas. Por tanto, es probable que las diferencias de tolerancia de las Acc al PRSV-p sean de origen genético. Gonsalves *et al.* (2010) indican que no se ha identificado resistencia natural a este virus en *C. papaya*, pero se conocen líneas tolerantes en Filipinas, Taiwán, Tailandia y Florida, EUA, las que al enfermarse, tampoco producen frutos aptos para su venta en el mercado. Sin embargo, el retraso del inicio de la infección permite que se produzcan frutos con calidad (Hernández-Castro *et al.*, 2015); por ello se deben reconocer las Acc con un periodo largo de incubación que permitan obtener los primeros frutos sanos. En Taiwán la incidencia de la enfermedad en líneas no transgénicas de papayo en campo se presentó a los 29 días del trasplante, mientras que las líneas transgénicas enfermaron cinco meses después (Bau *et al.*, 2004).

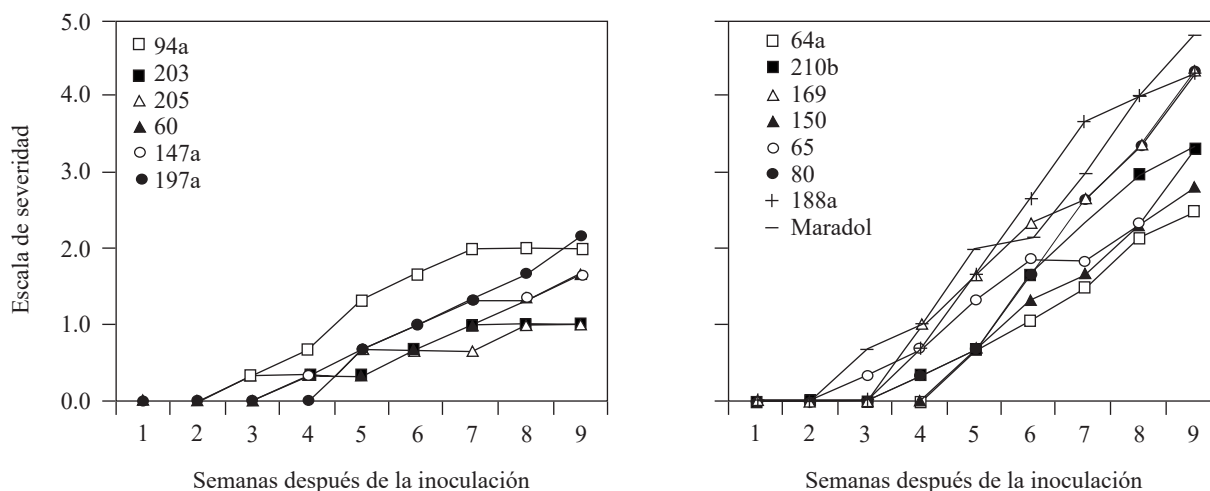
**Severidad.** La estimación visual del valor de severidad por planta se transformó al promedio del rango porcentual indicado en la descripción de síntomas (Cuadro 2); esto constituyó el nivel de daño en el momento de la evaluación ( $X_{ki}$ ), que se utilizó para calcular el índice de severidad promedio ( $IS$ ) por accesión, mediante la siguiente fórmula:  $IS = \frac{\sum_{i=1}^k X_{ki} * N_{ki}}{N_j}$ , donde además,  $N_{ki}$  = Número de plantas con el nivel del daño en el momento de la evaluación; y  $N_j$  = Número total de plantas evaluadas. Todas las Acc y la var Maradol roja mostraron un incremento en la proporción de síntomas evaluados durante las nueve semanas después de

*al.*, 2015), which is why it is crucial to recognize the Acc with a long incubation period to help obtain the first healthy fruits. In the fields of Taiwan, the incidence of the disease in non-transgenic papaya lines appeared 29 days after transplanting, while transgenic lines acquired the disease five months later (Bau *et al.*, 2004).

**Severity.** The visual estimation of the severity value per plant was transformed into the mean percentage rank indicated in the description of symptoms (Table 2); this constituted the level of damage during the evaluation ( $X_{ki}$ ), which was used to calculate the mean severity index ( $IS$ ) per accession, using the formula  $IS = \frac{\sum_{i=1}^k X_{ki} * N_{ki}}{N_j}$ , where, in addition,  $N_{ki}$  = number of plants with the level of damage at the moment of evaluation; and  $N_j$  = total number of plants evaluated. All Acc and the var red Maradol displayed an increase in the proportion of symptoms evaluated in the nine weeks after inoculation (WAI), although there were differences between them. The highest PRSV-p severity was observed in the Red Maradol var (with a mean severity index of 4.8), followed by Acc 88, 169 and 188a (4.3), Acc 210b and 65 (3.3), Acc 150 (2.8) and 64a (2.5), and were therefore considered the most susceptible to the disease (Figure 1, Right). The high susceptibility of red Maradol to the PRSV-p is probably caused by not been selected for tolerance to the virus. From those Acc that presented the latest incidence, 205 and 203 displayed the lowest mean severity index (1.0) on week nine. Acc 60 and 147a displayed a mean severity index of 1.7, followed by 94a with a value of 2.0, and by 197a with 2.2 (Figure 1, Left). These genotypes have the potential of being used as a source of tolerance in genetic breeding programs for papaya. In Cuba, Rodríguez *et al.* (2013) evaluated four promising accessions for seven months under field conditions; in three of them they obtained a low mean final

la inoculación (SDI), aunque se presentaron diferencias entre ellas. La severidad más alta por el PRSV-p se pudo observar en la var Maradol roja (con un índice de severidad promedio de 4.8), seguida de las Acc 88, 169 y 188a (4.3), las 210b y 65 (3.3), la 150 (2.8) y la 64a (2.5), por lo que se consideraron las de mayor susceptibilidad a la enfermedad (Figura 1, Derecha). Probablemente, la alta susceptibilidad de Maradol roja al PRSV-p se deba a que esta var comercial no fue seleccionada por tolerancia a este virus. De las Acc que presentaron la incidencia más tardía, la 205 y la 203 exhibieron el menor índice de severidad promedio (1.0) a la semana nueve. Las Acc 60 y 147a mostraron un índice de severidad promedio de 1.7, seguidas de la 94a con un valor de 2.0 y la 197a con 2.2 (Figura 1, Izquierda). Estos genotipos tienen el potencial para ser usados como fuente de tolerancia en programas de mejoramiento genético del papayo. En Cuba, Rodríguez *et al.* (2013) evaluaron cuatro accesiones prometedoras durante siete meses bajo

severity of the symptoms reported for stem, petiole, foliage and fruit: “Sapote de Pílon en Cuba” (2.3), “Amarilla de Duaba” (2.4) and “Amarilla de Nava” (2.5); the Acc “Tallo Morado de Nava” was the most effective in the trial (3.1), yet in none of the four was the final severity in fruit above 2.5; the authors considered these materials as tolerant and with potential to be used as base material in genetic breeding programs for papaya in that country. The level of tolerance by severity in this investigation is comparable with that of 10 transgenic lines that Bau *et al.* (2003) classified as resistant, since they kept symptoms moderate five WAI. Because the present test was carried out during nine WAI, it is possible for the severity to increase during the lifetime of the plants. However, a delay in the infection of at least 5 weeks at the beginning of the development of the plant may produce differences in yield of over 50%, even in susceptible materials such as Red Maradol (Hernández-Castro *et al.*, 2010). On the other hand, advanced intergenetic



**Figura 1. Dinámica del índice de severidad promedio del PRSV-p inoculado con *A. nerii*, durante nueve semanas después de la inoculación. Izquierda: Las seis accesiones de menor índice de severidad. Derecha: Variedad Maradol roja y las siete accesiones de mayor índice de severidad.**

**Figure 1. Dynamics of the mean severity index PRSV-p inoculated with *A. nerii* for nine weeks after inoculation. Left: six accessions with the lowest severity index. Right: Red Maradol variety and seven accessions with the highest severity index.**

condiciones de campo; en tres de ellas obtuvieron baja severidad final promedio de los síntomas reportados en tallo, peciolo, follaje y fruto: Sapote de Pión en Cuba (2.3), Amarilla de Duaba (2.4) y Amarilla de Nava (2.5); la Acc Tallo Morado de Nava resultó ser la más afectada en el ensayo (3.1); sin embargo, en ninguna de las cuatro, la severidad final en fruto fue mayor a 2.5; los autores consideraron estos materiales como tolerantes y con potencial para ser utilizados como material base en programas de mejoramiento genético de papayo en ese país. El nivel de tolerancia por severidad en esta investigación es comparable con el de 10 líneas transgénicas que Bau *et al.* (2003) clasificaron como resistentes, al mantener síntomas atenuados cinco SDI. Debido a que el presente ensayo se llevó a cabo durante nueve SDI, es posible que la severidad aumente durante la vida de las plantas. Sin embargo, un retraso de la infección de al menos 5 semanas, al inicio de desarrollo vegetal, puede lograr diferencias en rendimiento superiores al 50%, incluso en materiales susceptibles como Maradol roja (Hernández-Castro *et al.*, 2010). Por otro lado, cruza intergenéricas avanzadas (F6) de *C. papaya* (var Arka Surya) con *Vasconcellea cauliflora* realizadas por Yanthan *et al.* (2017) generaron siete progenies tolerantes al PRSV-p bajo condiciones de campo. En años anteriores, el grupo de Gonsalves *et al.* (2010) introdujo la cápside del PRSV-p cepa HA 5-1 a var transgénicas comerciales del grupo Solo y desarrolló resistencia al PRSV-p. Sin embargo, en México aún no ha permitido el cultivo de var de papayo transgénicas.

**Manejo de accesiones durante la colecta.** Los datos del *IS* se analizaron por Kruskal y Wallis para separar los grupos de Acc respecto al manejo observado durante la colecta del material. El análisis mostró diferencias ( $P=0.032$ ) entre el porcentaje de síntomas de las Acc asociados a los manejos.

crosses (F6) of *C. papaya* (var Arka Surya) with *Vasconcellea cauliflora* carried out by Yanthan *et al.* (2017) produced seven progenies tolerant to PRSV-p under field conditions. In previous years, the group of Gonsalves *et al.* (2010) introduced the capsid of the PRSV-p strain HA 5-1 to transgenic varieties of the Solo group and developed PRSV-p resistance. However, Mexico has still not allowed the production of transgenic varieties of papaya.

**Management of accessions during collections.** *IS* data were analyzed by Kruskal and Wallis to separate the groups of Acc regarding the management observed during the collection of the material. The analysis showed differences ( $P=0.032$ ) between the percentage of symptoms of the Acc related to management. Acc found in the wild with no management presented the lowest severity, in comparison with the commercial var Red Maradol, while Acc with backyard management and planted in orchards did not present different percentage of severity between them (Figure 2). This confirms that it is in wild genotypes where the largest gene bank may lie for tolerance to the infection of the virus, since these are genotypes that have not yet been selected by man. In this regard, d'Eeckenbrugge *et al.* (2014) mention that within Caricaceae there are 21 wild species of the genus *Vasconcellea*, which have a potential to resist the virus PRSV-p, and could be used to generate resistance in commercial populations. In the Philippines, Alviar *et al.* (2012) indicate that Sinta is a papaya hybrid with a parent line of the genus *Cariflora* that inherits to the hybrid a high PRSV-p tolerance, therefore infected plants do not reduce their yields. This highlights the importance of evaluating a var or accession regarding the infection of the virus as a strategy for the development of resistant varieties.

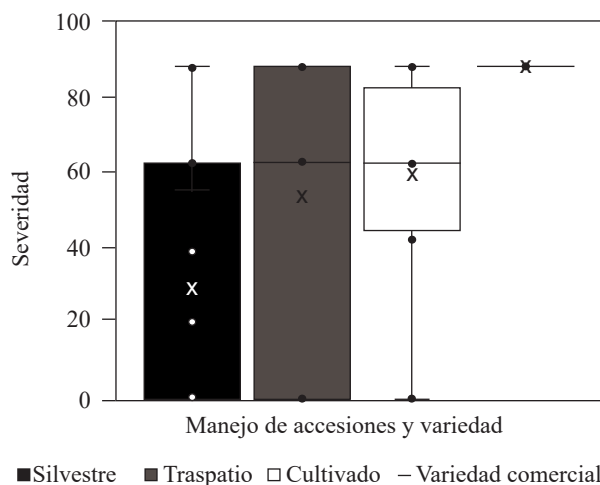
Despite its preliminary connotation, we suggest to replicate this investigation with more



Las Acc encontradas en estado silvestre sin manejo presentaron la menor severidad respecto a la var comercial Maradol roja, mientras que las Acc con manejo de traspatio y cultivadas no presentaron un porcentaje de severidad diferente entre sí (Figura 2). Esto corrobora que es en los genotipos silvestres donde podría estar el mayor banco de genes para tolerar la infección al virus, por ser genotipos que aún no han sido seleccionados por el hombre.

Al respecto, d'Eeckenbrugge *et al.* (2014) mencionan que dentro de Caricaceae existen 21 especies silvestres del género *Vasconcellea*, que cuentan con un potencial de resistencia al virus PRSV-p, que podrían ser usadas en la generación de poblaciones comerciales resistentes. En Filipinas, Alviar *et al.* (2012) indican que Sinta es un híbrido de papayo con una línea parental del género *Cariflora* que le hereda alta tolerancia al PRSV-p, con lo que las plantas infectadas no reducen sus rendimientos. Esto resalta la importancia de evaluar el comportamiento de una var o accesión con respecto a la infección del virus como una estrategia para el desarrollo de var resistentes.

A pesar de su carácter preliminar, se sugiere replicar esta investigación con más accesiones y evaluarlas hasta la etapa de fructificación. Debido a las limitaciones para el uso de transgénicos, los esfuerzos mexicanos para mantener bancos de accesiones de material silvestre de papayo deberán aprovechar la disponibilidad del genoma completo del papayo para identificar marcadores genéticos e identificar los genes de tolerancia o resistencia en materiales sobresalientes de *C. papaya* (Porter *et al.* 2013), con lo que se podrá sistematizar rápida y eficientemente el avance de programas de desarrollo de genotipos resistencia a este y otros virus.



**Figura 2. Distribución de severidad entre grupos de accesiones de papayo (*Carica papaya* L.), según su manejo.**

**Figure 2. Distribution of severity in groups of accessions of papaya (*Carica papaya* L.), according to their management.**

accessions, evaluating them until fruit set. Due to the limitations for the use of transgenics, Mexican efforts to maintain accession banks of wild papaya material should take advantage of the papaya complete genome availability to identify genetic markers and identify the tolerance or resistance genes in outstanding *C. papaya* materials (Porter *et al.* 2013), so the advancement of development programs for resistance genotypes to this and other viruses can be systematized in a quick and efficient manner.

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

LITERATURA CITADA

- Alviar NA, Sta Cruz FC and Hautea DM. 2012. Assessing the responses of tolerant papaya (*Carica papaya* L.) varieties to *papaya ringspot virus* (PRSV) infection and establishment of symptom severity rating scale for resistance screening. *Philippine Journal of Crop Science* 37:20-28. <http://www.cssp.org.ph/pjes/abstracts/volume-37-issue-no-2-august-2012/>
- Bau HJ, Ying-Huey C, Tesong-Ann Y, Jiu-Sherng Y and Shyi-Dong Y. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2003.93.1.112>
- Bau HJ, Ying-Huey C, Tesong-Ann Y, Jiu-Sherng Y, Chi-Hsiung H, Chien-Yih L and Shyi-Dong Y. 2004. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *papaya ringspot virus* in Taiwan. *Plant Disease* 88:594-599. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.594>
- d'Eeckenbrugge G, Drew R, Kyndt T and Scheldeman X. 2014. *Vasconcellea* for papaya improvement. In: Ming R and Moore PH. (eds.) *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 47-79. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7_4
- Fuentes G and Santamaría JM. 2014. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, domestication, and production. In: R Ming and Moore PH (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 3-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_1
- Gonsalves D, Tripathi S, Carr JB and Suzuki JY. 2010. Papaya ringspot virus. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2010-1004-01>
- Hernández-Castro E, Villanueva-Jiménez JA, Mora-Aguilera JA y Nava-Díaz C. 2010. Barreras de maíz en una estrategia de manejo integral para controlar epidemias del virus mancha anular del papayo (PRSV-P). *Agrociencia* 44:339-349. <http://www.redalyc.org/pdf/302/30215552008.pdf>
- Hernández-Castro E, Nava DA, Mora AJA, Villanueva-Jiménez JA, Vargas AD and Palemón FA. 2015. Incidence of the *papaya ringspot virus* (PRSV-p) and management in the state of Guerrero, Mexico. In: Dimitrov TS and Vitanova II. *Tropical Fruits*. Nova Science Publishers Inc. pp. 119-127. https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=54114
- Noa-Carrazana J, González LD, Ruiz-Castro B, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of *papaya ringspot virus* and *papaya mosaic virus* in papaya plants (*Carica papaya* L.) in Mexico. *Plant Disease* 90:1004-1011. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Osorio-Acosta F, Villanueva-Jiménez JA, Celis-León B, Morales-Rodríguez A y José-Pablo R. 2016. Insecticidas en la transmisión del virus de la mancha anular de *Carica papaya* L., mediante *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe). *Agroproductividad* 9(10):68-74 <http://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/834>
- Porter BW, Christopher DA and Zhu YJ. 2013. The phylogeny of Caricaceae. In: Ming R and Moore PH (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 277-307. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_15
- Rodríguez D, Alonso M, Tornet Y, Valero L, Lorenzetti, ER and Pérez R. 2013. Assessment of Cuban papaya (*Carica papaya* L.) accessions against ringspot. *Summa Phytopathologica* 39:24-27. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000100004>
- Romero RJA. 2013. Manejo y conservación de germoplasma de la familia Caricaceae. Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 145 p. <http://www.secheresse.info/spip.php?article35498>
- SNAREFI, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 2017. MacroRed Frutales. SNICS, SAGARPA, México. 62 p. <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/macro-red-frutales> (consulta: mayo 2018).
- Villanueva-Jiménez JA, Abato-Zárate M y Reyes-Pérez N. 2015. Plagas del papayo en México. In: Otero-Colina G, Abato-Zárate M y Villanueva-Jiménez JA. (eds.). *Ácaros Asociados al Cultivo de Papayo en México*. Editorial Colegio de Postgraduados. México. pp. 29-40. <https://www.researchgate.net/publication/294893439>
- Yanthan LJ, Vasugi C, Dinesh MR, Reddy K and Das R. 2017. Evaluation of F6 intergeneric population of papaya (*Carica papaya* L.) for resistance to *papaya ring spot virus* (PRSV). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:289-298. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.033>

***Fusarium sambucinum* Fuckel causal agent of fruit rot of manzano chilli pepper (*Capsicum pubescens*) in Mexico**

***Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México**

Alejandra Almaraz Sánchez¹, Victoria Ayala Escobar¹, Ibar Felipe Tlatilpa Santamaría¹, Daniel Nieto Angel*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 56230, México. *Autor para correspondencia: dnieto@colpos.mx.

Recibido: 02 de Octubre, 2018.

Aceptado: 12 de Diciembre, 2018.

Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Tlatilpa-Santamaría IF and Nieto-Angel D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel causal agent of fruit rot of manzano chilli pepper (*Capsicum pubescens*) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 159-169.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-2

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

Resumen. El chile manzano al igual que otros frutos, es afectado por patógenos postcosecha que afectan la calidad. En el 2016 se observaron lesiones hundidas con micelio blanquecino en frutos de chile manzano procedentes del Estado de México. El objetivo fue identificar al agente causal del síntoma descrito en frutos, mediante la caracterización morfológica, molecular y pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos con herida y sin herida, así como la caracterización morfológica y molecular. Los resultados indican que el agente causal de los síntomas del hundimiento fue *Fusarium sambucinum*. Los aislados

Abstract. Manzano pepper, like other fruits, is affected by postharvest pathogens that affect quality. In 2016, sunken lesions with whitish mycelium were observed in manzano pepper of samples from the Estado de Mexico. The objective was to identify the causal agent of the symptom described in fruits, by measurements of the morphological, molecular characterization, and pathogenicity tests. Pathogenicity tests were performed on wounded and unwounded fruits, as well as morphological and molecular characterization. The results indicate that the causal agent of the sinking symptoms was *Fusarium sambucinum*. The isolates were planted in PDA, Clavel-Agar, and SNA culture media, where they formed orange sporodochia, hyaline macroconidia with the papillated basal cell and the terminal cell in foot shape: 24.8-35.3 μm long and 3.67-4.46 μm wide, from three to five septa, this was confirmed by the sequencing analysis of the *tef 1 α* gene (translation elongation factor 1 α). The comparison between means (Tukey) detected significant differences in the method of inoculation but not between isolations on the fruit. This is the first report in Mexico of *Fusarium sambucinum*

se sembraron en medios de cultivo PDA, Clavel-Agar y SNA, en donde formaron esporodocios de color naranja, macroconidias hialinas con la célula basal papilada y la célula terminal en forma de pie: 24.8-35.3 μm de largo y 3.67-4.46 μm de ancho, de tres a cinco septos, esto fue confirmado con el análisis de secuenciación del gen *tef 1 α* (translation elongation factor 1 α). La comparación entre medias (Tukey) detectó diferencias significativas en el método de inoculación, pero no entre aislamientos sobre el fruto. Es el primer reporte en México de *Fusarium sambucinum* como agente causal de lesiones hundidas con micelio blanquecino en frutos de chile manzano.

Palabras clave: hongos, postcosecha, pudrición chile, fusariosis, PDA y *tef 1 α* .

El chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P) es un producto agrícola con altas posibilidades de comercialización a nivel mundial por su demanda para consumo como verdura, o bien por sus propiedades químicas para la obtención de derivados de capsaicina (Pérez-Grajales *et al.*, 2004). El chile manzano fue introducido en México a principios del siglo XX, es el único tipo de chile que se cultiva entre de 1700 y 2500 m; crece como arbusto grande y puede llegar hasta los 3 metros, el fruto es esférico, verde en estado tierno y se torna rojo, amarillo y naranja al madurar. Las principales zonas productoras de chile manzano se encuentran ubicadas en los estados de Michoacán, Puebla, Edo. de México y Veracruz, en menor escala Chiapas y Oaxaca (Espinosa-Torres y Villa-Galindo, 2008). El período de siembra es en los meses de abril y mayo, el consumo es insustituible para las zonas de la sierra norte de Puebla, Toluca y Michoacán (principalmente Morelia), donde forma parte de los hábitos alimenticios. En cuanto a su cosecha a cielo abierto

as the causal agent of sunken lesions with whitish mycelium in manzano peppers.

Key words: fungi, postharvest, pepper rot, fusariosis, PDA, and *tef 1 α* .

The manzano chili pepper (*Capsicum pubescens* R and P) is an agricultural product with high possibilities of worldwide commercialization due to its demand for consumption as a vegetable or for its chemical properties to obtain sub products of capsaicin (Pérez-Grajales *et al.*, 2004). Manzano peppers were introduced into Mexico at the beginning of the 20th Century, and it is the only type of chili pepper grown between 1700 and 2500 masl; it grows as a large bush, it can reach heights of up to 3 meters, the fruit is spherical and is green until its stage of maturity, when it turns red, yellow and orange. The main production areas of manzano peppers are located in the states of Michoacán, Puebla, the State of Mexico and Veracruz, and to a lower extent, in Chiapas and Oaxaca (Espinosa-Torres and Villa-Galindo, 2008). Its harvesting period is in the months of April and May. Its consumption is irreplaceable for the areas of the Sierra Norte in Puebla, Toluca, and Michoacan (mainly Morelia), where it is a part of people's dietary habits. Its harvest yield in the open is between 9 and 14 t/ha, and in a greenhouse, between 40 and 70 t (Espinosa-Torres and Ramírez-Abarca, 2016). However, the crop can be affected by pathogens. Some of the diseases that affect the crop include wilting of the manzano pepper, caused by diverse pathogens such as *Botrytis*, *Fusarium* spp., and *Phytophthora*, etc., which cause significant losses in production in several parts of the world, including Mexico. *Fusarium sambucinum* [teleomorph *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc (Leslie and Sumerell, 2006)] is one of the fungal species

es de 9 a 14 t/ha e invernadero 40 a 70 t (Espinosa-Torres y Ramírez-Abarca, 2016). Sin embargo, el cultivo puede ser afectado por patógenos. Entre las enfermedades que afectan el cultivo se encuentran la marchitez del chile manzano, causada por diversos fitopatógenos, tales como *Botrytis*, *Fusarium* spp., *Phytium*, etc., los cuales ocasionan pérdidas significativas en la producción en varias partes del mundo, incluyendo México. *Fusarium sambucinum* [teleomorfo *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc (Leslie y Sumerell, 2006)] es una de las especies de hongos que causa podredumbre seca o pudrición negra en papa (*Solanum tuberosum* L.), afectando en campo como en almacenamiento (Hanson *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2008). *F. sambucinum* ha sido reportado en Europa, Estados Unidos de América y, recientemente, en China afecta a frutos en almacenamiento y que produce micotoxinas, tales como tricotecenos (El-Banna *et al.*, 1984; Altomare *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2012). La identificación correcta de un fitopatógeno es esencial para proponer las alternativas más efectivas para su manejo (Agrios, 2005). En este contexto, el objetivo, fue determinar el agente causal de lesiones hundidas en frutos de chile manzano por medio de caracterización morfológica y molecular con factor de elongación (EF-1 ∞) y pruebas de patogenicidad en frutos.

En noviembre del 2015 se llevó a cabo un muestreo dirigido a frutos de chile manzano procedentes del Estado de México, municipio de Coatepec de Harinas en donde se colectaron frutos con síntomas de pudrición y lesiones hundidas. Las muestras se trasladaron en bolsas de plástico (Ziploc®) etiquetadas y colocadas en una hielera al laboratorio de postcosecha del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

Para aislar al agente causal, se desinfectaron fragmentos de 1 cm de la zona de avance de la pudrición causada por hongos, para lo cual se realizaron cortes de tejido de 40 frutos y se utilizó una

that cause dry rotting or black rotting in potatoes (*Solanum tuberosum* L.), affecting both in the field or in storage (Hanson *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2008). *F. sambucinum* has been reported in Europe, the United States, and recently, in China, as affecting fruits in storage and producing micotoxins such as tricothecenes (El-Banna *et al.*, 1984; Altomare *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2012). The correct identification of a plant pathogen is essential to propose the most effective alternatives for its management (Agrios, 2005). In this context, the aim was to determine the causal agent of sunken lesions in manzano pepper fruits using morphological and molecular characterization with a factor of elongation (EF-1 ∞) and pathogenicity tests in fruits.

In November of 2015, samples were taken of manzano pepper fruits from the municipality of Coatepec de Harinas, State of Mexico, where fruits were gathered with symptoms of rotting and sunken lesions. The samples were placed in labeled plastic bags (Ziploc®) in a cooler and taken to the postharvest laboratory of the Instituto de Fitosanidad of the Colegio de Postgraduados.

To isolate the causal agent, we disinfested 1 cm fragments of the area of advancement of the rotting caused by fungi, and for this, cuts were made on the tissues of 40 fruits and placed them in a sodium hypochlorite solution at 0.2% for 2 min. They were then washed with sterile distilled water twice, left to dry on sterile paper towels and placed in Petri dishes with 20 mL of PDA, which were left in an incubator at 27±2 °C, under light for 24 h. After sporulating after six days of growth, monospore cultures were performed and moved to Petri dishes with a PDA culture medium. The conservation of isolations was carried out with the transfer of 10 mycelial discs (5 mm in diameter) to 2 mL cryogenic tubes with 1.5 mL of glycerine at 20% (v/v) stored at -80 °C and in test tubes with mineral oils.

solución de hipoclorito de sodio al 0.2% durante 2 min, enseguida se lavaron con agua destilada estéril dos veces, se dejaron secar sobre sanitas estériles y se colocaron en cajas Petri con 20 mL de PDA. Las cajas se colocaron en incubación a 27 ± 2 °C, bajo un régimen de 24 h luz; una vez esporulados a los seis días de crecimiento, se realizaron cultivos monospóricos y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA. La conservación de los aislados se llevó a cabo con la transferencia de 10 discos miceliales (5 mm de diámetro) a tubos criogénicos de 2 mL, con 1.5 mL de glicerina al 20% (v/v) almacenados a -80 °C y en tubos de ensaye con aceite mineral.

La caracterización morfológica se realizó a partir de sus estructuras de reproducción asexual. Para lo cual los aislados fueron transferidos a medio de cultivo PDA, SNA y Clavel-Agar con tres repeticiones para cada una de las colonias fúngicas, posteriormente fueron incubadas a 25 ± 2 °C en condiciones de luz continua. Se midió el crecimiento micelial cada 48 h hasta que el hongo llenó por completo la caja donde se evaluó el color de la colonia, tipo de micelio, crecimiento del micelio y esporas (conidios, clamidosporas y esporodoquios). Después de 15 días de incubación se hicieron preparaciones en glicerina al 50 % con la finalidad de reconocer las estructuras de los hongos con ayuda de un microscopio compuesto (Velab Ve-B6, México). Se observaron 50 macroconidios y se registró su tamaño, coloración y número de septos con el programa Motic Images plus 2.0 (Group Co., Ltd). La identificación morfológica de los hongos a nivel de género se llevó a cabo empleando las claves especializadas de Barnett y Hunter (1998) y para especie de Leslie y Summerell (2006).

Una vez obtenidos los aislados puros de los hongos, se inició la identificación molecular con la extracción de ADN genómico de nueve aislados e identificados morfológicamente como *Fusarium*

The morphological characterization was carried out from their asexual reproduction structures. For this process, the isolations were transferred to PDA, SNA and Clavel-Agar culture mediums with three repetitions for each one of the fungal colonies; they were then incubated at 25 ± 2 °C under conditions of continuous light. The mycelial growth was measured every 48 h until the fungus completely filled the dish, where the color of the colony was evaluated along with the type of mycelium, growth of the mycelium and spores (conidia, chlamydo spores and sporodochia). After 15 days of incubation, preparations were made in glycerine at 50% with the purpose of recognizing the structures of the fungi using a compound microscope (Velab Ve-B6, México). Fifty macroconidia were observed and their size, color and number of septa were recorded using the program Motic Images plus 2.0 (Group Co., Ltd). The morphological identification of the fungi at the level of genus was carried out using Barnett and Hunter's specialized code (1998), and for species, Leslie and Summerell's (2006).

Once the pure isolations were taken from the fungi, we began the molecular identification with the extraction of genomic DNA from nine isolations and morphologically identified as *Fusarium*; for this, we followed the protocol indicated in the Plant DNeasy® Minikit extraction kit (Quiagen). A 0.03 g mycelium sample was placed in Eppendorf tubes, tenderizing with a hypodermic needle. We then added 400 µL of Buffer AP1 and 4 µL of RNase y se agitó. The samples were incubated in a double boiler for 10 min at 65 °C, we stirred by inverting them every 2 min, and later added 120 µL of the Buffer AP2 to the sample, and incubated for 5 min in ice. The mixture was placed in the QIAshredder Mini spin column and centrifuged for 2 min at 14000 rpm. The supernatant was then removed and placed in a new Eppendorf tube, to which 675 µL of the Buffer AP3/E were added. The

para lo cual se siguió el protocolo indicado en el kit de extracción Plant DNeasy® Minikit (Quiagen). Se colocó una muestra de micelio de 0.030 g en tubos Eppendorf macerando con aguja hipodérmica. Se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL de RNasa y se agitó. Las muestras fueron incubadas en baño María por 10 min a 65 °C, se agitó por inversión cada 2 min, después se adicionaron a la muestra 120 µL del Buffer AP2, y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 14000 rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo Eppendorf al que se agregaron 675 µL del Buffer AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin centrifugándolo a 8000 rpm por 1 min. La columna fue reemplazada por otra suplementaria del protocolo y se agregaron 500 µL del Buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó a 8000 rpm por un min; nuevamente se cambió la columna con el filtrado, se adicionaron 500 µL del Buffer AW a la membrana y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un nuevo tubo Eppendorf y se agregaron 100 µL del Buffer AE. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Los productos de extracción de ADN se enviaron al laboratorio de MacroGen® Inc. (Corea) para su purificación, amplificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se procesaron en el programa BioEdit v7.0.9. Se realizaron las pruebas de PCR Factor de elongación (EF-1 ∞) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 63 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C (O'Donnell *et al.*, 1998).

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo sobre 80 frutos de chile manzano sanos en estado de madurez fisiológica, los cuales se inocularon con nueve aislados identificados morfológicamente

mixture was placed in a DNeasy Mini spin tube and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. The column was replaced with another supplementary one of the protocol and 500 µL of the Buffer AW were added in the membrane of the Mini spin DNeasy and centrifuged at 8000 rpm for 1 min; the column was changed once again with the filtrate, 500 µL of the Buffer AW were added to the membrane and centrifuged at 14000 rpm for 2 min. Finally, the DNeasy Mini spin column was transferred to a new Eppendorf tube and 100 µL of the Buffer AE were added. It was incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. The DNA extraction products were sent to the MacroGen® Inc. laboratory (Korea) to be purified, amplified, and sequenced. The sequences obtained were processed in the program BioEdit v7.0.9. The PCR Elongation factor (EF-1 ∞) tests were carried out with the following conditions: initial denaturalization for 5 min at 94 °C, 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 63 °C, 1 min at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C (O'Donnell *et al.*, 1998).

The pathogenicity tests were carried out on 80 healthy manzano pepper fruits in a stage of physiological maturity, which were inoculated with nine isolations, identified morphologically as *Fusarium* sp. The fruits were disinfected using a 0.5 % sodium hypochlorite solution for 5 min, they were submerged in sterile distilled water for 10 min and placed on sterilized paper towels (Kimberly-Clark) until completely dry. Four fruits were inoculated and placed in Styrofoam trays with paper towels, moistened with sterile distilled water placed inside plastic, to provide humidity. The trays with the fruits were placed in a growth chamber under incubation conditions of 27±2 °C. Inoculation was carried out in fruits with lesions (punctured with a needle) and without lesions, and on top of that we placed a disc, 5 mm in diameter, that contained

como *Fusarium* sp. Los frutos se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio 0.5% durante 5 min, se sumergieron en agua destilada estéril durante 10 min y se colocaron sobre toallas de papel (Kimberly-Clark) estériles hasta secarse totalmente. Se inocularon cuatro frutos los cuales se colocaron en charolas de unicel con toallas de papel y humedad con agua destilada estéril que se colocaron dentro de bolsa de plástico para proporcionar humedad. Las charolas con los frutos se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones de incubación de 27 ± 2 °C. La inoculación se hizo en frutos con herida (punción con aguja) y frutos sin herida sobre los cuales se colocó un disco de 5 mm de diámetro que contenían el crecimiento micelial del hongo de cada uno de aislados de siete días de edad. Como testigo se usaron chiles sin herida e inoculados con discos de PDA sin micelio del hongo. Se midió el diámetro de la lesión en los chiles inoculados y sin inocular con los aislados de *Fusarium* sp. cada 48 h. Las pruebas de patogenicidad se repitieron dos veces para cada tratamiento y el testigo. Para información adicional sobre el tamaño de lesión, se realizó comparación de medias (prueba de Tukey) utilizando el programa SAS V.9.1 para Windows.

De la identificación morfológica se obtuvieron nueve aislados del material procesado de los frutos de chile manzano que presentaron un crecimiento promedio de 2 cm de diámetro por día en medio de cultivo PDA. Cada aislado mostró diferente coloración en el medio de cultivo PDA por lo que se formaron tres grupos a los cuales se les asignó una clave. El primer grupo mostró crecimiento micelial de color blanco-rosa que con el paso del tiempo se tornó de color rosa en el medio de cultivo (claves FS24, FS26 y FS27). El segundo grupo mostró crecimiento blanco-crema con crecimiento afelpado, algodonoso y abundante (claves FS25, FS28 y FS32). El tercer grupo presentó un crecimiento

the mycelial growth of the fungus of each one of the seven-day-old isolations. As a control, we used peppers without wounds, inoculated with PDA discs without fungal mycelia. We measured the diameter of the lesions in the inoculated and uninoculated peppers with the isolations of *Fusarium* sp. every 48 h. The pathogenicity tests were carried out twice for each treatment and the control. For additional information on the size of the lesion, we carried out a Tukey comparison of averages using the program SAS V.9.1 for Windows.

From the morphological identification, we obtained nine isolations of the material processed from the manzano chili pepper fruits that showed an average growth rate of 2 cm in diameter in a PDA culture medium. Each isolation displayed different colors in the PDA culture medium, and therefore, three groups were formed, each one of which were given a code. The first group displayed a mycelial growth colored whitish-pink, which turned pink with time in the culture medium (codes FS24, FS26 and FS27). The second group displayed a cream colored white growth, with a fuzzy, abundant cotton-like appearance (codes FS25, FS28 and FS32). The third group presented an initially white growth, which turned red with time (codes FS30, FS31 and FS33). These results coincide with studies reported by Baturó Ciesniewska *et al.* (2015), who observed different pigments in the culture medium, caused by *Fusarium sambucinum*, gathered from *Solanum tuberosum* culture. It was also observed that the nine isolations that grew in the PDA medium formed structures called macroconidia, and in the SNA culture, there was an abundant formation of macroconidia along with orange colored sporodochia. Only fungal mycelia formed in the Clavel-Agar culture medium, and this behavior was general for the nine isolations. Regarding the shape of the macroconidia, they were sickle-shaped hyaline with thin walls, and

inicialmente blanco, pero con el paso del tiempo se tornó de color rojo (claves FS30, FS31 y FS33). Estos resultados coinciden con estudios reportados por Baturó Ciesniewska *et al.* (2015) quienes observaron diferentes pigmentos en el medio de cultivo causados por *Fusarium sambucinum* que se colectó del cultivo de *Solanum tuberosum*. Así mismo se observó que los nueve aislados que crecieron en el medio de cultivo PDA formaron estructuras llamadas macroconidios y en el medio de cultivo SNA se tuvo formación de macroconidios en forma abundante y esporodoquios de color naranja. En el medio de cultivo de Clavel-Agar sólo se desarrolló micelio del hongo, este comportamiento fue en general para los nueve aislados. En cuanto a la forma de los macroconidios estos fueron falcados hialinos con pared delgada y por lo general bastante uniformes en tamaño presentando célula basal papilada y la célula terminal en forma de pie. El promedio del tamaño de los conidios fue 24.8-35.3 μm de largo y 3.67-4.46 μm de ancho, se observaron de tres a cinco septos por conidio (Figura 1), no hubo presencia de microconidios ni formación de clamidosporas, con estas características morfológicas los nueve aislados se identificaron como *Fusarium sambucinum*. Todas las características coincidieron con las descritas por Leslie y Summerell (2006) para *F. sambucinum*. A diferencia de *F. torulosum* y *F. venetatum* que producen clamidosporas, *F. sambucinum* no las produce. En cuanto *F. culmorum* solo se distingue por el marcador molecular con Factor de elongación (EF-1 ∞) que confirmó a *F. sambucinum*.

Las secuencias de los nueve aislados se compararon con las secuencias de las bases de datos del GenBank mostrando un 99 % de identidad con *F. sambucinum* en cadena de la polimerasa con Factor de elongación (EF-1 ∞). Las secuencias consenso se denominó CHF24 y se obtuvo mediante alineación de avance y retroceso de la secuencia, y fue

generally uniform in size, presenting a papillary basal cell in the shape of a foot. The average size of the conidia was 24.8-35.3 μm in length and 3.67-4.46 μm in width; three to five septa were found per conidium (Figure 1), there was no microconidia or formation of chlamydo spores. With these morphological characteristics, the nine isolations were identified as *Fusarium sambucinum*. All characteristics coincided with those described by Leslie and Summerell (2006) for *F. sambucinum*. Unlike *F. torulosum* and *F. venetatum*, which produce chlamydo spores, *F. sambucinum* does not. *F. culmorum* can only be distinguished for the molecular marker with a Factor of elongation (EF-1 ∞) which confirmed *F. sambucinum*.

The sequences of the nine isolations were compared with the sequences from the GenBank database, showing a 99% identity with *F. sambucinum* in chain with the polymerase with a Factor of elongation (EF-1 ∞). The consensus sequence was named CHF24 and it was obtained by aligning the progress and regression of the sequence, and it was deposited in the Gen Bank with accession number (KX632088.1). This confirmed the results of the morphological characterization.

The nine *F. sambucinum* isolations used to inoculate the manzano chilli pepper fruits were 100% pathogenic; in the treatments without lesions, only 20% of the inoculated fruits presented symptoms, whereas the control pepper fruits were asymptomatic. In pepper fruits with lesions, we noticed sunken circular lesions 96 h after inoculation (hai); also, surface mycelia developed at 144 hai and sporulation of conidia 192 hai (Figure 2). The pathogenic fungus was re-isolated from the manzano pepper fruits infected with each isolation of *F. sambucinum*, to confirm Koch's postulates; the same morphological growth characteristics were observed for the fungus, both in the re-isolations and in the original inoculations.

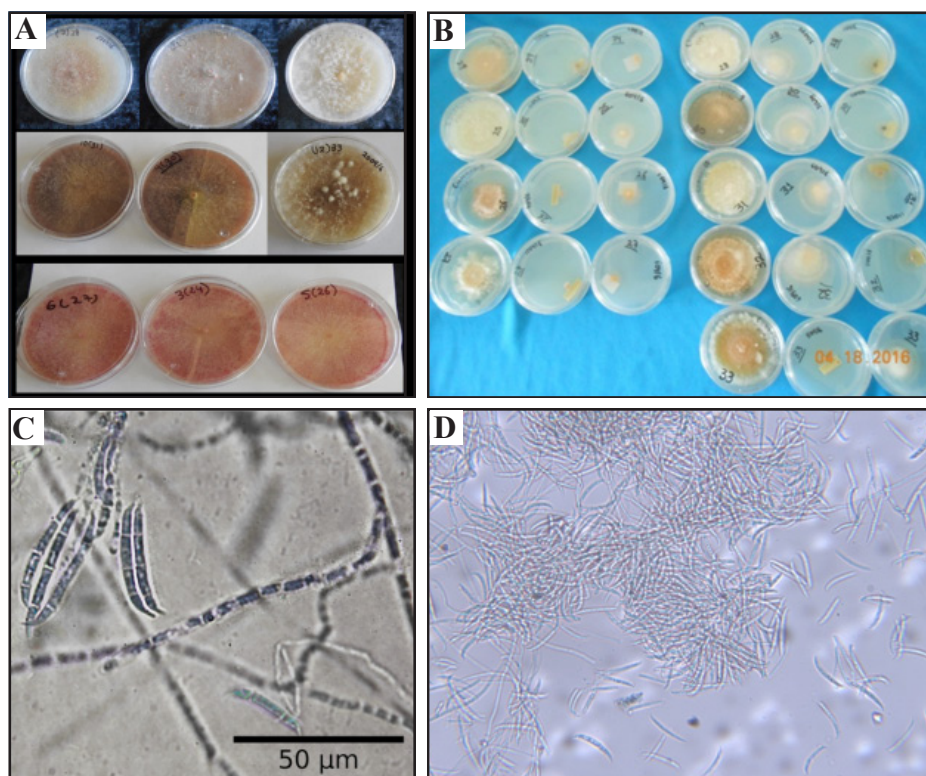


Figura 1. Caracterización cultural y morfológica de *F. sambucinum* (A). Colonias en medio de PDA de ocho días de edad. (B) Macroconidios de siete días de edad producidos en medio PDA 40X. (C) Crecimiento de colonias en medio de cultivo SNA y Clavel-Agar. (D) Esporodochios producidos en medio SNA 10 X.

Figure 1. Cultural and morphological characterization of *F. sambucinum* (A). Cultures in eight-day-old PDA medium. (B) Seven-day-old macroconidia produced in a PDA 40X medium. (C) Culture growth in cultures in SNA and Clavel-Agar culture media. (D) Sporodochia produced in SNA 10 X medium.

depositada en Gen Bank con el número de accesión (KX632088.1). Lo anterior confirmó los resultados de la caracterización morfológica.

Los nueve aislados de *F. sambucinum* que se utilizaron para inocular los frutos de chile manzano con heridas fueron patogénicos en un 100%, en los tratamientos sin herida solo el 20% de los frutos inoculados presentaron síntomas, mientras que los frutos de chile testigos fueron asintomáticos. En frutos de chile con herida, se observaron lesiones circulares hundidas a las 96 h después de la inoculación (hdi), además se desarrolló micelio superficial a las 144 hdi y esporulación de conidios de a las 192 hdi (Figura 2). El hongo fitopatogénico

In the comparison of averages of the treatments with lesions, no significant differences were observed between the diameter of the lesion in the nine isolations evaluated ($p > 0.05$) (Table 1).

This study observed that the nine *F. sambucinum* isolations are pathogenic. Regarding the two inoculation methods with and without lesions, we observed that in the first method 100% of the fruits inoculated displayed symptoms such as circular lesions, sunken with a milky white mycelium and fungal sporulation; meanwhile, in the pepper fruits inoculated without lesions, we observed that only 20% presented the characteristic symptoms mentioned above in manzano peppers. These

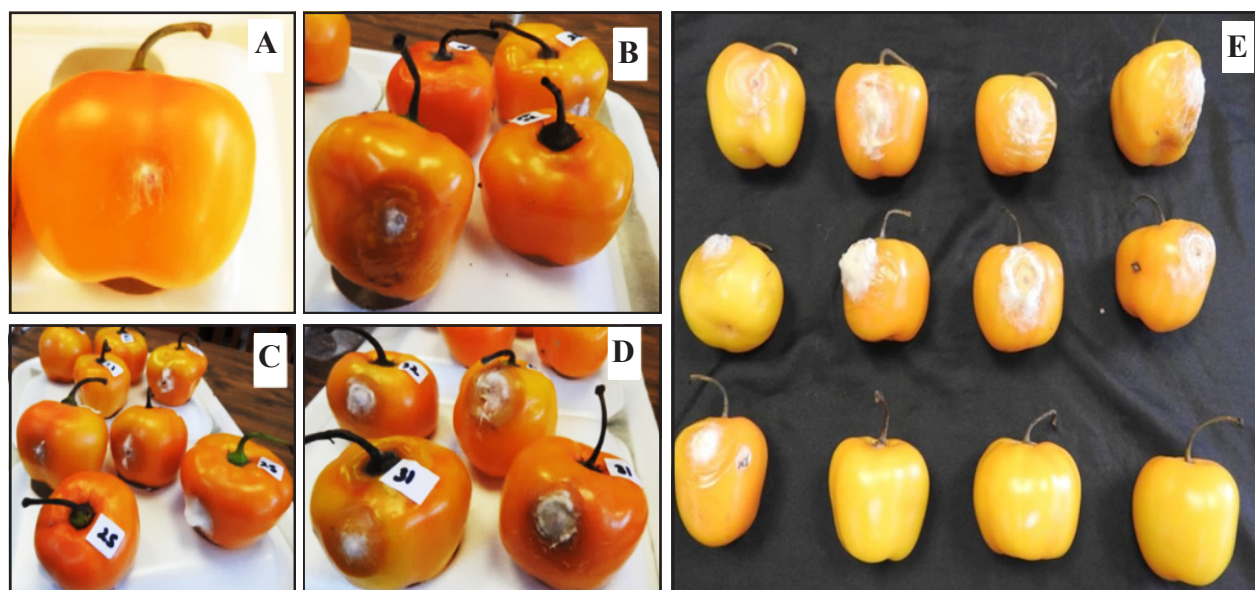


Figura 2. Síntomas de hundimiento observados a las 96 hdi en frutos de chile manzano inoculados con discos de *F. sambucinum* (A). Presencia de micelio blanquecino a las 144 hdi (B y C). Presencia de esporulación de conidios a los 192 hdi estos fueron con herida (D). Micelio y esporulación de *F. sambucinum* en frutos con herida artificial (192 hdi) (E).

Figure 2. Symptoms of sinking observed 96 hai in manzano chili peppers inoculated with *F. sambucinum* discs (A). Presence of cloudy white mycelium at 144 hai (B and C). Presence of sporulation of conidia at 192 hai; these were with lesions (D). Micelia and sporulation of *F. sambucinum* in fruits with artificial lesions (192 hai) (E).

se reaisló a partir de los frutos de chile manzano infectados con cada aislado de *F. sambucinum*, para confirmar los postulados de Koch; se observaron las mismas características morfológicas de crecimiento del hongo tanto en los reaislamientos como en las inoculaciones originales. En la comparación de medias de los tratamientos con herida no se observaron diferencias significativas entre el diámetro de la lesión en los nueve aislados evaluados ($p > 0.05$) (Cuadro 1).

En este estudio se observó que los nueve aislados de *F. sambucinum* resultaron patogénicos. En cuanto a los dos métodos de inoculación con herida y sin herida se observó que en el primer método el 100% de los frutos inoculados presentaron síntomas

Cuadro 1. Diámetro de lesión inducido por de *F. sambucinum* en frutos de chile manzano con heridas artificiales.

Table 1. Diameter of lesion induced by *F. sambucinum* in manzano pepper fruits with artificial lesions.

| Aislados | Diámetro de la lesión (mm) |
|----------|----------------------------|
| FS24 | 18.05a ^z |
| FS25 | 18.85 a |
| FS26 | 16.98 a |
| FS27 | 12.03 a |
| FS28 | 14.96 a |
| FS30 | 14.81 a |
| FS31 | 17.19 a |
| FS32 | 21.07 a |
| FS33 | 14.32 a |

^zValores con la misma letra, dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$) / Values with the same letter within the column are statistically equal (Tukey, $\alpha=0.05$).

como lesiones circulares, hundidas con micelio blanquecino y esporulación del hongo; mientras que, en los frutos de chile inoculados sin herida se observó que solo 20% presentaron los síntomas característicos mencionados con anterioridad en frutos de chile manzano. Estos resultados fueron similares a los reportados por otros autores (Nelson *et al.*, 1981; Secor y Salas, 2001; Peters *et al.*, 2008; Gachango *et al.*, 2012; Baturo-Ciesniewska *et al.*, 2015) quienes encontraron que el patógeno causa podredumbre seca en tubérculos de *Solanum tuberosum* con heridas artificiales.

Además, se observó que los nueve aislados cultivados en PDA formaron tres grupos de color de micelio de los cuales dos grupos coinciden con los reportados por Baturo-Ciesniewska *et al.* (2015) quienes agruparon los aislados en color rosa, salmón y crema brillante. Para este estudio se presentaron colonias con una coloración blanco cremoso, rosa y rojiza marrón.

En cuanto a las características morfológicas se observó que los aislados de *F. sambucinum* cultivados en PDA formaron macroconidios y en SNA formaron abundantes esporodocios y macroconidios con coloración naranja, no hubo presencia de microconidios ni formación de clamidosporas dichas características coinciden con las reportadas por Leslie y Summerell (2006).

Las secuencias obtenidas a partir del DNA de los nueve aislados mostraron similitud del 99% con otras secuencias de *F. sambucinum*, en la base de datos del Gen Bank con número de acceso KP710620 y KP674193 las cuales se reportaron como agente causal de la podredumbre seca en tubérculos de papa (Stefancyk *et al.*, 2016). En esta investigación todos los aislados se identificaron como *F. sambucinum* y una de las secuencias consenso realizadas (número de acceso KX632088.1) se depositó en Gen Bank; sin embargo, es necesario

resultos were similar to those reported by other authors (Nelson *et al.*, 1981; Secor and Salas, 2001; Peters *et al.*, 2008; Gachango *et al.*, 2012; Baturo-Ciesniewska *et al.*, 2015), who found that the pathogen causes dry rotting in *Solanum tuberosum* tubers with artificial lesions.

In addition, we observed that the nine isolations grown in PDA formed three groups of mycelium colors, out of which two groups coincide with those reported by Baturo-Ciesniewska *et al.* (2015), who grouped the isolations into the colors pink, salmon and bright cream. For this study, cultures were presented colored creamy white, pink and reddish maroon.

Regarding morphological characteristics, we observed that the *F. sambucinum* isolations planted in PDA formed macroconidia, and in SNA, they formed abundant sporodochia and orange-colored macroconidia. No microconidia were present, nor were there chlamydospores; these characteristics coincide with those reported by Leslie and Summerell (2006).

The sequences obtained from the DNA of the nine isolations displayed a 99% similarity with other *F. sambucinum* sequences in the Gen Bank database, with accession number KP710620 and KP674193, which were reported as the causal agent of dry rotting in potato tubers (Stefancyk *et al.*, 2016). In this investigation, all isolations were identified as *F. sambucinum* and one of the sequences carried out (accession number KX632088.1) was deposited in the Gen Bank; however, it is necessary to take samples from different areas of the country in which manzano chilli peppers are grown, in order to know the distribution of the pathogen in Mexico.

In conclusion, the results of this work show that morphological identification, molecular characterization and pathogenicity tests on the causal agent of the symptoms of sunken lesions

realizar un muestreo en distintas regiones del país en donde se cultiva chile manzano para conocer la distribución del patógeno en México.

En conclusión se tiene que los resultados del presente trabajo, de muestran que la identificación morfológica, caracterización molecular y pruebas de patogenicidad del agente causal de los síntomas de lesiones hundidas con micelio blanquecino en el fruto de chile manzano es *Fusarium sambucinum* y las heridas favorecen la penetración del patógeno en postcosecha.

Este es el primer estudio que se realiza en México de *Fusarium sambucinum* en frutos de chile manzano en postcosecha.

LITERATURA CITADA

- Agrios N. 2005. Plant Pathology. 5th edn. San Diego, California. USA. Elsevier Academic Press. 922p.
- Altomare CA, Logrieco A, Bottalico GM, Moretti and Evidente A 1995. Production of type A trichothecenes and enniatin B by *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato. Mycopathology 129:177-181 Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF01103344.pdf>
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Baturo-Ciesniewska A, Lenc L, Grabowski A and Lukanowski A. 2015. Characteristics of Polish isolates of *Fusarium sambucinum*: Molecular identification, pathogenicity, diversity and reaction to control agents. American Journal of Potato 92: 49-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-014-9410-z>
- Du M, Ren, X, Sun Q, Wang Y and Zhang R. 2012. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. Potato Research, 55:175-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s11540-012-9217-6>
- El-Banna AA, Scott PM, Lau PY, Sakuma T, Platt HW and Campbell V. 1984. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. Appl. Environ. Microbiol. 47:1169-1171 Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240098/pdf/aem00162-0289.pdf>
- Espinosa-Torres, LE y Villa-Galindo, A. 2008. Regiones productoras de chile manzano. Rev. Ext. Campo. 7-8: 8-12
- Espinosa-Torres LE, y Ramírez-AO. 2016. Rentabilidad de chile manzo (*Capsicum pubescens* R&P) producido en invernadero en Texcoco, Estado de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(2):325-335 Disponible en

and milky white mycelia on the manzano pepper is *Fusarium sambucinum* and the lesions favor the penetration of the pathogen in postharvest.

This is the first study carried out in Mexico on *Fusarium sambucinum* in postharvest manzano chilli peppers.

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

- línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n2/2007-0934-remexca-7-02-00325.pdf>
- Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao J J and Kirk WW. 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. Plant Disease, 96:1767-1774. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0932-RE>
- Hanson LE, Schwager SJ and Loria R. 1996. Sensitivity to thiabendazole in *Fusarium* species associated with dry rot of potato. Phytopathology, 86:378-384. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-86-378>.
- Leslie JF, and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. United States of America; Blackwell Publishing, Oxford, UK. p 388.
- Nelson PE, Toussoun TA, and Cook, RJ. 1981. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy. USA: *The Pennsylvania State University Press*. 474 p.
- O'Donnell K, Kistler CK, Cigelnik E and Ploetz R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Corcordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2044-2049 Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/pdf/pq002044.pdf>
- Pérez-Grajales M, González-Hernández VA, Mendoza-Castillo MC and Peña-Valdivia C 2004. Physiological characterization of Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R and P) Landraces. J. Amer. Soc. Hort. 129(1):88-92 Disponible en línea: <http://journal.ashspublications.org/content/129/1/88.full.pdf+html>
- Peters RD, MacLeod C, Seifert KA, Martin RA, Hale LR, Grau CR, and MacInnis S. 2008. Pathogenicity to potato tubers of *Fusarium* spp. isolated from potato, cereal and forage crops. American Journal of Potato Research, 85(5):367-374. <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-008-9037-z>
- SAS Versión .9.1 for Windows
- Secor GA, and Salas B. 2001. *Fusarium* dry rot and *Fusarium* wilt. In: Stevenson WR, Loria GDF, and Weingartner DP (eds). Compendium of potato diseases, 2<sup>nd</sup> ed., St. Paul, MN, USA: APS Press. 23-25 pp.
- Stefanczyk E, Sobkowiak S, Brylinska M, and Sliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. European Journal Plant Pathol. 145(4): 871-884. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-0875-0>

# The *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* is present in *Citrus* spp in Hidalgo state, Mexico

## El *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* está presente en *Citrus* spp en Hidalgo, México

**Verónica Inés Martínez-Bustamante**, Posgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230 Texcoco, Estado de México; **Camilo Hernández-Juárez**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230. México; **Yuridia Hernández Vázquez**; **José Abel López-Buenfil**, **Edith Blanco-Rodríguez**, SENASICA-SAGARPA. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5, Tecámac, 55740, Estado de México; **Edi Arroyo-Cruz**. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Hidalgo Avenida 2, Manzana F, Lote 11, No. 800, Parque de Poblamiento, 42032 Pachuca de Soto, Hidalgo **Gustavo Mora-Aguilera\***. \*Autor para correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: 04 de Octubre, 2018.

Aceptado: 27 de Diciembre, 2018.

Martínez-Bustamante VI, Hernández-Juárez C, Hernández Vázquez Y, López-Buenfil JA, Blanco-Rodríguez E, Arroyo-Cruz E and Mora-Aguilera G. 2018. The *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* is present in *Citrus* spp in Hidalgo state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 170-184.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1812-3

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

**Resumen.** Este trabajo tuvo la finalidad de investigar la presencia de fitoplasmas asociados a síntomas similares al HLB, enfermedad causada por CLas, con el propósito de optimizar los procesos de muestreo y diagnóstico en el marco de acciones fitosanitarias oficiales en la citricultura Mexicana. A partir de alertas de resultados negativos a CLas en árboles de *Citrus* spp con síntomas putativos de

**Abstract.** This work had the purpose of detecting the presence of phytoplasmas associated to HLB-like symptoms, a disease caused by CLas, to improve the sampling and detection carryout in official phytosanitary actions in the Mexican citriculture. Base on alerts of negative results to CLas in citrus trees with putative symptoms of HLB, directed samplings were conducted in commercial orchards and country backyards in Hidalgo, Colima, Puebla and Veracruz in 2012, 2013 and 2018. The total DNA was analyzed by PCR with the primers P1 / P7 nested with R16F2 / R16R2 and D7f2 / D7r2. CLas infection was assessed with A2 / J5 primers. The presence of the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, member of the 16Sr IX group, associated with *C. latifolia* (NCBI, MK282760) and *C. aurantifolia* (NCBI, MK282761) was confirmed inducing similar but contrasting symptoms to those caused by CLas. These hosts are reported for the first time

HLB se realizaron muestreos dirigidos en huertos comerciales y traspatios en Hidalgo, Colima, Puebla y Veracruz en 2012, 2013 y 2018. El ADN total se analizó por PCR con los iniciadores P1/P7 anidados con R16F2/R16R2 y D7f2/D7r2. La infección de CLas se determinó con los iniciadores A2/J5. Se confirmó en México la presencia del *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, miembro del grupo 16Sr IX, asociado a *C. latifolia* (NCBI, MK282760) y *C. aurantifolia* (NCBI, MK282761) induciendo síntomas similares pero contrastantes a los causados por CLas. Estos hospederos se reportan por primera vez en adición al original reporte en *C. sinensis* en Brasil. También se reporta a *Bidens odorata* y *Cajanus cajan* como probables hospederos arvenses alternos y la presencia de especímenes de *Graphocephala* y *Acinopterus* (Cicadellidae), géneros reconocidos con especies vectoras de fitoplasmas de los grupos 16Sr III-A y *Aster Yellow*, respectivamente.

**Palabras clave:** PCR-anidado, Mollicutes, HLB, vector

Ante el inminente ingreso a territorio mexicano de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), SENASICA desarrolló en 2008 un Plan de Emergencia el cual derivó en una Campaña Contra el HLB de los Cítricos sustentado en la detección en planta y vector del agente bacteriano CLas (SIRVEF, 2018; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Sin embargo, la confiabilidad del diagnóstico molecular debe incluir a CLas y otros organismos capaces de inducir síntomas similares al HLB, consistentes en moteados cloróticos y asimétricos, leve aclaramiento de nervaduras y amarillamiento foliar (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). En Brasil y China en 2008 y 2009, y recientemente en 2018, se reportaron fitoplasmas pertenecientes a los grupos

in addition to the original report on *C. sinensis* in Brazil. *Bidens odorata* and *Cajanus cajan* are also reported as probable alternate weed hosts as well as the presence of specimens of *Graphocephala* and *Acinopterus* (Cicadellidae), genera recognized with vector species of 16Sr III-A and *Aster Yellow* phytoplasma groups, respectively.

**Key words:** Nested-PCR, Mollicutes, HLB, vector

Upon the imminent entry in 2008 of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) in Mexico, SENASICA developed an Emergency Plan that derived in a campaign against HLB on citrus crops, supported by plant and vector detection of the bacterial agent CLas (SIRVEF, 2018; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014). However, the reliability of the molecular diagnosis must include CLas and other organisms capable of inducing symptoms similar to HLB, consisting of chlorotic and asymmetric spots, slight vein whitening and leaf yellowing (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). In Brazil and China in 2008 and 2009, and more recently, in 2018, phytoplasmas belonged to groups 16Sr I and IX were reported in *Citrus sinensis* causing symptoms similar to HLB (Wulff *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2008). Due to the importance of sampling in planning and operation of the campaign against HLB, and to the need for massive and reliable molecular diagnoses, the present investigation had the aim of detecting the occurrence of phytoplasmas in *Citrus* spp using nested PCR and sequencing with the purpose of establishing the potential implication of these organisms in the detection of CLas on different citrus species and identifying alternate hosts and potential vector insects to eventually be integrated onto risk models and control programs.

Base on phytosanitary alerts of the Plant Health Committee of the State of Hidalgo, in which *Citrus*

16Sr I y IX en *Citrus sinensis* causando síntomas similares al HLB (Wulff *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2008). Debido a la importancia del muestreo en la planeación y operación de Campaña Contra el HLB y a la necesidad de diagnósticos moleculares masivos y confiables, el presente trabajo tuvo como objetivo detectar la ocurrencia de fitoplasmas en árboles de *Citrus* spp mediante PCR anidado y secuenciación con el propósito de establecer la potencial implicación de estos organismos en la detección de CLas en diferentes especies cítricas e identificar hospederos alternos y potenciales insectos vectores para su eventual integración en modelos de riesgo y control.

A partir de una alerta fitosanitaria emitida por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Hidalgo, en la cual árboles de *Citrus* spp con síntomas típicos a CLas tuvieron un diagnóstico negativo, en julio 2013 se exploraron 15 huertas familiares y comerciales de los municipios Atlapexco, Huejutla, Orizatlán, Xochiatipan y Jaltocan. Se realizó un muestreo dirigido a 16 árboles de *Citrus sinensis*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* y *C. limetta* con síntomas foliares consistentes en moteados cloróticos asimétricos, aclaramiento de nervaduras y corchosis (Cuadro 1). Se conformó una muestra compuesta por árbol a partir de tejido colectado por cada orientación cardinal y centro del dosel. Por cada orientación se colectó una vareta de 10-15 cm con 2-5 hojas maduras del ciclo vegetativo anterior. Adicionalmente, se colectaron hojas, ramas y tallos de 13 malezas que presentaron síntomas sospechosos a infección por fitoplasmas consistentes en clorosis, acortamiento de entrenudos, proliferación de brotes, filodia y/o virescencia. Las muestras de tejido vegetal se conservaron en hieleras para su traslado a laboratorio donde se mantuvieron a 4 °C por 2-3 días hasta su procesamiento. Los insectos asociados a árboles y malezas muestreadas se colectaron con una red entomológica de golpeo y se

trees with typical CLas symptoms had a negative diagnosis, in July of 2013, 15 country backyards and commercial orchards were explored in the municipalities of Atlapexco, Huejutla, Orizatlán, Xochiatipan and Jaltocan. Samples were taken from 16 *Citrus sinensis*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* and *C. limetta* trees with foliar symptoms consisting of asymmetric chlorotic spots, whitening and corky veins (Table 1). A compound sample was taken for every tree, from tissue collected for each cardinal direction and the center of the canopy. For each direction, a 10-15 cm shoot was selected with 2-5 mature leaves of the previous vegetative cycle. In addition, leaves, branches and stems were collected from 13 weeds with suspected symptoms of infection by phytoplasma consisting of chlorosis, shortening of internodes, proliferation of sprouts, phyllody and/or virescence. The plant tissue samples were stored in ice boxes and taken to the lab, where they were kept at 4 °C for 2-3 days until processing. The insects associated to sampled trees and weeds were collected using a butterfly net and kept in alcohol at 70% for their later identification at UACH and confirmation in the entomology lab of the National Plant Health Reference Center, DGSV. The weed samples that turned out positive for phytoplasmas were taxonomically identified in the herbarium of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Other regions and crops selected by the COLPOS-LANREF research group included *C. aurantifolia* in Armeria, Colima in 2012 with 10 trees; *C. sinensis* and *C. latifolia* in Acateno, Puebla; Papantla, Martínez de la Torre, Tihutlán and Álamo, Veracruz in 2018 with a total of 49 samples obtained from trees with typical HLB symptoms yet negative to CLas (Table 1).

The total DNA extraction was carried out using DNaesy® Plant Mini Kit (Qiagen) from 0.1 g of plant tissue consistent in petioles, central vein and pieces of twig stems with a diameter of 1-0.5 cm.



**Cuadro 1. Especies de cítricos y arvenses positivas a CLas, al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, y a un putativo fitoplasma del *Aster yellow group*. Principal síntoma observado en muestreos dirigidos a huertos comerciales y de traspatio de cuatro entidades federativas de México en 2012, 2013 y 2018.**

**Table 1. Species of citrus plants and weeds positive to CLAs, the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, and to a putative phytoplasma of the *Aster yellow group*. Main symptom observed in samples from commercial orchards and country backyards in four Mexican states in 2012, 2013 and 2018.**

| Estado   | Especie Botánica           | Muestras Positivas | Principal Síntoma       | <sup>x</sup> BHDA phytoplasma | <sup>y</sup> AY phytoplasma | <sup>z</sup> HLB |
|----------|----------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Hidalgo  | <i>Citrus latifolia</i>    | 1/6                | Aclaramiento nervaduras | +                             | -                           | 0/6              |
|          | <i>C. aurantifolia</i>     | 1/3                | Moteados                | +                             | -                           | 0/3              |
|          | <i>C. limetta</i>          | 0/5                | Variegado               | -                             | -                           | 0/5              |
|          | <i>C. sinensis</i>         | 0/2                | Clorosis                | -                             | -                           | 0/2              |
|          | <i>Bidens odorata</i>      | 1/1                | Filodia                 | +                             | -                           | 0/1              |
|          | <i>Cajanus cajan</i>       | 1/1                | Escoba de bruja         | +                             | -                           | 0/1              |
|          | <i>Catharanthus roseus</i> | 2/2                | Filodia y virescencia   | -                             | +                           | NA               |
|          | <i>Commelina difusa</i>    | 0/1                | Clorosis                | -                             | -                           | NA               |
|          | <i>Cuscuta</i> sp          | 0/1                | Clorosis                | -                             | -                           | NA               |
|          | <i>Murraya paniculata</i>  | 0/1                | Clorosis                | -                             | -                           | 0/1              |
|          | Otras especies             | 0/6                | Clorosis                | -                             | -                           | NA               |
| Colima   | <i>C. aurantifolia</i>     | 7/10               | Moteado                 | -                             | -                           | 7/10             |
| Puebla   | <i>C. paradisi</i>         | 1/1                | Moteado                 | -                             | -                           | 1/1              |
| Veracruz | <i>C. sinensis</i>         | 0/17               | Moteado                 | -                             | -                           | 0/17             |
|          | <i>C. reticulata</i>       | 0/12               | Moteado                 | -                             | -                           | 0/12             |
|          | <i>C. latifolia</i>        | 0/9                | Moteado                 | -                             | -                           | 0/9              |

<sup>x</sup> *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 / *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, primers P1/P7 and D7f2/D7r2

<sup>y</sup> Putativo fitoplasma perteneciente al *Aster yellow group*, iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 / Putative phytoplasma belonging to the *Aster yellow group*, primers P1/P7 and R16F2/R16R2

<sup>z</sup> *Candidatus Liberibacter asiaticus*, iniciadores A2/J5 / *Candidatus Liberibacter asiaticus*, primers A2/J5.

conservaron en alcohol al 70% para su posterior identificación en la UACH y posterior confirmación en el laboratorio de entomología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, DGSV. Las muestras de malezas positivas a fitoplasmas se identificaron taxonómicamente en el herbario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Otras regiones y cultivos que se seleccionaron por el grupo de investigación COLPOS-LANREF incluyeron *C. aurantifolia* en Armeria, Colima en 2012 con 10 árboles; *C. sinensis* y *C. latifolia* en Acateno, Puebla; Papantla, Martínez de la Torre, Tihutlán y Álamo, Veracruz en 2018 con un total de 49 muestras obtenidas de árboles con síntomas típicos de HLB pero con antecedentes de resultados negativos a CLAs (Cuadro 1).

Phytoplasma was detected using nested PCR with primers related to the gene 16S of the rRNA (Ahrens & Semüller, 1992). The first PCR reaction required the use of universal primers P1/P7 (Berges *et al.*, 2000; Ahrens & Semüller, 1992). The second PCR was carried out independently with two pairs of primers: R16F2/R16R2, universal to phytoplasmas (Lee *et al.*, 1993), and with D7f2/D7r2 specific to the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-Phytoplasma) (Teixeira *et al.*, 2008). For the first PCR, the reaction volume consisted in 25 µL composed of: 1X GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer, 2 units of DNA *Taq* polymerase (Promega) and 2 µL of total DNA. The thermal program consisted in the denaturalization for 4 min

La extracción de ADN total se realizó con DNAesy® Plant Mini Kit (Qiagen) a partir de 0.1 gr de tejido vegetal consistente en peciolas, nervaduras centrales y trozos de tallos de ramillas de 1-0.5 cm diámetro. La detección de fitoplasmas se realizó mediante PCR anidado con iniciadores asociados al gen 16S del rRNA (Ahrens & Semüller, 1992). Para la primera reacción de PCR se emplearon los iniciadores universales P1/P7 (Berges *et al.*, 2000; Ahrens & Semüller, 1992). La segunda reacción PCR se realizó en forma independiente con dos pares de iniciadores: R16F2/R16R2, universales a fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993), y con D7f2/D7r2 específicos al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (BHDA-Phytoplasma)* (Teixeira *et al.*, 2008). Para la primera PCR, el volumen de reacción consistió en 25 µL constituido por: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de DNA *Taq* polimerasa (Promega) y 2 µL de ADN total. El programa térmico consistió en desnaturalización por 4 min a 94 °C continuado con 35 ciclos a 92 °C por 45 s, 58 °C por 45 s y 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min. Para la segunda PCR, la reacción se realizó con 25 µL totales que incluyeron: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de DNA *Taq* polimerasa (Promega) y 5 µL producto del primer PCR diluido 1:10. El programa térmico para la reacción con los iniciadores R16F2/R16R2 consistió en desnaturalización a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos: 94 °C por 30 s, 53 °C por 50 s, 72 °C por 80 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Para la reacción con los iniciadores D7f2/D7r2 se realizó desnaturalización a 94 °C por 3 min y 40 ciclos a 92 °C por 45 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Las muestras de cítricos también fueron analizadas mediante PCR para la detección de *CLAs*,

at 94 °C, followed by 35 cycles at 92 °C for 45 s, 58 °C for 45 s and 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min. For the second PCR, the reaction was carried out with 25 µL in total, which included: 1X GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer, 2 units of DNA *Taq* polymerase (Promega) and 5 µL produced by the first PCR diluted 1:10. The thermal program for the reaction with primers R16F2/R16R2 consisted in the denaturalization at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles: 94 °C for 30 s, 53 °C for 50 s, 72 °C for 80 s and a final extension at 72 °C for 10 min. For the reaction with primers D7f2/D7r2, a denaturalization was carried out at 94 °C for 3 min and 40 cycles at 92 °C for 45 s, 62 °C for 45 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min.

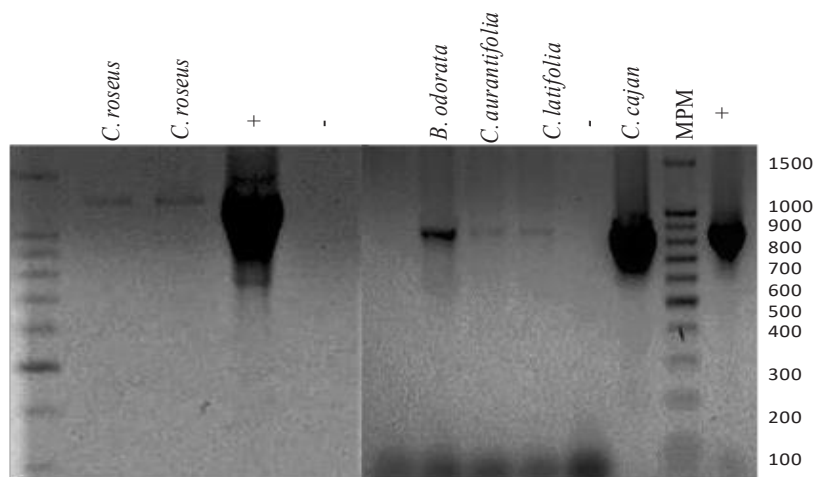
The citrus samples were also analyzed using PCR to detect *CLAs*, using primers A2/J5. The reaction volume consisted of 25 µL: 1X of GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer and 2 units of DNA *Taq* polymerase. The thermal program consisted in the denaturalization at 94 °C for 4 min followed by 35 cycles at 92 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min. In all cases, the amplified fragments were analyzed by electrophoresis using agarose gel at 1.5% and viewed with a UV light transilluminator after staining with ethidium bromide. Amplicons that were positive for phytoplasmas were sequenced in the molecular biology laboratory of the National Plant Health Reference Center (DGSV, CNRF). The partial sequences of the gene 16S rRNA obtained with primers D7f2/ D7r2 were aligned with those reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and accessions were registered in that system. A phylogenetic analysis was carried out with the sequences found in *C. latifolia* and *C. aurantifolia* and those reported by other researchers

utilizando los iniciadores A2/J5. El volumen de reacción consistió en 25 µL: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer y 2 unidades de DNA Taq polimerasa. El programa térmico consistió en desnaturalización a 94 °C por 4 min seguida de 35 ciclos a 92 °C por 45 s, 58 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min. En todos los casos, los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1.5% y visualizados con un transiluminador de luz UV previo teñido con bromuro de etidio. Amplicones positivos a fitoplasmas fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV, CNRF). Las secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas con los iniciadores D7f2/ D7r2 se alinearon con las reportadas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se registraron en dicho sistema. Se realizó un análisis filogenético con las secuencias encontradas en *C. latifolia* y *C. aurantifolia* y las reportadas por otros investigadores (Wulff *et al.*, 2018; Arratia *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2009). Previamente se empleó *Seq Scanner* v2 para depurar las secuencias, seguido de *BioEdit* para editar la alineación y obtener las secuencias consenso en formato FASTA. Finalmente se utilizó *MEGA* v7 para generar el árbol filogenético.

Únicamente muestras de cítricos y arvenses de Hidalgo fueron positivas a fitoplasmas pero no a CLas. El PCR anidado con los iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 amplificaron un fragmento de 857 pb correspondiente al *BHDA-Phytoplasma*, perteneciente al *Pigeon pea witches'-broom phytoplasma* grupo 16Sr IX (99% homología). Las muestras positivas fueron de *C. latifolia* (1/6), *C. aurantifolia* (1/3) y de arvenses identificadas como *Bidens odorata* y *Cajanus cajan* (2/13), aunque con homologías entre 80 y 89% (Cuadro 1, Figura 1). Las secuencias obtenidas de *C. latifolia* y *C. aurantifolia*

(Wulff *et al.*, 2018; Arratia *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2009). *Seq Scanner* v2 was previously used to purify the sequenced, followed by *BioEdit* to edit the alignment and obtain the consensus sequences in a FASTA format. Finally, *MEGA* v7 was used to generate the phylogenetic tree.

Only citrus and weed samples from Hidalgo were positive for phytoplasmas, but not for CLas. The nested PCR with the primers P1/P7 and D7f2/ D7r2 amplified a fragment of 857, corresponding to *BHDA-Phytoplasma*, belonging to the Pigeon pea witches'-broom phytoplasma group 16Sr IX (99% homology). The positive samples were from *C. latifolia* (1/6), *C. aurantifolia* (1/3) and weeds identified as *Bidens odorata* and *Cajanus cajan* (2/13), although they had homologies between 80 and 89% (Table 1, Figure 1). The sequences obtained from *C. latifolia* and *C. aurantifolia* were registered in the NCBI with accession numbers MK282760 and MK282761, respectively. Using primers P1/P7 and R16F2/R16R2, a fragment of 1200 pb was amplified in 2 samples of *Catharanthus roseus*, possibly belonging to a phytoplasma of *Aster Yellow* group (Torres *et al.*, 2004). In samples from other states, CLas was found, but no phytoplasmas. Of *C. aurantifolia* samples from Colima, 70% (7/10) were positive for CLas, whereas in the Acateno-Álamo citrus corridor, only 1/39 was positive, despite the citrus fruits presented symptoms of spotted chlorosis, similar to that caused by the bacteria (Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). These results indicate the restricted presence of *BHDA-Phytoplasma*, and possibly, of the group *Aster Yellow* in weeds (Torres *et al.*, 2004), although not related in mixed infections with CLas. On the other hand, in Sinaloa, Nayarit and Colima, Arratia and collaborators (2015) found *Candidatus Phytoplasma asteris*, a new taxon included in group 16SrI (Lee *et al.*, 2004), causing similar symptoms to HLB in *C.*



**Figura 1.** Visualización en gel de agarosa de fragmentos ADN amplificados mediante PCR anidado a partir de muestras vegetales provenientes de Hidalgo, México. Fragmentos de 1200 pb obtenidos con iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 de muestras de *Catharanthus roseus*. Fragmentos de 857 pb obtenidos con iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 de muestras de *Citrus aurantifolia* y *C. latifolia*, *Bidens odorata* y *Cajanus cajan*. Marcador peso molecular (MPM-100 Pb), (+) Testigo positivo y (-) Testigo negativo.

**Figure 1.** Visualization in agarose gel of DNA fragments amplified using nested PCR from tissue samples from Hidalgo, Mexico. Fragments of 1200 pb obtained using primers P1/P7 and R16F2/R16R2 of samples of *Catharanthus roseus*. Fragments of 857 pb obtained with primers P1/P7 and D7f2/D7r2 of samples of *Citrus aurantifolia* and *C. latifolia*, *Bidens odorata* and *Cajanus cajan*. Molecular weight marker (MWM-100 Pb), (+) Positive control and (-) Negative control.

fueron registradas en NCBI con los números de accesión MK282760 y MK282761, respectivamente. Con los iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 se amplificó un fragmento de 1200 pb en 2 muestras de *Catharanthus roseus* posiblemente perteneciente a un fitoplasma del grupo *Aster Yellow* (Torres *et al.*, 2004). En las muestras de los otros estados se detectó a CLas pero no fitoplasmas. El 70% muestras de *C. aurantifolia* provenientes de Colima (7/10) resultaron positivas a CLas, mientras que en el corredor cítrico Acateno-Álamo, solo 1/39 resultó positiva a pesar de que los cítricos mostraron sintomatología de clorosis moteada similar a la causada por la bacteria (Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). Estos resultados indican la presencia restringida del *BHDA-Phytoplasma*, y posiblemente del un miembro del grupo *Aster Yellow* en malezas (Torres *et al.*, 2004), pero no asociado en infecciones mixtas con CLas. Complementariamente, Arratia

*aurantifolia*, *C. latifolia* and *C. sinensis* trees in independent infections, or mixed with CLas (20/86 samples). Although no weeds or potential vector insects were included in that investigation, the frequency of this phytoplasma, the citrus host range, and the presence of mixed infections in the Pacific coast suggests the need to include this pathogen in future epidemiological studies, considering that group 16SrI is one of the most prevalent with over 100 hosts of worldwide economic importance (Lee *et al.*, 2004).

The leaves symptoms in *C. latifolia* consisted of vein yellowing and thickening, angular chlorotic spots, diffuse mottling spots. An irregular chlorotic spotting was observed in *C. aurantifolia* along with a moderate thickening of nervations (Figure 2). In Brazil, the symptoms caused by *BHDA-Phytoplasma* in *C. sinensis* were indistinguishable from CLas (Teixeira *et al.*, 2009); meanwhile, in

y colaboradores (2015) detectaron en Sinaloa, Nayarit y Colima a *Candidatus Phytoplasma asteris*, un novel taxón incluido en el grupo 16SrI (Lee *et al.*, 2004), causando síntomas similares al HLB en árboles de *C. aurantifolia*, *C. latifolia* y *C. sinensis* en infecciones independientes o mixtas con CLas (20/86 muestras). Aunque no se incluyeron arvences o potenciales insectos vectores en ese trabajo, la frecuencia de este fitoplasma, la diversidad de cítricos infectados y la presencia de infecciones mixtas en la vertiente del Pacífico sugiere la necesidad de incluir este patógeno en estudios epidemiológicos considerando que el grupo 16SrI es uno de los más prevalentes al infectar a más de 100 hospedantes de importancia económica a nivel mundial (Lee *et al.*, 2004).

Los síntomas foliares en *C. latifolia* se caracterizaron por un amarillamiento y engrosamiento de nervaduras, manchas cloróticas angulares, moteados difusos y acorchamiento. En *C. aurantifolia* se observó un moteado clorótico irregular y moderado engrosamiento de nervaduras (Figura 2). En Brasil, los síntomas causados por *BHDA-Phytoplasma* en *C. sinensis* son indistinguibles a los CLas (Teixeira *et al.*, 2009); mientras que en México, los síntomas inducidos por este fitoplasma en cítricos agrios no corresponden a los reportados para HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2010). *B. odorata* exhibió filodia, coloraciones rojizas, reducción de área foliar, acortamiento de entrenudos, proliferación y achaparramiento de planta (Figura 3). En general, estos síntomas han sido ampliamente asociados a infección por fitoplasmas (Bertaccini y Duduk, 2009). Esta arvense, la cual concurrió en el huerto con un árbol positivo de *C. latifolia*, tuvo una predominancia del 80% indicativo de su potencial como reservorio de inóculo. La muestra positiva de *C. cajan* se encontró en un huerto de traspatio de *Citrus limetta*. El síntoma de escoba de bruja consistente en proliferación de brotes, acortamiento

Mexico, the symptoms induced by this phytoplasma in sour citrus are similar but not the same as those reported for HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2010). *B. odorata* displayed phyllody, reddish colors, the reduction of foliar areas, shortening of internodes, proliferation and plant shortening (Figure 3). In general, these symptoms have been widely related to infections by phytoplasmas (Bertaccini and Duduk, 2009). This weed, which appeared in the same orchard where a *C. latifolia* tree tested positive, had a 80% predominance indicating its potential as inoculum reservoir. The positive sample of *C. cajan* was found in a country backyard of *Citrus limetta*. The witches'-broom symptom, which consists in the proliferation of sprouts, internodes shortening, a general growth reduction and leaves chlorosis were observed in 50% of the plant's canopy (Figure 3). Similar symptoms caused by the same phytoplasma have been reported in Brazil for *Crotalaria juncea*, a fabaceae weed associated to citrus (Marques *et al.*, 2010). This is the first report of *B. odorata* and *C. cajan* as alternate hosts of the *BHDA-Phytoplasma* in Mexico.

Of the total insects collected on citrus orchards in Hidalgo, 77 specimens were identified, belonging to the families Cicadellidae, Membracidae and Liviidae, with the potential to transmit mollicutes and bacteria (Weintraub and Beanland, 2006). Six species belonged to the Cicadellidae family (Young, 1977; Medler, 1960; Beamer, R.H., 1944): *Chlorogonia coeruleovittata* (7/61), *Apogonia stali* (4/61), *Graphocephala* sp (7/61), *Tylozygus fasciatus* (8/61), *Agrosoma sykalis* (9/61), *Acinopterus* sp (5/61). Only one colony was found (20/61) with immature and adult states of *Membrasis mexicana* (Membracidae) in *C. cajan*. Out of the *D. citri* (Liviidae), Clas vector, 17/77 specimens were collected (Figure 4). Out of these species, members of the genera *Graphocephala* and



**Figura 2.** Síntomas de muestras positivas al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*. A-D: Síntomas foliares en *Citrus latifolia* consistente en amarillamiento y engrosamiento de nervaduras, manchas cloróticas angulares, moteados difusos y acorchamiento de nervaduras. E y F: Síntomas en *C. aurantifolia* caracterizados por moteados cloróticos irregulares.  
**Figure 2.** Symptoms of positive samples to the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*. A-D: Leaves symptomatic in *Citrus latifolia* consisting in yellowing and vein thickening, angular chlorotic spots, diffuse mottling spots and corky veins. E and F: Symptoms in *C. aurantifolia* characterized by irregular chlorotic spots.

de entrenudos, reducción general de crecimiento y clorosis foliar apical se mostraron en 50% del dosel planta (Figura 3). Síntomas similares causados por el mismo fitoplasma se han reportado en Brasil para *Crotalaria juncea*, una arvense de la familia fabaceae asociados con cítricos (Marques *et al.*, 2010). Este es el primer reporte de *B. odorata* y *C. cajan* como hospedantes alternos del *BHDA-Phytoplasma* en México.

Del total de insectos colectados en huertos cítricos de Hidalgo se identificaron 77 ejemplares,

*Acinopterus* have been reported as potential vectors of phytoplasmas of 16Sr III-A and *Aster Yellow* groups, respectively (Weintraub and Beanland, 2006). In the future, it will be important to identify at species level the specimens of these genera found in this investigation, as well as the revision of other reports of leafhoppers related to citrus in Mexico. For example, Blanco (2014), reported 21 species in the Yucatan Peninsula, though none were reported with the ability to transmit phytoplasmas (Weintraub and Beanland, 2006).



Figura 3. A-C: Síntomas en *Cajanus cajan* positiva al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-phytoplasma); (A) Clorosis en ápices foliares, (B) Proliferación tipo fasciación en tallos, (C) *Membrasis mexicana* (Membracidae) en proliferación de tallos. E-G: Síntomas en *Bidens odorata* positiva a BHDA-phytoplasma; (E y F) Filodia en inflorescencias, (G) coloración rojizas en hojas. I-K: Síntomas en *Catharathus roseus* putativo a un fitoplasma del *Aster yellow group*; (I) Filodia floral, (J y K) Virescencia de flores. D-L: Síntomas de escoba de bruja en *C. cajan* (D), *B. odorata* (H) y *C. roseus* (L).

Figure 3. A-C: Symptoms in *Cajanus cajan* positive for *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-phytoplasma); (A) Leaf tips chlorosis, (B) Proliferation of stem fasciation. (C) *Membrasis mexicana* (Membracidae) in proliferation of stems. E-G: Symptoms on *Bidens odorata* positive for BHDA-phytoplasma; (E and F) Inflorescence phyllody, (G) Reddish of leaves. I-K: Symptoms in *Catharathus roseus* putative to a phytoplasma of the *Aster yellow group*; (I) Flower phyllody, (J and K) Flowers virescence. D-L: Symptoms of witches' broom in *C. cajan* (D), *B. odorata* (H) and *C. roseus* (L).

pertenecientes a las familias Cicadellidae, Membracidae y Liviidae, con potencial de transmitir mollicutes y bacterias (Weintraub y Beanland, 2006). Seis especies correspondieron a la familia Cicadellidae (Young, 1977; Medler, 1960; Beamer, R.H., 1944): *Chlorogonalia coeruleovittata* (7/61), *Apogonalia stali* (4/61), *Graphocephala* sp (7/61), *Tylozygus fasciatus* (8/61), *Agrosoma sykalis* (9/61), *Acinopterus* sp (5/61). Únicamente se encontró una colonia (20/61) con estados inmaduros y adultos de *Membrasis mexicana* (Membracidae) en *C.cajan*. De *D. citri* (Liviidae), vector de CLas, se colectaron 17/77 ejemplares (Figura 4). De estas especies, se han reportado miembros de los géneros *Graphocephala* y *Acinopterus* como potenciales vectores de fitoplasmas de los grupos 16Sr III-A y *Aster Yellow*, respectivamente (Weintraub y Beanland, 2006). En el futuro, es importante la caracterización a nivel de especie de los ejemplares de esos géneros encontrados en este trabajo y la revisión de otros reportes de cicadélidos asociados a cítricos en México. Por ejemplo, Blanco (2014), reportó 21 especies en la Península de Yucatán pero ninguna enlistada con capacidad de transmitir fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006).

El análisis filogenético de secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas en este trabajo y las publicadas para fitoplasmas que inducen síntomas similares o indistinguibles a los causados por CLas en cítricos muestra una clara discriminación genética entre grupos y posibles subgrupos (Figura 5).

El grupo 16Sr IX *Pigeon pea witches-broom phytoplasma* es aparentemente el más homogéneo e incluye las muestras de este trabajo y Brasil (Teixeira *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2008). Por otra parte, el grupo 16Sr I *Aster Yellow Phytoplasma* (AY180957), definió tres subgrupos con secuencias de Sinaloa, Colima y Nayarit (AB858474.1, AB858473.1 y AB858472.1, respectivamente) reportadas como miembros del novel taxón

The phylogenetic analysis of partial sequences of the 16S rRNA gene obtained in this investigation and those published for phytoplasmas that induce similar or indistinguishable symptoms from those caused by CLas on citrus shows a clear genetic discrimination between groups and possible subgroups (Figure 5).

The group 16Sr IX *Pigeon pea witches-broom phytoplasma* seems to be the most homogenous and it includes the samples from this investigation and from Brazil (Teixeira *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2008). On the other hand, the group 16Sr I *Aster Yellow Phytoplasma* (AY180957), defined three subgroups with sequences from Sinaloa, Colima and Nayarit (AB858474.1, AB858473.1 and AB858472.1, respectively) reported as member of the new taxon *Candidatus phytoplasma asteri* subgroup S (Sinaloa and Colima) and B (Nayarit) (Arratia *et al.*, 2015), as well as a sequence of *C. sinensis* from China (Chen *et al.*, 2009) with a similar distance to the *Aster Yellow*-type sequence. Although the group related to the 16Sr III *X-Disease* is preliminary because the sequences of the phytoplasma recently reported in Brazil are not yet published in NCBI (Wulff *et al.*, 2018), the use of sequences referred to in that publication help establish that it is relatively closer to group 16Sr IX.

These results demonstrate the presence of the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (BHDA-Phytoplasma)*, which belongs to group 16Sr IX, related to *C. latifolia* and *C. aurantifolia* in Mexico inducing similar symptoms, no different to those caused by CLas. These hosts are reported for the first time in addition to their original report in *C. sinensis* in Brazil (Teixeira *et al.*, 2009). On the other hand *B. odorata* and *C. cajan* are reported as possible alternate hosts of the *BHDA-Phytoplasma* in Mexico. This phytoplasma is added to that reported by Arratia *et al.*, 2015 for



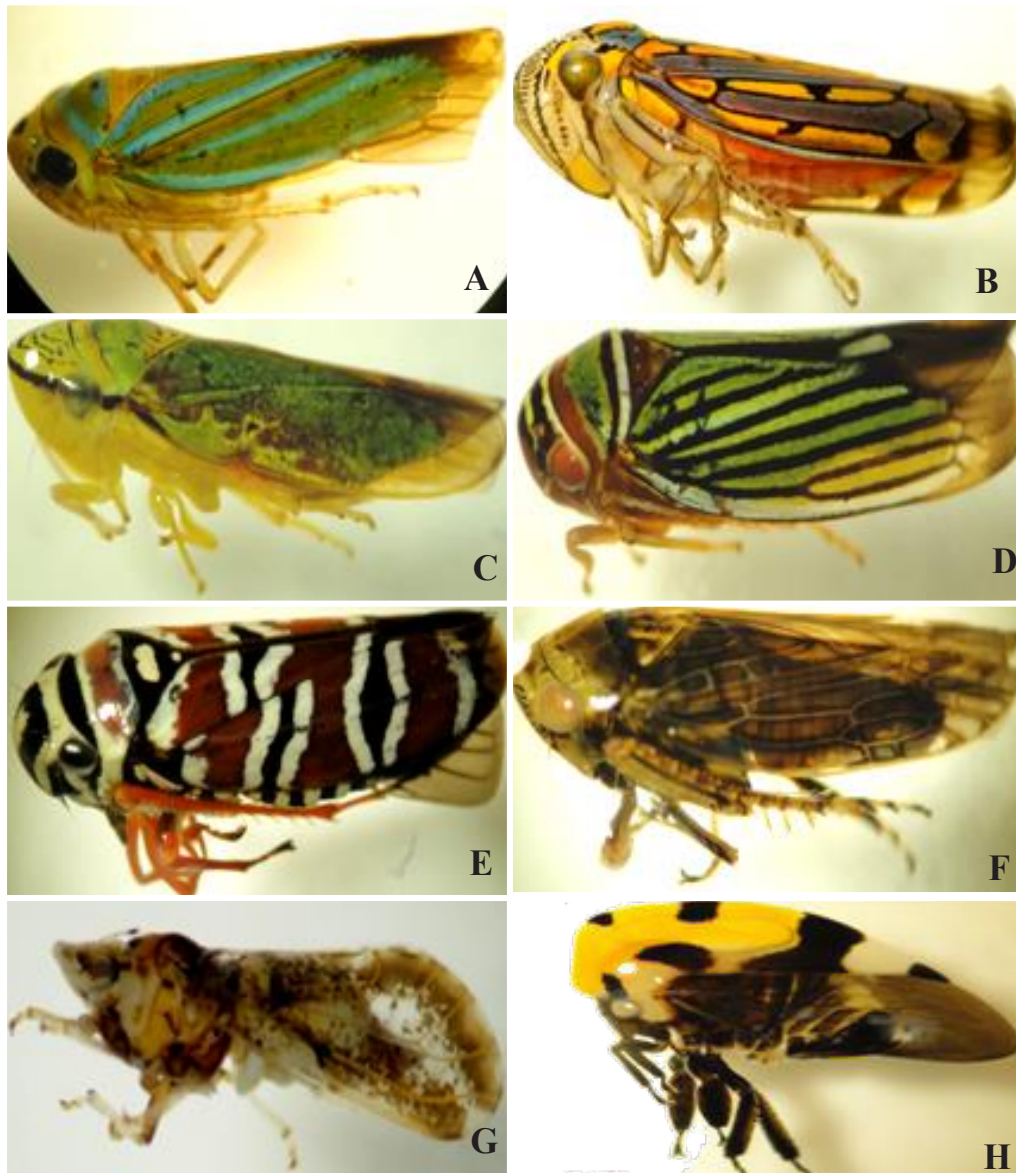


Figura 4. Insectos colectados en huertos con árboles cítricos o arvenses positivos al Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma y a un putativo fitoplasma del *Aster yellow group*. Cicadellidae: (A) *Chlorogonalia coeruleovittata*, (B) *Apogonalia stali*, (C) *Graphocephala* sp, (D) *Tylozygus fasciatus*, (E) *Agrosoma syklis*, (F) *Acinopterus* sp.; Liviidae: (G) *Diaphorina citri*; Membracidae: (H) *Membrasis mexicana*.

Figure 4. Insects collected in orchards with citrus trees or weeds positive to the Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma and to a putative phytoplasma of the *Aster yellow group*. Cicadellidae: (A) *Chlorogonalia coeruleovittata*, (B) *Apogonalia stali*, (C) *Graphocephala* sp, (D) *Tylozygus fasciatus*, (E) *Agrosoma syklis*, (F) *Acinopterus* sp.; Liviidae: (G) *Diaphorina citri*; Membracidae: (H) *Membrasis mexicana*.

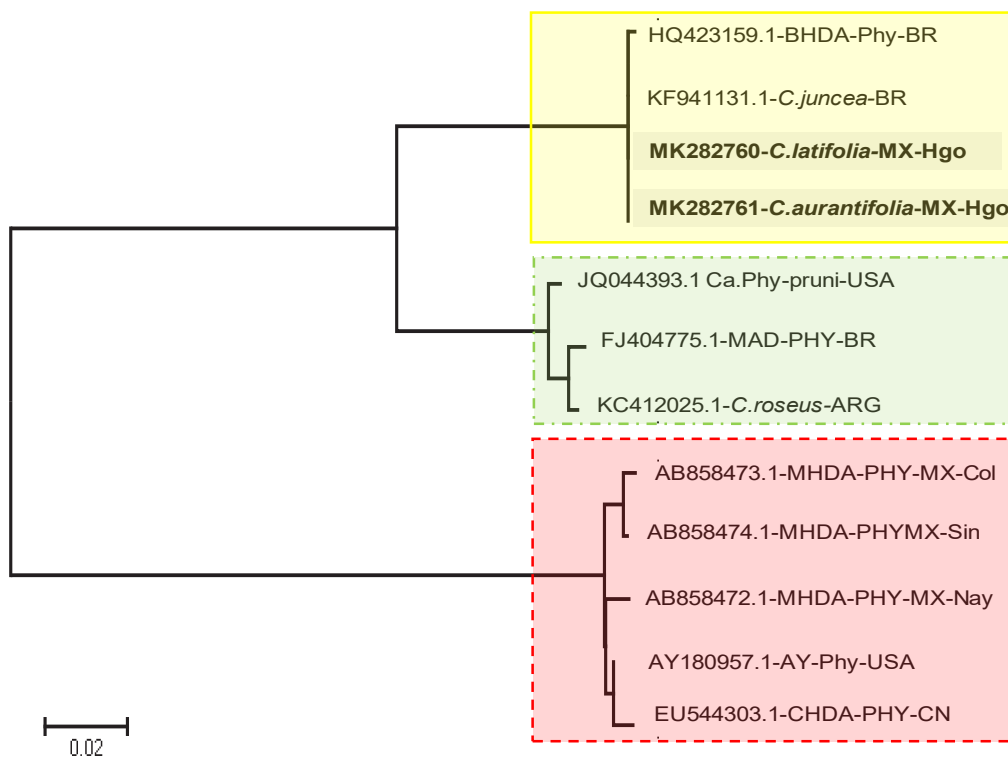


Figura 5. Árbol filogenético reconstruido con el método *Maximum likelihood* con base en el modelo de sustitución de nucleótidos *General Time Reversible (GTR+I)* con 500 *bootstrap*. Tres ramas principales se conforman diferencialmente: 1). 16Sr IX con muestras de *C.sinensis* y *Crotalaria juncea* de Brasil, y *C. latifolia* y *C. aurantifolia* de Hidalgo, México encontradas en este trabajo (recuadro amarillo y línea sólida). 2). 16Sr III con el reciente reporte de Brasil en *C. sinensis* (recuadro verde y línea punteada-guion), y 3). 16Sr I conformado con muestras de *Citrus* spp reportadas por Arratia et al., 2015 (recuadro rojo y línea en guiones).

Figure 5. Phylogenetic tree constructed using the *Maximum likelihood* method, based on the *General Time Reversible* nucleotide substitution model (GTR+I) with 500 *bootstraps*. Three main branches are made up differentially: 1). 16Sr IX with samples of *C.sinensis* and *Crotalaria juncea* from Brazil, and *C. latifolia* and *C. aurantifolia* from Hidalgo, Mexico found in this investigation (yellow box and solid line). 2). 16Sr III with the recent report from Brazil in *C. sinensis* (green box and dotted line), and 3). 16Sr I made up of *Citrus* spp samples reported by Arratia et al., 2015 (red box and dotted line).

*Candidatus phytoplasma asteri* subgrupo S (Sinaloa y Colima) y B (Nayarit) (Arratia et al., 2015), así como una secuencia de *C. sinensis* procedente de China (Chen et al., 2009) con similar distancia a la secuencia tipo *Aster Yellow*. Aunque la agrupación asociada al 16Sr III *X-Disease* es preliminar debido a que las secuencias del fitoplasma recientemente reportado en Brasil aún no están publicadas en NCBI (Wulff et al., 2018), el empleo de secuencias referidas en dicha publicación permiten esta-

the Mexican Pacific region belonging to the taxon *Candidatus phytoplasma asteri* of the 16Sr I group. The presence of these phytoplasmas indicate the need to develop robust diagnosis systems for CLAs, the pathogen with the seemingly highest parasitic and epidemiological aptitude, but which can develop symptoms that can be mistaken for at least three types of phytoplasmas (members of 16SrI, 16SrIII and 16Sr IX). Epidemiological studies, including the role of potentially alternate

blecer que es un grupo relativamente más próximo al grupo 16Sr IX.

Estos resultados demuestran la presencia del *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (BHDA-Phytoplasma)*, miembro del grupo 16Sr IX, asociado a *C. latifolia* y *C. aurantifolia* en México induciendo síntomas similares, no indistintos a los causador por CLas. Estos hospederos se reportan por primera vez en adición su original reporte en *C. sinensis* en Brasil (Teixeira *et al.*, 2008). Por otra, parte se reporta a *B. odorata* y *C. cajan* como probables hospederos alternos del *BHDA-Phytoplasma* en México. Este fitoplasma se suma al reportado por Arratia *et al.*, 2015 para la región del Pacífico mexicano perteneciente al taxón *Candidatus phytoplasma asteri* del grupo 16Sr I. La presencia de estos fitoplasmas indican la necesidad de desarrollar sistemas de diagnóstico robustos para CLas, patógeno con aparente mayor aptitud parasítica y epidemiológica, pero que puede desarrollar síntomas confundibles con al menos tres tipos de fitoplasmas (miembros de 16SrI, 16SrIII y 16Sr IX). Estudios epidemiológicos, incluyendo el rol de potenciales vectores y hospederos alternos, requieren ejecutarse en México para establecer los factores de riesgo e implicaciones simbióticas entre organismos parasíticos del bioma de los cítricos con el fin de un efectivo manejo fitosanitario.

## LITERATURA CITADA

- Ahrens U and Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08\\_828.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.PDF)
- Arratia CA, Santos CA, Fernández HM, Chávez ME, Flores ZJL, Camacho BG, Méndez LE, Leyva LJ. 2015. 'Candidatus Phytoplasma asteris' is associated with citrus "huanglongbing" disease in Mexico. *Phytopathogenic Mollicutes* <http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00039.0>.
- Beamer RH. 1944. A new species of *Acinopterus* from California (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Kansas Entomology Society* 17: 21-22. <http://direct.biostor.org/issn/0022-8567>
- Berges R, Rott M, and Seemüller E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90:1145-1152. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1145>
- Bertaccini, A. and Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-378. DOI: [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-3300](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300)
- Blanco RE. 2014. Cicadélidos (Hemiptera:Cicadellidae) Asociados a Cítricos en la Península de Yucatán. Tesis MC Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 87p. <http://www.remeri.org.mx/tesis/INDIXE-TESES.jsp?search=colpos&ind=1326&step=200&order=3&asc=0>
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H and Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to *Candidatus Phytoplasma asteri* detected in citrus showing HLB (Yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236-242. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0236>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal J., Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JF, López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952012000800003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000800003&lng=es&nrm=iso)
- Flores-Sánchez J, Mora-Aguilera, G, Loeza KE, López AJ, Gutiérrez EMA, Velázquez MJJ, Domínguez MS, Bassanezi R B, Acevedo SG and Robles GP. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of huanglongbing from first reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1119-1127 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE and Gundersen DE. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842. [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n08\\_834.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n08_834.PDF)
- Lee IM, Gundersen Rindal DE, Davis RE, Bottner KD, Marccone C and Seemüller E. 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster

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

- yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1037–1048. DOI 10.1099/ijs.0.02843-0
- Marques RN, Teixeira DC, Martins EC, Leite APR, Sanches AL, Yamamoto PT and Lopes JRS. 2010. Detection of the phytoplasma associated with citrus huanglongbing symptoms in the leafhopper *Scaphytopius marginelineatus*. *Citrus Research and Technology* 31:40. <http://bdpi.usp.br/single.php?id=002243478>.
- Medler JT. 1960. *Agrosoma*, a new genus for *Tettigoniapulchella* Guerin and related species (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 53: 18-26. <https://doi.org/10.1093/aesa/53.1.18>
- Mora-Aguilera G, Robles GP, López AJI, Flores SJ, Acevedo SG, Domínguez MS, Gutiérrez EA, Loeza KE y González GR. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119. http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf
- Robles G, M. M, Velázquez MJJ, Manzanilla RMA, Orozco SM, Flores VR y U Medina UVM. 2010. Síntomas del Huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. Pp: 141–149. *In: Memorias del 1er Simp. Nal. sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*. Monterrey, Nuevo León
- SIRVEF. 2018. Sistema Integral de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/>
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C and Bové JM. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon pea witches'-broom phytoplasma 16srIX is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-98-9-0977>
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC and Bove JM. 2010. Phytoplasma associated with citrus Huanglongbing in Brazil. National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/312435222>
- Torres L, Galdeano E, Docampo D and Conci L. 2004. Characterization of an *Aster yellows phytoplasma* associated with *Catharanthus* little leaf in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 86(3) 209-214. <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0304/030404.pdf>
- Wulff AN, Fassini GC, Marques VV, Martins CE, Coletti BDA, Teixeira DC, Sanches MM, Bové J. 2018. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0081-R>
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>
- Young DA. 1977. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellid and the genus *Cicadella*. Technical Bulletin of the North Carolina Agricultural Experiment Station. 239. 1135 pp. <https://eurekamag.com/research/006/580/006580776.php>

First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico

Primer reporte de *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) en Michoacán, México

José Manuel Cambrón-Crisantos, Johan Rodríguez-Mendoza*, Jessica Berenice Valencia-Luna, Salomé Alcasio Rangel, Clemente de Jesús García-Ávila, José Abel López-Buenfil, Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Carretera Federal México-Pachuca, Km 37.5, CP 55740 Tecámac, Estado de México, México; Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. *Autor para correspondencia: rodriguezjmj@cinvestav.mx

Recibido: 29 de Octubre, 2018.

Aceptado: 06 de Diciembre, 2018.

Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA and Ochoa-Martínez DL. 2018. First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 185-192.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5

Primera publicación DOI: 10 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 10, 2018.

Resumen. A nivel mundial, la producción de jitomate y chile es de gran relevancia. Recientemente, en Israel y Jordania se notificó la presencia de un nuevo miembro del género *Tobamovirus* en plantaciones de jitomate, al cual se le llamó *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Los frutos de plantas infectadas manifiestan áreas amarillas, necróticas o de color marrón incluso rugosidades. En los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, se han

Abstract. The production of tomato and pepper is of great importance worldwide. Recently, in Israel and Jordan, the presence of a new member of the *Tobamovirus* genus was reported in tomato crops, which was called *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). The fruits of infected plants can develop yellow areas, roughness, as well as necrotic or brown areas. In Yurecuaro and Tanhuato municipalities of Michoacan, crops of tomato and pepper have shown symptoms similar to those described, thus the objective was to determine if the ToBRFV is present in those places. Leaf tissue of tomato with symptoms was included and RT-PCR was performed with primers that amplify a segment of the ORF2 of the genome of this virus; further, grids were prepared for observation under the transmission electron microscope (TEM). The expected amplicon was obtained and the sequences had a similarity of 99 to 100 % with ToBRFV. At the TEM, rigid rod-shaped viral particles typical of tobamoviruses were observed. To our knowledge,

observado cultivos de jitomate y chile con síntomas similares a los antes mencionados por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar si el ToBRFV se encuentra presente en estas localidades. Se colectó tejido foliar de jitomate con síntomas y se realizó RT-PCR con iniciadores que amplifican un segmento del ORF2 del genoma de este virus; además, se prepararon rejillas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). Se obtuvo el amplicón esperado y las secuencias tuvieron una similitud de 99 a 100 % con ToBRFV. Al MET se observaron partículas virales en forma de varilla rígida típicas de tobamovirus. Hasta donde sabemos este es el primer reporte de la presencia del ToBRFV asociado a plantas de jitomate y chile cultivados en México.

Palabras clave: *Tobamovirus*, *Solanaceae*, RT-PCR, *microscopía electrónica de transmisión*

De acuerdo a Dombrovsky y Smith (2017) el comercio mundial de semillas ha contribuido a la transmisión y diseminación de brotes de nuevas enfermedades en diferentes países, particularmente de virus pertenecientes al género *Tobamovirus*, entre ellos el ToBRFV. Los cultivos de tabaco, jitomate y chile (familia *Solanaceae*) son afectados severamente por virus del género *Tobamovirus*: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Dombrovsky y Smith, 2017).

Las especies del género *Tobamovirus* son partículas de varilla rígida, poseen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de ~6.4 kb con cuatro marcos de lectura abierto (ORFs por sus siglas en inglés de *Open reading frames*). El ORF1 y ORF2 están separados por un codón de paro y codifican dos proteínas relacionadas con la replicación

it is the first report of the presence of ToBRFV associated to tomato and pepper plants grown in Mexico.

Key words: *Tobamovirus*, *Solanaceae*, RT-PCR, *transmission electron microscopy*

According to Dombrovsky and Smith (2017), world seed trade has contributed to the transmission and dissemination of outbreaks of new diseases, particularly from viruses belonging to the genus *Tobamovirus*, including the ToBRFV. Tobacco, tomato and chili pepper (*Solanaceae* family) crops are severely affected by the virus of the genus *Tobamovirus*: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Dombrovsky and Smith, 2017).

The species of the *Tobamovirus* genus have rod-shaped particles, and a positive-sense single-stranded RNA genome of ~6.4 kb with four Open Reading Frames (ORFs). ORF1 and ORF2 are separated by a stop codon and they codify two proteins related to the replication of the virus with a weight of 126 and 183 kDa, respectively. ORF3 codifies the movement protein of 30 kDa, while ORF4 codifies the capsid of 17.5 kDa (Luria *et al.*, 2017).

The tobamoviruses are easily transmitted mechanically and via seeds (infectious particles in the testa) that infect sprouts when they germinate. The virus may remain in plant residues and soils contaminated with the virus for several months, and in infected seeds for several years (Dombrovsky and Smith, 2017).

Recently, in Israel (Luria *et al.*, 2017) and Jordan (Salem *et al.*, 2015), there were reports of tomatoes infected by a new tobamovirus called

del virus con un peso de 126 y 183 kDa, respectivamente. El ORF3 codifica la proteína de movimiento de 30 kDa, mientras que el ORF4 codifica para la cápside de 17.5 kDa (Luria *et al.*, 2017).

Los tobamovirus se transmiten fácilmente de forma mecánica y semilla (partículas infecciosas en la testa) que al germinar infectan las plántulas. El virus puede permanecer en residuos vegetales y suelos contaminados con virus durante varios meses y en semillas infectadas durante varios años (Dombrovsky y Smith, 2017).

Recientemente en Israel (Luria *et al.*, 2017) y Jordania (Salem *et al.*, 2015) se reportó un nuevo tobamovirus denominado *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) infectando jitomate, el cual ocasiona una reducción en la cantidad de flores y frutos, necrosis en el pedúnculo del fruto y hojas del cáliz. En los frutos de plantas enfermas se observan áreas de color amarillo o marrón y rugosidades en su superficie (Salem *et al.*, 2015).

En 2018, productores de jitomate y chile de la región de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, han reportado síntomas en frutos con coloración amarilla, manchas verdes y deformación, estriado verde y manchas irregulares color marrón (**Fig. 1a**) y en hojas síntomas de mosaico, moteado y amarillamiento. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el ToBRFV se encuentra presente en Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, afectando los cultivos de jitomate y chile.

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. En septiembre de 2018, en los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán, se colectó tejido foliar, flores y frutos de plantas de jitomate y chile con síntomas de la enfermedad: frutos con coloraciones amarillas, manchas y estriados verdes, manchas irregulares de color marrón y deformación, mientras que en el follaje, moteados cloróticos y mosaicos. En flores no se observaron

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), which causes a reduction in the amount of flowers and fruits, necrosis in the peduncle of the fruit and leaves of the calyx. The fruits of infected plants presented yellow or brown areas and rough areas on their surface (Salem *et al.*, 2015).

In 2018, tomato and chili farmers of the region of Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, have reported symptoms on fruits regarding yellow colors, green spots and deformations, green grooves and irregular brown spots (**Fig. 1a**), and on leaves, mosaic symptoms, spots and yellowing. The aim of the present work was to determine if ToBRFV is present in Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, affecting tomato and chili crops.

The present study was carried out in the facilities of the National Plant Health Reference Center. In September of 2018, in the municipal areas of Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan, leaf tissue, flowers and fruits were taken from tomato and chili plants with symptoms of the disease: fruits showing yellowing, spots and green grooves, irregular brown spots and deformation, while the foliage presented chlorotic spots and mosaic. No symptoms were found in flowers, according to reports by other authors. In Yurecuaro, two samples were taken of tomato plants in different production units, and in Tanhuato, six samples were taken (five of tomato and one of chili). The samples were properly labeled and taken to the laboratory, where they were maintained at 4 °C.

In each sample, midribs of the leaves were separated and cut transversally to divide the sample into two parts: the first was used for the preparation of grids for the transmission electron microscope, and the second, for the extraction of total RNA.

Central midribs of infected leaves (0.1 g) were grinded in 500 µL of bi-distilled water using a sterile plastic mortar; the macerate was centrifuged at 9000 g for three minutes to eliminate any

síntomas de acuerdo a lo reportado por otros autores. En Yurécuaro se tomaron dos muestras simples dirigidas de plantas de jitomate de diferentes unidades de producción y en Tanhuato seis muestras (cinco de jitomate y una de chile). Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio donde fueron resguardadas a 4 °C hasta su análisis.

De cada muestra, se separó la nervadura central de las hojas y se les realizó un corte trasversal para dividir la muestra en dos partes: la primera se utilizó para la preparación de rejillas y observarlas al microscopio electrónico de transmisión, y la segunda para la extracción de RNA total.

Se maceró 0.1 g de nervadura central de hojas infectadas en 500 µL de agua bidestilada con un pistilo de plástico estéril; el macerado fue centrifugado a 9000 g durante tres minutos para eliminar restos de tejido vegetal. Sobre rejillas de cobre de 300 mallas (Electron Microscopy Sciences®) recubiertas con una membrana de formvar/carbon® se colocaron 10 µL de sobrenadante y 10 µL de ácido fosfotúngstico al 1 % (Fluka analytical), se mezclaron por pipeteo y se dejaron durante 30 segundos, al término de los cuales se eliminó el exceso con un pedazo de papel filtro. Las rejillas se observaron por microscopía electrónica de transmisión y las imágenes fueron fotografiadas.

El RNA total se extrajo a partir de 100 mg de nervaduras centrales con el Kit SV Total RNA Isolation System Start-Up® (Promega™), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría (Nano Drop 2000®, Thermo Scientific™).

La retrotranscripción se realizó con iniciadores aleatorios (Random Hexamer, Invitrogen™), siguiendo las indicaciones del fabricante con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 42 °C por 30 min, 1 ciclo a 99 °C por 5 min y

remaining plant tissue. Copper grids of 300 mesh (Electron Microscopy Sciences®) covered with a formvar/carbon® membrane, were covered with 10 µL of supernatant and 10 µL of phosphotungstic acid at 1 % (Fluka analytical), both were mixed with a pipette and left them for 30 seconds and the excess was eliminated with a piece of filter paper. Grids were observed under a transmission electron microscope and the images were photographed.

Total RNA was extracted from 100 mg of central midribs by the SV Total RNA Isolation System Start-Up® (Promega™) kit, according to the indications of the manufacturer. The purity and concentration of the RNA extracted was quantified by spectrophotometry (Nano Drop 2000®, Thermo Scientific™).

Retrotranscription was carried out using random primers (Random Hexamer, Invitrogen™), according to the manufacturer instructions. Conditions of amplification were: 1 cycle at 42 °C for 30 min, 1 cycle at 99 °C for 5 min, and finally, 12 °C for 5 min. PCR was performed with primers F-3666 (5'-ATGGTACGAACGGCGGCAG-3') and R-4718 (5'-CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC-3') which amplified a fragment of 1052 pb of ORF2 (Luria *et al.*, 2017). The reaction mixture consisted of 12.5 µL of Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (2X) (Invitrogen), 5 µL of Super Fi™ GC Enhancer (5X) (Invitrogen), 3 µL of molecular biology degree water (Invitrogen), 1.25 µL of primer F-3666 (10 µM), 1.25 µL of primer R-4718 (10 µM) and 2 µL of cDNA template, in a final volume of 25 µL. The amplification was performed under the following conditions: 1 cycle at 98 °C for 5 min, 25 cycles at 98 °C for 1 min, 62 °C for 3 min and 72 °C for 3 min with a final extension of 72 °C for 10 min. The amplified products were observed by electrophoresis in an agarose gel at 1.5 %.

finalmente a 12 °C durante 5 min. En la PCR se usaron los iniciadores F-3666 (5'-ATGGTACGA-ACGGCGGCAG-3') y R-4718 (5'-CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC-3') que amplifican un fragmento de 1052 pb del ORF2 (Luria *et al.*, 2017). La mezcla de reacción consistió en 12.5 µL de Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix (2X) (Invitrogen), 5 µL de Super Fi™ GC Enhancer (5X) (Invitrogen), 3 µL de agua grado biología molecular (Invitrogen), 1.25 µL del primer F-3666 (10 µM), 1.25 µL del primer R-4718 (10 µM) y 2 µL del templado de cDNA, en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 98 °C por 5 min, 25 ciclos a 98 °C por 1 min, 62 °C por 3 min y 72 °C por 3 min con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 %.

Los productos de la RT-PCR fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, utilizando el equipo Applied Biosystems modelo 3130; las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas para obtener tamaños de 900 pb y comparadas en la base de datos del GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). El alineamiento local se realizó utilizando el programa MEGA v7.0.26 y el algoritmo MUSCLE. Se construyó una matriz con secuencias de *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) para realizar un análisis filogenético. Se usaron como grupo externo dos secuencias correspondientes a *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (NC_003630.1) y *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (AB078435.1). Se usó el método *Maximum Likelihood* (ML) basado en el modelo de Tamura-Nei, con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-

RT-PCR products were sequenced in the National Plant Health Reference Center Molecular Biology Lab. (Applied Biosystems, model 3130); sequences were assembled and edited to obtain sizes of 900 bp, and compared in the GenBank database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Local alignment was carried out with MEGA v7.0.26 and the algorithm MUSCLE. A matrix was built with *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) sequences to carry out a phylogenetic analysis. As an external group, we used two sequences from *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (NC_003630.1) and *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (AB078435.1). The *Maximum Likelihood* (ML) model was used, based on the model by Tamura-Nei, with 1000 bootstrap iterations. The initial trees for the heuristic analysis were obtained automatically by applying the Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a distance by estimated pairs matrix, using the *Maximum Composite Likelihood* (MCL) approach and selecting the topology with a higher log verosimilitude value with MEGA v7.0.26.

Symptoms in tomato fruits and plants observed in Yurecuaro and Tanhuato were similar to those reported by Luria *et al.* (2017) and Salem *et al.* (2015) (**Figure 1a**). The samples analyzed amplified the expected product of 1052 bp. Sequences obtained from samples M1 (MK273183), M2 (MK273184), M5 (MK273187) and M7 (MK273189) had a similarity of 100 % with those from Israel (KX619418.1) and Jordan (KT383474.1), while samples M3 (MK273185), M4 (MK273186), M6 (MK273188) and M8 (MK273190) had a similarity of 99 % for both isolates (**Figure 1b**).

The phylogenetic tree with the highest probability of registering (-2680.43) shows that the sequences of samples M1-M8 were grouped within

Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior con el programa MEGA v7.0.26.

Los síntomas en frutos y plantas de jitomate colectadas en Yurécuaro y Tanhuato fueron similares a los reportados por Luria *et al.* (2017) y Salem *et al.* (2015) (**Figura 1a**). Las muestras analizadas amplificaron el producto esperado de 1052 pb. Las secuencias obtenidas de las muestras M1 (MK273183), M2 (MK273184), M5 (MK273187) y M7 (MK273189) tuvieron 100 % de identidad con las secuencias de las muestras identificadas en Israel (KX619418.1) y Jordania (KT383474.1), mientras que las muestras M3 (MK273185), M4 (MK273186), M6 (MK273188) y M8 (MK273190) mostraron 99 % de identidad con las secuencias de Israel y Jordania. (**Figura 1b**).

En el árbol filogenético con la mayor probabilidad de registro (-2680.43) se observa que las secuencias de las muestras M1-M8 se agruparon dentro del nodo que tiene las secuencias de Israel (KX619418.1) y Jordania (KT383474.1) (**Figura 1c**). Todos los grupos correspondientes a las otras especies de *Tobamovirus* tienen porcentajes de inferencia del 90 – 100 % a partir de 1000 iteraciones bootstrap. En las rejillas preparadas con extractos de hojas de jitomate se observaron partículas virales en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 nm de longitud similares a las reportadas por Luria *et al.* (2017) (**Figura 1d**).

Estos resultados indican la presencia de *Tomato brown rugose fruit virus* asociadas a plantas de jitomate y chile colectadas en Yurécuaro y Tanhuato y sugieren que proceden de semilla comercial producida en Israel y Jordania. El ToBRFV solo ha sido reportado en Asia y Medio Oriente y se tienen reportes sobre su fácil diseminación mecánica y por semillas (Dombrovsky y Smith, 2017). Con base

the node that contains the Israeli (KX619418.1) and Jordanian sequences (KT383474.1) (**Figure 1c**). All groups of tobamoviruses have percentages of inference of 90 – 100 % from 1000 bootstrap iterations. In grids prepared with tomato leaf extracts, rod-shaped viral particles of approximately 300 nm in length, similar to those reported by Luria *et al.* (2017) were observed (**Figure 1d**).

These results indicate the presence of *Tomato brown rugose fruit virus* associated to tomato and chili pepper plants collected in Yurecuaro and Tanhuato, and suggest its introduction by commercial seeds produced in Israel and Jordan. The ToBRFV has only been reported in Asia and the Middle East, and there are reports that is easily mechanically transmitted and disseminated by seed (Dombrovsky and Smith, 2017). Based on the results obtained, it is necessary to carry out pathogenicity tests in the future.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the present study, it is established that *Tomato brown rugose fruit virus* is associated to commercial tomato and chili pepper crops from Yurecuaro and Tanhuato, Michoacan. These plants presented the symptoms described by Luria *et al.* (2017) and Salem *et al.* (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

To José Antonio Castro Mora and Jorge Torres Faburrieta of the Plant Health Epidemiological Surveillance Program of the state of Michoacan for their support for the collection of plants in the field. To Dr. Rosario Espinoza Mellado of the National School for Biological Science of the IPN for her technical assistance for the capturing of images at the transmission electron microscopy.

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

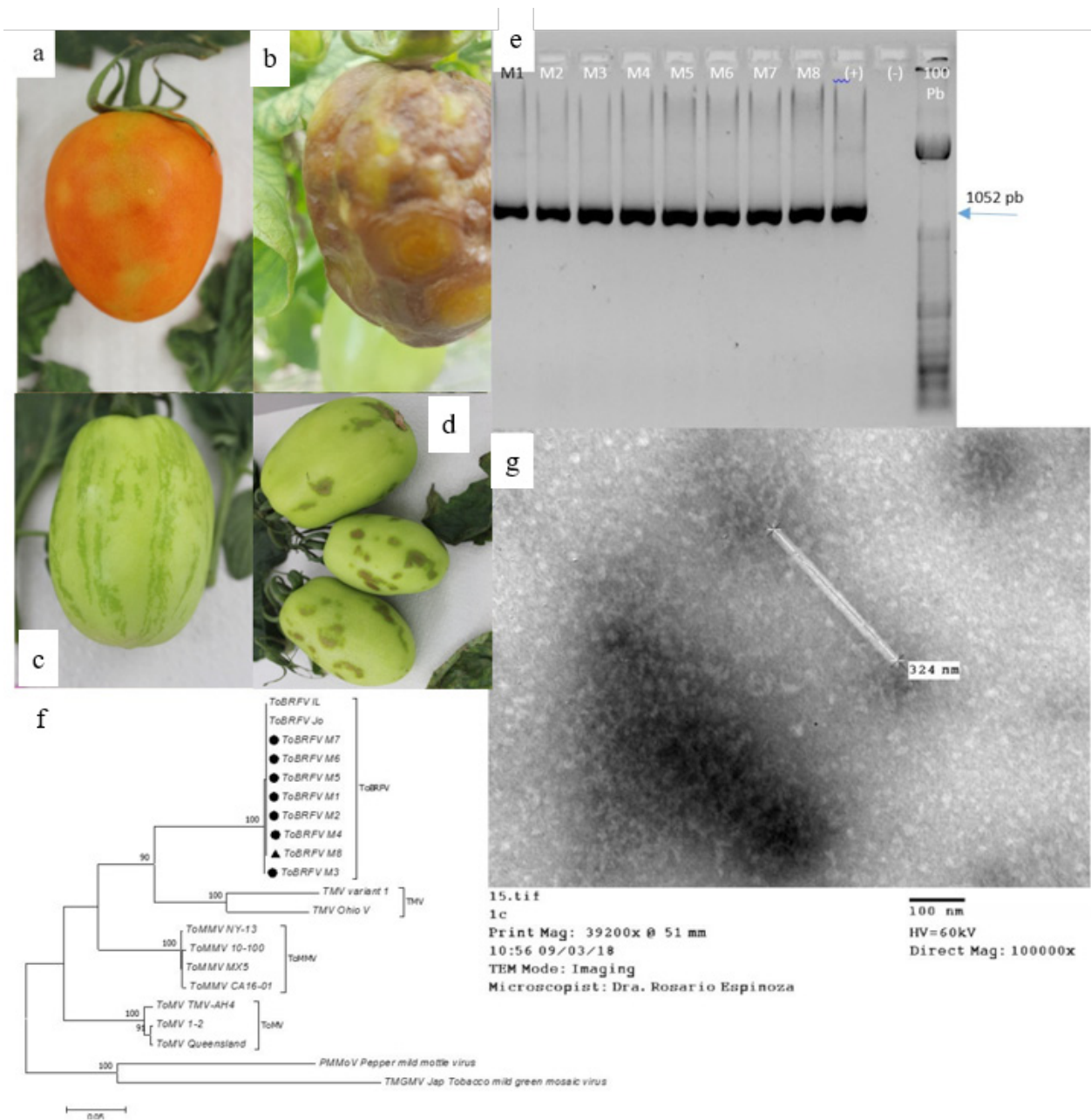


Figura 1. Síntomas observados en frutos de jitomate positivos al ToBRFV. Frutos con coloraciones amarillas (a), manchas verde y deformación (b), estriado verde (c) y frutos con manchas marrón (d). Productos de 1052 pb obtenidos por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos para el género *Tobamovirus* (e). Árbol de máxima probabilidad de las secuencias del fragmento ORF2 de muestras ToBRFV con otros *Tobamovirus* (TMV, ToMMV y ToMV) (f). Partícula viral en forma de varilla rígida presente en muestras de jitomate característico de *Tobamovirus* (g).

Figure 1. Symptoms observed on tomato samples positive for ToBRFV. Fruits with yellow colorations (a), green spots and deformation (b), green striate (c) and fruits with brown spots (d). Products of 1052 bp obtained by RT-PCR using the oligonucleotides for the *Tobamovirus* genus (e). Maximum-likelihood tree of sequences of fragment ORF2 from samples ToBRFV with others *Tobamovirus* (TMV, ToMMV and ToMV) (f). Viral rods particle present in tomato samples characteristic of *Tobamovirus* (g).

a los resultados obtenidos, se considera necesario que en el futuro se realicen las pruebas de patogenicidad correspondientes.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se establece que el *Tomato brown rugose fruit virus* se encuentra asociado a plantas de jitomate y chile de cultivos comerciales en los municipios de Yurécuaro y Tanhuato, Michoacán. Estas plantas presentaron los síntomas descritos por Luria *et al.* (2017) y Salem *et al.* (2015).

## AGRADECIMIENTOS

A los ingenieros José Antonio Castro Mora y Jorge Torres Faburrieta del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del Estado de Michoacán por el apoyo para la colecta de plantas en campo. A la Dra. Rosario Espinoza Mellado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por la asistencia técnica para la toma de imágenes de microscopía electrónica.

## LITERATURA CITADA

- Dombrovsky A and Smith E. 2017. Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. pp: 234-260. *In*: Jose C. Jimenez-Lopez (ed.). Seed Biology. IntechOpen. 338p. <http://doi.org/10.5772/intechopen.70244>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I and Dombrovsky A. 2017. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm- 22 resistance genes. PLoS ONE 12(1): 1–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW and Turina M. 2015. A new Tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Archives of Virology 161(2): 503–506. <http://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>.

# First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico

## Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México

Fannie Isela Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, INIFAP, Norman E. Borlaug Km 12, C.P.85000, Ciudad Obregón, Sonora, México, Jesús García Pereyra, Gabriel Nicolás Aviña Martínez, Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Carretera Durango - México Km 22.5, C.P. 34371, Ejido Villa Montemorelos, Durango, Sergio de los Santos-Villalobos\*, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P.85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. \*Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Recibido: 13 de Octubre, 2018.

Aceptado: 22 de Diciembre, 2018.

Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN and de los Santos-Villalobos S. 2018. First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 193-201.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-3

Primera publicación DOI: 30 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 30, 2018.

**Resumen.** Muerte de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. “Valencia” fue observada en el Valle del Yaqui, México, en agosto de 2017. Para identificar el agente causal, se recolectaron hojas, ramas y raíces de árboles sintomáticos. Siete aislados fúngicos fueron obtenidos de raíces presentando oscurecimiento del sistema vascular, llamados FS1 a FS7. Las características macro y microscópicas típicas

**Abstract.** Death of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. “Valencia” was observed in the Yaqui Valley, Mexico, in August 2017. In order to identify the causal agent, leaves, branches, and roots from symptomatic trees were collected. Seven fungal isolates were obtained from brown roots, encoded FS1 to FS7. Macro and microscopic characteristics typical of the genus *Fusarium* were observed in all obtained single-spored isolates, such as: abundant white cottony mycelium and a purple or yellow undersurface on PDA, curved macroconidia widest in the middle of their length, and oval, reniform, elongated oval to obovoid with a truncate base, and septated microconidia. The sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region showed high coverage and similarity (>99%) to sequences of the *Fusarium solani* species complex (FSSC). The inoculation of 1-year-old orange trees with each obtained *Fusarium* isolate

del género *Fusarium* fueron observadas en todos los aislados mono-espóricos obtenidos, tales como: abundante micelio algodonoso de color blanco y un anverso de color púrpura o amarillo en PDA, macroconidias curvas más ancha en la parte central de su longitud, y ovaladas, reniformes, alargadas, de ovaladas a obovoides con una base truncada, y microconidias septadas. La secuenciación de la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS) mostró una alta cobertura y similitud (> 99%) con secuencias del Complejo de Especies de *Fusarium solani* (CEFS). La inoculación de naranjos de 1 año de edad con cada uno de los aislados de *Fusarium* obtenidos provocó el oscurecimiento del sistema vascular de la raíz y la muerte de estos árboles, lo que confirma que estos aislados fueron los agentes causales del marchitamiento por *Fusarium* observados en árboles de naranja en campos comerciales del Valle del Yaqui. Este es el primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en cítricos en dicha región.

**Palabras clave:** Hongo, Postulados de Koch, ITS.

La producción de cítricos en México ha aumentado, al ser este cultivo frutal el de mayor valor en el mercado internacional (<http://www.fao.org>) debido a su uso en la producción de jugos, mermeladas y otros. Sin embargo, las enfermedades de cítricos, en particular aquellas causadas por hongos, causan pérdidas económicas en todo el mundo y, en algunos casos, pueden reducir la producción total hasta en 50% (Ochoa *et al.*, 2007). En agosto de 2017 se observaron síntomas tales como clorosis, necrosis, desecamiento, caída prematura de hojas, marchitez, y luego muerte (~ 60 ha y<sup>-1</sup>) de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. “Valencia” en huertos comerciales de naranja en el Valle del Yaqui, Sonora (26° 45’-27° 33’N latitud y 109° 30’-110° 37’W

caused browning of the root vascular system and death of these trees, confirming that those isolates were the causal agents of *Fusarium* wilt observed in orange trees in commercial fields in the Yaqui Valley. This is the first report of *Fusarium* wilt on citrus in that region.

**Key words:** Fungi, Koch’s postulates, ITS.

The citrus production in Mexico has increased as this crop is the highest value fruit crop in the international trade (<http://www.fao.org>), due to its use in the production of juice, marmalade, among others. However, citrus diseases, particularly those caused by fungi, cause economic losses throughout the world, and in some cases can reduce total production by 50% (Ochoa *et al.*, 2007). In August 2017, symptoms such as chlorosis, necrosis, dieback, premature leaf drop, wilting, and then death (~ 60 ha y<sup>-1</sup>) of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. “Valencia” were observed in orange commercial fields in the Yaqui Valley, Sonora (26° 45’-27° 33’ N latitude and 109° 30’-110° 37’ W longitude), one of the most important agricultural regions in Mexico (Figure 1A). Then, leaves, branches, and roots from ten symptomatic orange trees were collected and placed into moist chambers at 4 °C for their transportation to laboratory, in order to identify the biological causal agents of those symptoms. The visual analysis of collected samples showed browning of the root vascular system (Figure 1B). Thus, fifty pieces of brown roots were surface sterilized using 1% sodium hypochlorite for 2 min, washed twice using sterile (121 °C and 15 psi for 15 min) distilled water, and cut into 1 cm pieces. Later, these root pieces were placed on Potato Dextrose Agar (PDA) (supplemented with 80 µg mL<sup>-1</sup> nalidixic acid), and incubated for 5 days at 28±2 °C (12 h of darkness

longitud), una de las regiones agrícolas más importantes de México (Figura 1A). Así, se recolectaron hojas, ramas y raíces de diez naranjos sintomáticos y fueron colocados en cámaras húmedas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio, donde se identificó el agente biológico causal de dichos síntomas. El análisis visual de las muestras colectadas indicó la presencia de oscurecimiento (tonos de color café) en el sistema vascular de las raíces de dichos árboles (Figura 1B). Por ello, se esterilizaron cincuenta segmentos de dichas raíces usando una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, lavadas dos veces usando agua destilada (121 °C y 15 psi por 15 min), y se cortaron en pedazos de 1 cm. Más adelante, los pedazos de raíces fueron colocados en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (complementado con 80 µg mL<sup>-1</sup> de ácido nalidíxico), e incubadas por 5 días a 28±2 °C (12 h de oscuridad y 12 h de luz) (Villa-Rodriguez *et al.*, 2016). Después del periodo de incubación, cada colonia fúngica fue aislada usando el medio y las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, con lo cual se obtuvieron siete aislados fúngicos, a los que se les dieron claves FS1 a FS7. Estos aislados fueron depositados en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos- COLMENA ([www.itson.edu.mx/colmena](http://www.itson.edu.mx/colmena)) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Se observaron características macro y microscópicas (se produjeron preparaciones semipermanentes en ácido láctico y examinadas con un microscopio óptico) típicas del género *Fusarium* para los siete aislados obtenidos de cultivos mono-espóricos (Leslie y Summerell, 2006), *i.e.* 1) abundante micelio algodonoso y un color morado o amarillo debajo de la superficie en PDA, 2) macroconidios curvados con un mayor ancho a la mitad de su largo, y 3) microconidios septados ovalados, reniformes, ovalados alargados a obovoides con una base truncada (Figura 2). La identificación

and 12 h of light) (Villa-Rodriguez *et al.*, 2016). After the incubation period, each mycelial colony was isolated using the culture medium and growth conditions mentioned above, obtaining seven fungal isolates, which were encoded FS1 to FS7. These isolates were deposited in Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos- COLMENA ([www.itson.edu.mx/colmena](http://www.itson.edu.mx/colmena)) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Macro and microscopic characteristics (semipermanent preparations in lactic acid were made and examined with an light microscope) typical of the genus *Fusarium* were observed for the seven obtained single-spored isolates (Leslie and Summerell, 2006), *i.e.* 1) abundant white cottony mycelium and a purple or yellow undersurface on PDA, 2) curved macroconidia widest in the middle of their length, and 3) oval, reniform, elongated oval to obovoid with a truncate base, and septated microconidia (Figure 2). The molecular identification –at genus level– of these isolates was carried out by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) region. Firstly, 1 x 10<sup>6</sup> spores of each fungal isolate was separately inoculated in tubes containing 5 mL of Potato Dextrose Broth (PDB), and incubated for 3 days at 28 °C (24 h of darkness). At the end of the incubation period, cell suspension was centrifuged for 5 min at 2,500 Relative Centrifugal Force (RCF) to obtain fungal mycelium. The fungal genomic DNA was extracted from 500 mg of fresh mycelium, which was re-suspended in 500 µL extraction buffer (200 mmol Tris HCl pH 8.5, 250 mmol NaCl, 25 mmol EDTA, and 0.5% SDS) by stirring with a pipette tip. The slurry was mixed homogeneously with 350 µL phenol. Then, 150 µL chloroform were added and mixed, and the suspension was centrifuged for 1 h in an Eppendorf centrifuge (13,000 RCF). The upper aqueous phase was transferred into a sterile Eppendorf tube and mixed

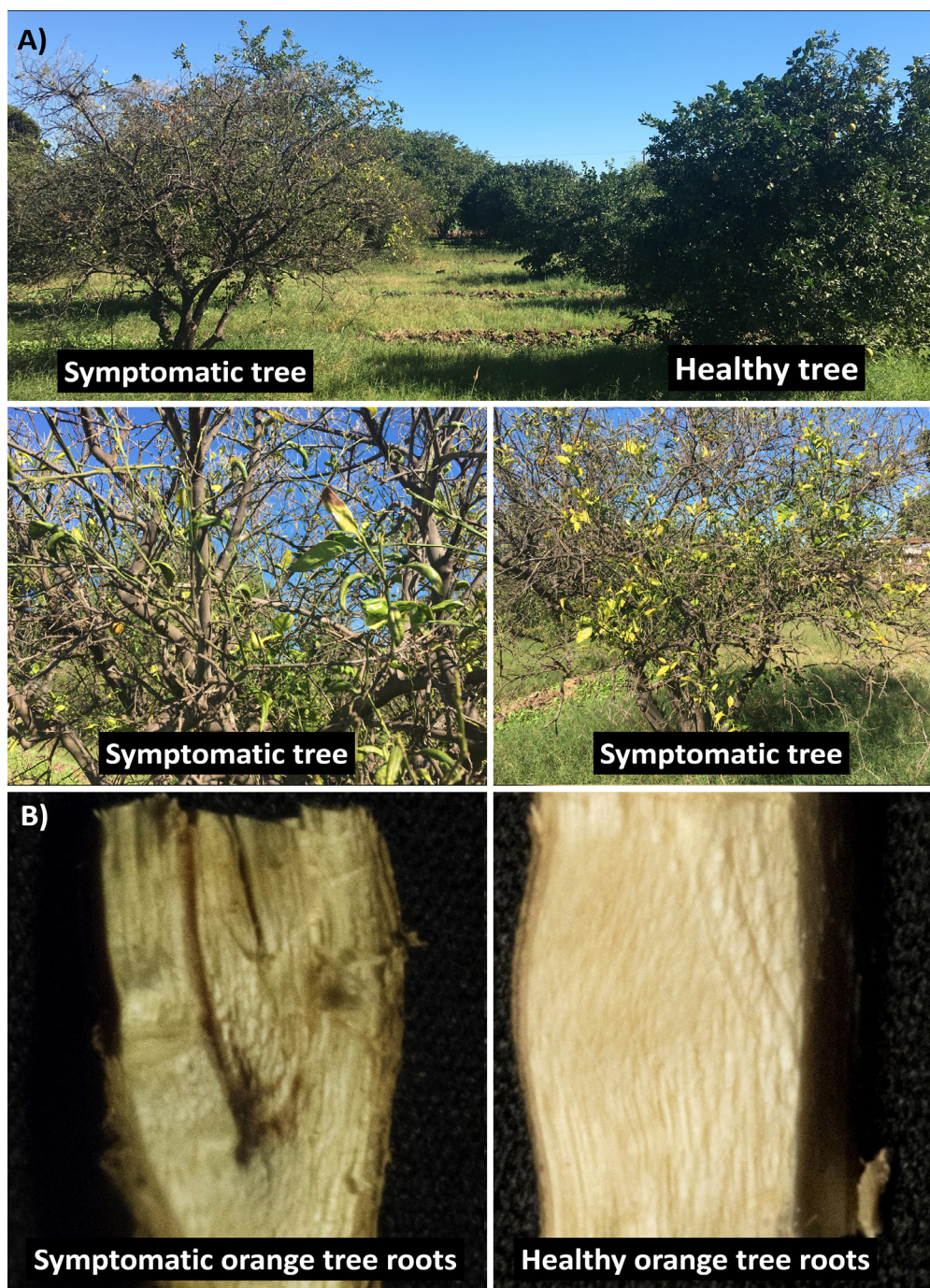
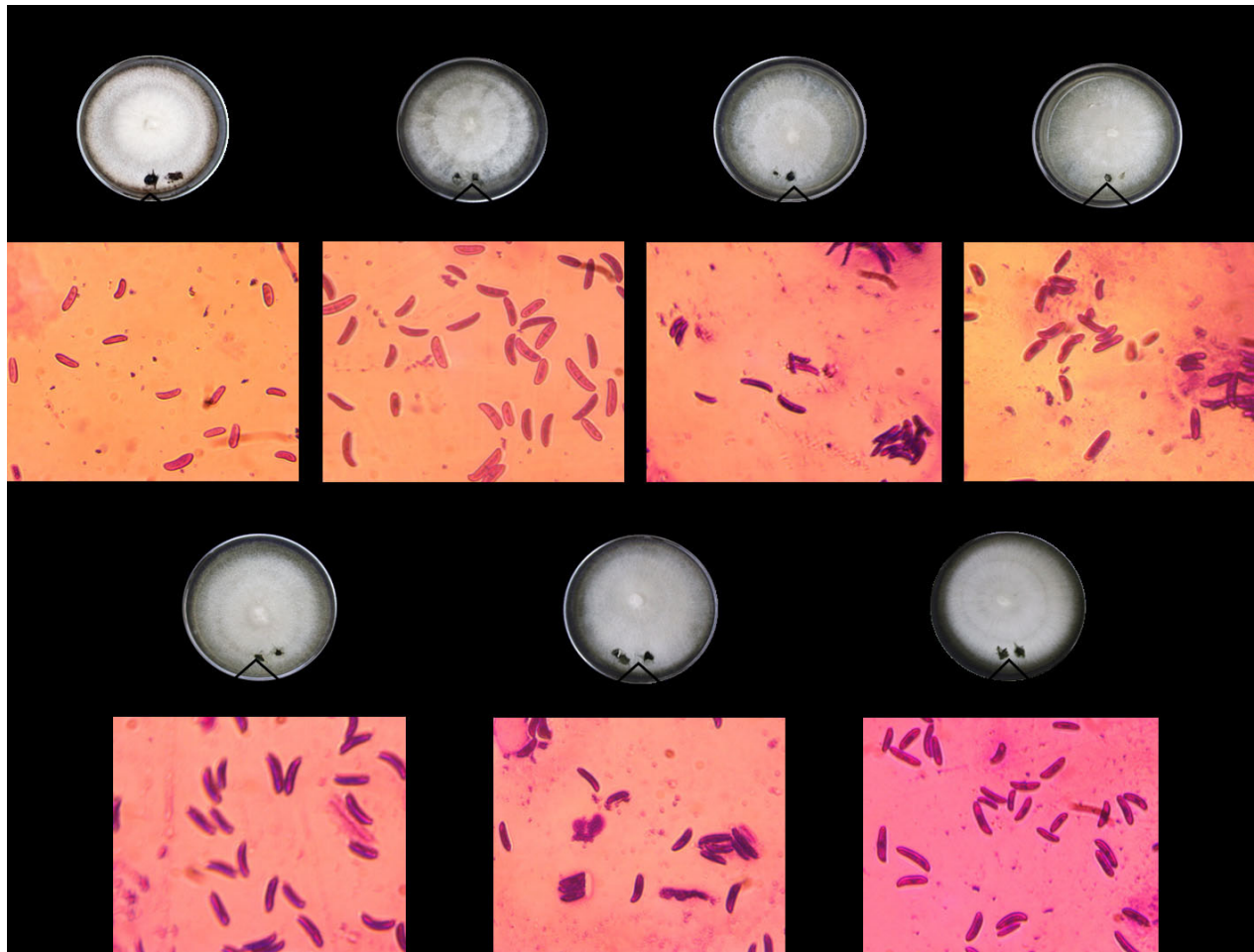


Figura 1. Síntomas de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. Valencia” en el Valle del Yaqui, Sonora. A) Síntomas incluyen: clorosis, necrosis, desecamiento, caída prematura de hojas, marchitez y luego muerte vs. un árbol sano. B) Naranja sintomático presentando tonos de color café en el sistema vascular de las raíces vs. raíz sana.

Figure 1. Symptoms of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. Valencia” in commercial fields in the Yaqui Valley, Sonora. A) Symptoms include: chlorosis, necrosis, dieback, premature leaf drop, and wilting vs. a healthy tree. B) Symptomatic orange tree root showing browning of the root vascular system vs. healthy root.





**Figura 2.** Caracterización morfológica de agentes asociados aislados de raíces sintomáticas. Características macroscópicas, abundante micelio algodonoso de color blanco y un anverso de color púrpura o amarillo en PDA. Características microscópicas, macroconidios curvados, de mayor ancho a mitad de su longitud.

**Figure 2.** Morphological characterization of associated agents isolated from symptomatic roots. Macroscopic characteristics, abundant white cottony mycelium and a dark-purple undersurface on PDA. Microscopic characteristics, curved macroconidia widest in the middle of their length.

molecular –a nivel de género – de estos aislados se realizó secuenciando la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS). Primeramente,  $1 \times 10^6$  esporas de cada aislado fúngico fueron inoculadas de manera separada en tubos con 5 mL de Caldo de Papa y Dextrosa (CPD), e incubados por 3 días a 28 °C, (en oscuridad). Al final del periodo de incubación, la suspensión celular fue centrifugada por 5 min a 2,500 de Fuerza Centrifuga Relativa (FCR)

with about 0.54 volume isopropanol (250  $\mu$ L), and centrifuged for 5 min in an Eppendorf centrifuge (13,000 RCF) for DNA precipitation (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). The obtained DNA was dried at room temperature and re-suspended in 30  $\mu$ L Nuclease-Free Water (sterile). Then, the 50  $\mu$ L PCR mixture contained 100 ng fungal genomic DNA as template, 0.2  $\mu$ mol of each pair of primers [ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

para obtener micelios fúngicos. El ADN genómico fúngico fue extraído de 500 mg de micelio fresco, el cual fue resuspendido con una pipeta en 500 µL de una solución amortiguadora de extracción (200 mmol Tris HCl pH 8.5, 250 mmol NaCl, 25 mmol EDTA, y 0.5% SDS). La solución acuosa resultante fue mezclada de forma homogénea con 350 µL de fenol. Posteriormente, se agregaron y mezclaron 150 µL de cloroformo, y la suspensión fue centrifugada por 1 h en una centrífuga Eppendorf (13,000 RCF). La fase superior acuosa fue transferida a un tubo Eppendorf esterilizado y mezclado con alrededor de 0.54 volúmenes de isopropanol (250 µL), y centrifugada por 5 min en una centrífuga Eppendorf (13,000 RCF) para la precipitación de ADN (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2018). El ADN obtenido fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 30 µL de agua libre de nucleasas (esterilizada). Luego, la mezcla de 50 µL de PCR contuvo 100 ng de ADN genómico fúngico, 0.2 µmol de cada par de oligonucleótidos [ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')] (White *et al.*, 1990)], y 4 U *MyTaq* polimerasa (Bioline). Las condiciones de PCR para la amplificación de la región de ITS consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C (3 min), 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s), seguido de un alineamiento a 55 °C (30 s), y extensión a 72 °C (1 min), así como un paso final de extensión a 72 °C (10 min) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa/TAE (2%), y purificados usando ISOLATE II PCR y Gel Kit (Bioline), y luego fueron secuenciados usando la plataforma Sanger (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) de Genomic Services Laboratory (LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato, Mexico). Las secuencias de ADN obtenidas fueron editadas y analizadas usando el software FinchTV 1.4.0 by Geospiza, Seattle, WA; y BLAST (NCBI, www.

and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990)], and 4 U *MyTaq* DNA polymerase (Bioline). The PCR conditions for the amplification of ITS region consisted of an initial denaturation step at 94 °C (3 min), 35 cycles of denaturation at 94 °C (30 s), followed by annealing at 55 °C (30 s), and extension at 72 °C (1 min), and a final step at 72 °C (10 min) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose/TAE gel (2%), and purified using ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline), and then sequenced using Sanger platform (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) by Genomic Services Laboratory (LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato, Mexico). The obtained DNA sequences were edited and analyzed using the software FinchTV 1.4.0 by Geospiza, Seattle, WA; and BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), respectively. The obtained ITS sequences showed high coverage (>99%) and similarity (>99%) to *Fusarium solani* species complex (FSSC), which is a group currently estimated to contain at least 60 phylogenetically distinct species (Coleman, 2016). Thus, based on the ITS molecular identification, all seven studied isolates were affiliated to the genus *Fusarium*, where additional and more robust molecular phylogenetic relationships need to be carried out in order to classify those isolates at specie level. The obtained *Fusarium* sequences were deposited in the NCBI Genbank as: FS1 (MG262553), FS2 (MG262554), FS3 (MG262555), FS4 (MG262556), FS5 (MG262557), FS6 (MG262558), and FS7 (MG262559).

Pathogenicity assays were conducted separately for each studied *Fusarium* isolate under greenhouse conditions (13 h of darkness at 14 °C, 2 h of light at 18 °C, 7 h of light at 25 °C, and 2 h of light at 18 °C; and 80% of relative humidity). Thus, five 1-year-old orange trees var. "Valencia" having damaged (small cuts were made using a sterile scalpel)

ncbi.nlm.nih.gov), respectivamente. Las secuencias de ITS obtenidas presentaron una alta cobertura (> 99%) y similitud (> 99%) con el complejo de especies de *Fusarium solani* (CEFS), el cual es un grupo que en la actualidad se estima que contiene al menos 60 especies filogenéticamente diferentes (Coleman, 2016). Por ende, con base en la identificación molecular de ITS, los siete aislados estudiados pertenecen al género *Fusarium*, sin embargo más y más robustas relaciones filogenéticas deben ser desarrolladas para clasificar estos aislados a nivel de especie. Las secuencias obtenidas de *Fusarium* fueron depositadas en el Genbank de NCBI como: FS1 (MG262553), FS2 (MG262554), FS3 (MG262555), FS4 (MG262556), FS5 (MG262557), FS6 (MG262558), y FS7 (MG262559).

Se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad de forma separada para cada aislado estudiado de *Fusarium* bajo condiciones de invernadero (13 h de oscuridad a 14 °C, 2 h de luz a 18 °C, 7 h de luz a 25 °C, y 2 h de luz a 18 °C; y 80% de humedad relativa). Así, cinco naranjos de un año de edad de la var. "Valencia" con raíces dañadas (se realizaron pequeñas incisiones con un bisturí estéril) fueron inoculados con una suspensión conidial ( $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y 50 mL planta<sup>-1</sup>); se estableció un control negativo con agua destilada estéril rociada sobre la herida de la planta. Después de 30 días, se observó una coloración café en el sistema vascular de las raíces en 100% de los árboles inoculados (las plantas control fueron asintomáticas y no se recuperó ningún cultivo de *Fusarium*), causando la muerte de los mismos, de donde se recuperó cada aislado de *Fusarium* y se caracterizó como se describe anteriormente, confirmando 1) la alta virulencia de estos aislados, y 2) su papel como agente causal de los síntomas y la muerte de naranjos observados en huertos comerciales en el Valle del Yaqui.

Con base en observaciones morfológicas, la caracterización molecular parcial y el cumplimiento

roots were inoculated with a conidial suspension ( $1 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and 50 mL plant<sup>-1</sup>), a negative control with sterile distilled water sprayed on the plant wound. After 30 days, browning of the root vascular system of 100% of inoculated trees was observed (control plants were asymptomatic and no *Fusarium* colony was recovered), causing death of them, from which each *Fusarium* isolate was recovered and characterized as described above, confirming 1) the high virulence of those isolates, and 2) their role as the causal agents of the observed symptoms and death of orange trees in commercial fields in the Yaqui Valley.

Based on morphological observations, partial molecular characterization, and the fulfilment of Koch's postulates, we identified that studied isolates (belonging to the FSSC) were the causal agent of wilt on orange trees var. "Valencia" in the Yaqui Valley. Similar findings have been reported in California (United States), identifying to *Fusarium solani* and *Phytophthora* spp. as the causal agent of dark decay in the bark of large scaffold roots and the lower crown of the trunk, and chlorosis in leaves, and wilting on lemon and orange trees (Adesemoye *et al.*, 2011). In addition, Fogliata *et al.* (2013) reported the presence of *Fusarium* rot on lemon trees, identifying *Fusarium oxysporum* as the causal agent. Recently, Sandoval-Denis *et al.* (2018) established the *Fusarium* diversity associated to citrus trees in Europe, by using morphological and molecular multi-locus analysis. The most commonly isolated species were *F. sarcochroum*, *F. oxysporum* and *Fusarium solani*. They also proposed a new fully-supported lineage, phylogenetically and morphologically divergent, which is named *F. citricola* species complex (FCCSC).

Although the citrus wilt had been observed previously in Mexico, there are only two cases reported in the US National Fungus Collection

de los postulados de Koch, pudimos identificar que los aislados estudiados (pertenecientes al CEFS) fueron el agente causal del marchitamiento en naranjos var. “Valencia” en el Valle del Yaqui. Hallazgos similares han sido reportados en California (Estados Unidos), identificando a *Fusarium solani* y *Phytophthora* spp. como los agentes causales de la descomposición oscura en la corteza de las raíces y la corona inferior del tronco, así como clorosis en hojas y marchitamiento en naranjos y limoneros (Adesemoye *et al.*, 2011). Además, Fogliata *et al.* (2013) reportaron la presencia de pudrición por *Fusarium* en limoneros, e identificaron a *Fusarium oxysporum* como el agente causal. Recientemente, Sandoval-Denis *et al.* (2018) establecieron la diversidad de *Fusarium* relacionada a árboles de cítricos en Europa, al usar el análisis morfológico y molecular. Las especies más comúnmente aisladas fueron *F. sarcochroum*, *F. oxysporum* y *Fusarium solani*; también propusieron un nuevo linaje totalmente apoyado, divergente filogenéticamente y morfológicamente, que se llama complejo de especie *F. citricola* (CEFC).

Si bien el marchitamiento había sido observado previamente en México, existen sólo dos casos reportados en la Colección Nacional de Hongos de EE.UU. (<https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>). Por ello, hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de marchitez por *Fusarium* en naranjos del Valle del Yaqui, causando un oscurecimiento en el sistema vascular de raíces y la muerte de árboles (~ 60 ha y<sup>-1</sup>). Como *Fusarium* es un fitopatógeno virulento, es posible que el uso intensivo del arado para desagregar suelo arcilloso compactado en los huertos comerciales de naranjos en el Valle del Yaqui haya dañado el sistema de raíces de los árboles, lo cual, en combinación con condiciones del suelo y climáticas (temperatura y humedad) fue una de las fuerzas impulsoras para el brote de marchitamiento por *Fusarium*.

(<https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>). Thus, to our knowledge, this is the first report of *Fusarium* wilt on the orange trees in the Yaqui Valley, causing browning of the root vascular system and death of trees (~ 60 ha y<sup>-1</sup>). Since *Fusarium* is a virulent phytopathogen, probably the intensive use of tillage in order to disaggregate compacted clayed soil in the Yaqui Valley’s orange commercial fields damaged the orange trees root system, which in combination with soil and climatic (temperature and humidity) conditions, was the major driving forces for the *Fusarium* wilt outbreak.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge support by Technological Institute of Sonora (ITSON) through Project PROFAPI 2018\_0012. In addition, we express our thanks to Luis Abraham Chaparro, Bernardo Flores, and Levi Flores for molecular and microbiological support.

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) a través del Proyecto PROFAPI 2018_0012. Además, quisiéramos agradecer a Luis Abraham Chaparro, Bernardo Flores y Levi Flores por el apoyo a nivel molecular y microbiológico, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Adesemoye A, Eskalen A, Faber B, O’Connell N. 2011. Current knowledge on *Fusarium* dry root rot of citrus. *Citrograph* 2(7):29-33. http://www.citrusresearch.org/citrograph/nov-dec_citrograph/#more-3226
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol Plant Pathol* 17(2):146-58. <https://10.1111/mpp.12289>.
- de los Santos-Villalobos S, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Peña-Cabriales JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels,

- Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64(1):37–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragon B, Estrada-Mora JC. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9: 191–202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- Fogliata GM, Martínez CV, Acosta ME, Muñoz ML, Ploper LD. 2013. First report of Fusarium rot caused by *Fusarium oxysporum* on lemon in Tucumán, Argentina. *Plant Disease*. 97(7):989. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-12-0069-PDN>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Hoboken. <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- Ochoa JL, Hernández-Montiel LG, Latisnere-Barragán H, León de La Luz JL, Larralde-Corona CP. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5): 352-359. <http://www.redalyc.org/html/724/72450505/>
- Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW. 2018. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia*. 40:1-25. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.01>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de los Santos-Villalobos S. 2018. Plant-assisted selection: a promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. Durum) growth promoting bacteria. *Plant and Soil*. In press. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>
- Villa-Rodríguez E, Lugo-Enríquez C, de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Figueroa López P. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in the Yaqui valley, México. *Plant Disease*, 100(11): 2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. 315–322.