

Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*)

Fungicidas y *Bacillus subtilis* contra hongos aislados en semilla comercial de pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*)

Alicia Zárate-Ramos, Adrián Raymundo Quero-Carrillo, Leonor Miranda-Jiménez, Cristian Nava-Díaz, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México. CP 56230; Leticia Robles-Yerena*, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, México. CP 55740.

*Corresponding author: leticia.robles.i@senasica.gob.mx

Received: April 22, 2021.

Accepted: October 08, 2021.

Zárate-Ramos A, Quero-Carrillo AR, Miranda-Jiménez L, Nava-Díaz C and Robles-Yerena L. 2022. Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*). Mexican Journal of Phytopathology 40(1).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-4>

First DOI publication: December 06, 2021.

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2021.

Abstract. Banderita (*Bouteloua curtipendula*), produces abundant and appetizing forage for cattle under extreme arid conditions. The demand for its seed in Mexico is a direct function of the potential for the establishment of pastures and therefore, the sanitary quality of this is fundamental. Phytopathogenic fungi affect the seed and establishment of prairies. The objective was to evaluate *in vitro* the effect of six agrochemicals and one biological against fungi associated with

Resumen. Banderita (*Bouteloua curtipendula*), produce forraje abundante y apetente para el ganado bajo condiciones áridas extremas. La demanda de su semilla en México está en función directa del potencial de establecimiento de praderas y por ello, la calidad sanitaria de esta es fundamental. Hongos fitopatógenos afectan la semilla y establecimiento de praderas. El objetivo fue evaluar *in vitro* el efecto de seis agroquímicos y un biológico contra hongos asociados a semilla de Banderita, para reducir pérdidas causadas por estos. Se realizaron tratamientos en medio de cultivo PDA combinado con Captan, Tiofanato-metil, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol y *Bacillus subtilis* a concentraciones según el caso de 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L⁻¹, contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*. Se midió el diámetro bidireccional de colonias cada 48 h. La concentración efectiva de 50% se estimó mediante un modelo de regresión no lineal; en relación al porcentaje de inhibición

Banderita seed, to reduce losses caused by these. Treatments were carried out in PDA culture medium combined with Captan, Thiophanate-methyl, Mancozeb, Benomil, Prochloraz, Thiabendazole and *Bacillus subtilis* at concentrations according to the case of 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1.5, 10, 100, 150, 200, 250 and 300 mg L⁻¹, against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum*. The bi-directional colony diameter was measured every 48 h. The effective concentration of 50% was estimated by a non-linear regression model; in relation to the percentage of inhibition of mycelial growth. *Bacillus subtilis* presented higher mycelial inhibition 97% ($P < 0.05$), followed by Thiophanate-methyl (96%), Prochloraz (94%), Captan (93%) and Mancozeb (92%). Benomyl and Thiabendazole showed low inhibition of fungi with 46 and 37%. *B. subtilis* and Thiophanate-methyl are the products with the greatest possibility of controlling pathogens associated with *Banderita* grass seeds.

Key words: biological control, chemical control, *Bacillus subtilis*, CE₅₀.

The arid and semiarid areas of Mexico account for over 50% of the country's area and they are divided into scrublands (85%) and grasslands (15%), as opposed to 150 years ago (PMARP, 2012). Due to this, Sánchez *et al.* (2018) point out the importance of the native grasses to recover the older condition and functionality of grass without altering the vulnerable arid ecosystem. To establish rainfed prairies using seeds (*sensu lato*), there are recommendations such as using complete propagules (glumes, grasses, palea, awns and modified twigs) or caryopses, which will have a larger embryo, more endosperm, seedling weight and vigor, the larger it is (Quero *et al.*, 2016; Quero

de crecimiento micelial. *Bacillus subtilis* presentó mayor inhibición micelial 97% ($P < 0.05$), seguido de Tiofanato-metil (96%), Procloraz (94%), Captan (93%) y Mancozeb (92%). Benomilo y Tiabendazol mostraron baja inhibición de los hongos con 46 y 37%. *B. subtilis* y Tiofanato-metil son los productos con mayor posibilidad de controlar patógenos asociados a semillas de pasto Banderita.

Palabras clave: Control biológico, control químico, *Bacillus subtilis*, CE₅₀.

Las zonas áridas y semiáridas en México representan más de 50% de territorio y se dividen en matorrales (85%) y pastizales (15%), situación contraria hace 150 años (PMARP, 2012). Por ello, Sánchez *et al.* (2018), indican la importancia de las gramíneas nativas para recuperar la antigua condición y funcionalidad del pastizal sin alterar el ecosistema árido vulnerable. Para establecer praderas de temporal utilizando semilla (*sensu lato*), existen recomendaciones como usar propágulos completos (glumas, lemas, paleas, aristas y ramillas modificadas) o cariósides; la cual, entre más grande, tendrá embrión grande, mayor endospermo, peso y vigor de plántula (Quero *et al.*, 2016; Quero *et al.*, 2017). Sin embargo, un problema que se puede tener son los hongos patógenos asociados a semilla de especies forrajeras de importancia que pueden resultar en enfermedades en el ganado (Pirelli *et al.*, 2016), por lo que una semilla infectada y/o contaminada puede introducir un patógeno en un lote/región/país (Sandoval *et al.*, 2012). Los tratamientos de semilla son una herramienta efectiva para combatir los impactos negativos de enfermedades, ayudan a los agricultores a producir cultivos de mejor calidad (FAO y AfricaSeeds, 2019). Los tratamientos erradicantes son más especializados que los preventivos y están diseñados para eliminar

et al., 2017). However, one possible problem one may come across is the pathogenic fungi related to the seeds of important forage species that may result in cattle diseases (Pirelli *et al.*, 2016), therefore one infected and/or contaminated seed may introduce a pathogen in a plot/region/country (Sandoval *et al.*, 2012). Seed treatments are an efficient tool against the negative impacts of diseases, and they help farmers produce higher-quality crops (FAO and AfricaSeeds, 2019). Eradicating treatments are more specialized than preventive ones, and they are designed to eliminate a specific pathogen by physical or chemical means, and can be effective against states of profound infection, since they can penetrate seed tissue and kill pathogens without causing phytotoxicity. The biological control of seed-transmitted pathogens is performed via three mechanisms: resistance induction, competition or elimination of the pathogen and the production of antibiotics, and they are based on the antagonism that microorganisms may have with each other (Maude, 1985). In the market there are contact agrochemicals, which persist on the plant's exterior (foliar application) and stop the fungi from germinating and penetrating the crop's cells, a few of which include include Captan, Zineb, Maneb, Mancozeb, Thiram, Folpet, Quintozane and Clorotalonil (Chirinos *et al.*, 2020). Another group, the systemic agrochemicals, are absorbed via the foliage, stems and roots and where the vascular system helps spread the active compounds throughout the plant (Arriagada, 2000). The use of agrochemicals entails the knowledge of its mechanism of action to avoid the risk of resistance, therefore knowledge on the sensitivity of the pathogen to the fungicide is vital for the adequate sanitary control of the seed (Sandoval *et al.*, 2012). The most widely used method to determine sensitivity is to integrate a pesticide

un patógeno específico por medios físicos o químicos, estos pueden ser efectivos contra estados de infección profundos, ya que pueden penetrar el tejido de las semillas y matar patógenos sin causar fitotoxicidad. El control biológico de patógenos transmitidos por semillas se realiza a través de tres mecanismos, la inducción de resistencia, la competencia o eliminación del patógeno y la producción de antibióticos y están basados en el antagonismo que los microorganismos puedan presentar entre sí (Maude, 1985). Dentro de los agroquímicos, existe en el mercado los de contacto que persiste en el exterior de la planta (aplicación foliar), que evitan que las esporas de los hongos germinen y penetren en las células del cultivo, por mencionar algunos de ellos: Captan, Zineb, Maneb, Mancozeb, Tiram, Folpet, Quintozano y Clorotalonil (Chirinos *et al.*, 2020). Otro grupo de agroquímicos, son los sistémicos, que se absorben a través del follaje, tallos y raíces y donde el sistema vascular ayuda a dispersar los compuestos activos por toda la planta (Arriagada, 2000). El uso de los agroquímicos, conlleva a conocer su modo de acción para evitar riesgo de resistencia, por ello, conocer la sensibilidad del patógeno al fungicida es vital para el buen control sanitario de la semilla (Sandoval *et al.*, 2012). El método más utilizado para determinar sensibilidad, es integrar al medio de cultivo algún producto plaguicida bajo niveles controlados y condiciones de laboratorio (Dhingra y Sinclair, 1995). En México, la necesidad de recursos genéticos forrajeros que garanticen establecimiento, calidad, alta persistencia y adaptación a condiciones regionales hace necesarios estudios sobre sanidad de semilla (Quero *et al.*, 2007) y, además, conocer la sensibilidad de los agroquímicos para integrar el manejo en la sanidad de la semilla. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar el efecto *in vitro* de seis fungicidas y un biológico (*Bacillus subtilis*)

product, under controlled levels and laboratory conditions, into the culture medium (Dhingra and Sinclair, 1995). In Mexico, the need for forage genetic resources that guarantee the establishment, quality, high persistence and adaptation to regional conditions makes studies on seed health crucial (Quero *et al.*, 2007), as well as to know the sensitivity of agrochemicals in order to integrate the management of seed health. Therefore, the aim of this investigation was to determine the *in vitro* effect of six fungicides and one biological one (*Bacillus subtilis*) against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum*.

A. alternata, *B. cynodontis* and *F. incarnatum* cultures were used, isolated from commercial *B. curtipendula* seeds, harvested in 2017 (Quero *et al.*, 2020). The cultures were planted in a PDA (potato-dextrose-agar) medium for eight days, at 28 ± 2 °C. Commercial fungicides were evaluated: contact (Captan and Mancozeb), systemic (Benomyl, Prochloraz, Thiabendazole and Thiophanate-methyl) and a *B. subtilis* based biological product. Final concentrations were calculated based on the active ingredient and the volume of PDA medium to be prepared (Table 1). The effect of the product was determined with the aggregation of the fungicide

contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*.

Se emplearon colonias de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*, aisladas de semilla comercial de *B. curtipendula* cosechada en 2017 (Quero *et al.*, 2020). Las colonias se sembraron en medio PDA (papa-dextrosa-agar) durante ocho días, a 28 ± 2 °C. Se evaluaron fungicidas comerciales: de contacto (Captan y Mancozeb), sistémicos (Benomilo, Procloraz, Tiabendazol y Tiofanato-metil) y un producto biológico a base de *B. subtilis*. Las concentraciones finales se calcularon con base al ingrediente activo y volumen a preparar de medio PDA (Cuadro 1). El efecto del producto se determinó por agregación del fungicida al medio de cultivo PDA (Dhingra y Sinclair, 1995) a diferente concentración: 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L⁻¹. Se sembró un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro en el centro de cajas Petri, con tres repeticiones por concentración. Los discos se obtuvieron de colonias puras de seis días de crecimiento en PDA, incubadas en oscuridad a 25 ± 2 °C. Se midió el diámetro bidireccional de colonias cada 48 h, hasta que el testigo llenó la caja y, por promedio, se calculó el crecimiento micelial:

Table 1. Fungicides, active ingredients and concentrations used against isolated fungi (*A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum*) in commercial *Bouteloua curtipendula* seeds.

Cuadro 1. Fungicidas, ingrediente activo y concentración utilizada contra hongos aislados (*A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*) en semilla comercial de *Bouteloua curtipendula*.

Fungicida	Ingrediente Activo	Concentración (mg L ⁻¹)
Captan 50 WP®	Captan	0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100, 200
Manzate 200®	Mancozeb	1, 150, 250, 300
Promyl 50 PH®	Benomilo	1, 5, 10, 100
Sportak® 45 CE	Procloraz	0.001, 0.01, 0.1, 1
Tecto 60®	Tiabendazol	0.1, 0.5, 1, 5
Prontius®	Tiofanato-metil	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10
Serenade Soil®	<i>Bacillus subtilis</i>	0.005, 0.01, 0.05, 1

to the PDA culture medium (Dhingra and Sinclair, 1995) at different concentrations: 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 and 300 mg L⁻¹. A mycelium disk, 0.5 cm in diameter, was planted in the center of Petri dishes, with three repetitions per concentration. The disks were obtained from pure cultures with a growth of six days in PDA and incubated in the dark at 25 ± 2 °C. The bidirectional diameter of cultures was measured every 48 h, until the control filled the dish, and with the average, the mycelial growth was calculated:

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

where: *IM*, inhibition of mycelial growth (%); *CML*, Mycelial growth; *CMI*, Influenced mycelial growth (Patiño and Rodríguez, 2001).

A completely random design was used and, using the data on inhibition percentages, a simple analysis of variance was carried out for each pathogen. Since the normal distribution of data was not carried out, these were transformed by the arcsine (Gabriel *et al.*, 2021) and the comparison of averages using Tukey's test ($p \leq 0.05$) using the statistics program R. The effective concentration (CE₅₀) was obtained by transforming each concentration [log(x)] and relating it with the percentage of inhibition.

In most treatments, the mycelial growth of the pathogens was reduced in comparison with the control. Both the sensitivity of *A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum* to the different concentrations of the fungicides evaluated, and the calculation of the highest effective concentration that inhibits 50% of the mycelial growth of the fungus (CE₅₀) (Table 2), were determined eight days after planting.

Effect on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. Thiabendazole and Benomyl in different

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

dónde: *IM*, inhibición crecimiento micelial (%); *CML*, Crecimiento micelial; *CMI*, Crecimiento micelial influenciado (Patiño y Rodríguez, 2001).

Se utilizó un diseño completamente al azar y, con los datos de porcentaje de inhibición, se realizó un análisis de varianza simple, por patógeno. Al no cumplirse la distribución normal de datos, estos se transformaron mediante arcoseno $y = \arcsin \sqrt{\frac{y}{100}}$ (Gabriel *et al.*, 2021) y la comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el programa estadístico R. La concentración efectiva (CE₅₀) se obtuvo al transformar cada concentración [log(x)] y relacionarla con el porcentaje de inhibición.-

En la mayoría de los tratamientos se obtuvo una reducción de crecimiento micelial de los patógenos con respecto al control. Tanto la sensibilidad de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*, a las diferentes concentraciones de los fungicidas evaluados, como el cálculo de la mayor concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial del hongo (CE₅₀) (Cuadro 2), fueron determinadas a ocho días después de la siembra.

Efecto sobre el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*. Tiabendazol y Benomilo en diferentes concentraciones no fueron eficientes para inhibir el hongo; lo anterior, debido a que se observó un máximo de 7.2 y 10.8% de inhibición con dosis más altas 5 y 100 mg L⁻¹, respectivamente (Cuadro 2). Estos datos coinciden con Herrera *et al.* (2011) y Cristóbal *et al.* (2013), quienes indicaron que, con dosis de 500 y 450 mg L⁻¹ de Benomilo, se inhibe 35.6 y 45% del crecimiento de *Alternaria* spp., concentraciones mayores a las evaluadas en este experimento. En el caso de Captan se observó inhibición de 83.3% a 200 mg L⁻¹, superior a lo que reportaron Parveen *et al.* (2013)

Table 2. Mycelial growth inhibition in *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum* with different concentrations of fungicides and *Bacillus subtilis*.

Cuadro 2. Inhibición de crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* con diferentes concentraciones de fungicidas y *Bacillus subtilis*.

Fungicida	Concentración mg L ⁻¹	% de Inhibición del crecimiento micelial		
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bipolaris cynodontis</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>
Captan	0.1	0.0	0.0	2.3
	0.5	0.0	0.4	6.4
	1	3.6	7.2	8.6
	5	7.4	17.6	10.0
	10	8.0	19.7	51.5
	100	77.0	100	89.5
	200	83.3	100	97.8
Mancozeb	1	14.3	7.9	1.7
	150	84.5	100	84.3
	250	84.5	100	91.7
	300	85.0	100	93.0
Benomilo	1	2.2	21.5	5.0
	5	5.5	19.5	25.0
	10	7.7	18.4	46.3
	100	10.8	27.7	100
Procloraz	0.001	6.6	24.7	22.5
	0.01	37.6	41.5	67.9
	0.1	56.3	80.0	78.4
	1	84.1	100	100
Tiabendazol	0.1	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	1.4
	1	1.5	1.2	53.1
	5	7.2	4.5	100
Tiofanato-metil	0.01	0.0	0.0	9.9
	0.05	0.0	4.2	15.1
	0.1	0.0	7.9	29.8
	0.5	40.2	-	50.2
	1	52.5	76.1	62.5
	5	57.5	-	65.0
	10	100	100	88.5
<i>B. subtilis</i>	0.005	90.2	94.7	96.9
	0.01	92.0	100	100
	0.05	93.0	100	100
	1	93.0	100	100

concentrations were not efficient in inhibiting the fungus, since a maximum inhibition of 7.2 and 10.8% were observed with higher doses and 5 and 100 mg L⁻¹, respectively (Table 2). These data coincide with Herrera *et al.* (2011) and Cristóbal

con 36% de inhibición de *A. alternata* a la misma concentración. Mancozeb mostró datos similares a Captan con 85% de inhibición, pero a dosis superior (Cuadro 2). Malandrakis *et al.* (2015) indicaron datos similares para *A. alternata*. Procloraz

et al. (2013), who indicated that, with doses of 500 and 450 mg L⁻¹ of Benomyl, 35.6 and 45% of the growth of *Alternaria* spp. is inhibited; these concentrations are higher than those evaluated in this experiment. In the case of Captan, an inhibition of 83.3% was observed at 200 mg L⁻¹, higher than what was reported by Parveen *et al.* (2013) with an inhibition of 36% of *A. alternata* at the same concentration. Mancozeb displayed similar data to Captan with an 85% inhibition, but at a higher dose (Table 2). Malandrakis *et al.* (2015) indicated similar data for *A. alternata*. Prochloraz displayed a similar inhibition rate to Mancozeb and Captan, with 84.1%, but at a lower dose (1 mg L⁻¹), and therefore this product may be feasible for the control of this fungus. Iacomí *et al.* (2004) report an inhibition of 100% for *A. alternata* in radish plants, higher than the data reported for this work. Only Thiophanate-methyl (10 mg L⁻¹) produced an inhibition of 100% at the highest dose. *B. subtilis*, starting at 0.05 and 1 mg L⁻¹, produced an inhibition of 93%, similar to reports by Ñacato *et al.* (2018), who determined *B. subtilis* to be highly efficient for the biological control against *Alternaria* spp. (Table 2).

Effect on the mycelial growth of *Bipolaris cynodontis*. Thiabendazole (5 mg L⁻¹) and Benomyl (100 mg L⁻¹) displayed the lowest efficiency in the inhibition of the mycelial growth of *B. cynodontis*, with inhibitions of 4.5 and 27.7%. Alburqueque and Gusqui (2018) reported an inhibition of 10.3% on *Phytophthora infestans*; 37%, for *Botrytis cinerea* and 100% for *Rhizoctonia solani*, at 200 mL L⁻¹ of Thiabendazole, with a higher dose in comparison with this investigation.

Captan, Mancozeb, Prochloraz and Thiophanate-methyl inhibited the fungus by 100% at high concentrations, which was lower than reports by Imran *et al.* (2013), who registered an inhibition of

presentó inhibición similar a Mancozeb y Captan, con 84.1%, pero, a dosis inferior (1 mg L⁻¹); por tanto, este producto podría ser viable para el control de este hongo. Iacomí *et al.* (2004) reportan inhibición del 100% para *A. alternata* en rábano, superior a los datos reportados en este trabajo. Solo Tiofanato-metil (10 mg L⁻¹) inhibió 100% a la dosis más alta evaluada. Para *B. subtilis*, a partir de 0.05 y 1 mg L⁻¹ inhibió el 93%, similar a lo reportado por Ñacato *et al.* (2018), quienes determinaron a *B. subtilis* como altamente eficiente para el control biológico contra *Alternaria* spp. (Cuadro 2).

Efecto sobre el crecimiento micelial de *Bipolaris cynodontis*. Tiabendazol (5 mg L⁻¹) y Benomilo (100 mg L⁻¹), fueron los de menor eficiencia para inhibir el crecimiento micelial de *B. cynodontis* con 4.5 y 27.7% de inhibición. Alburqueque y Gusqui (2018), reportaron 10.3% de inhibición de *Phytophthora infestans*; 37%, para *Botrytis cinerea* y 100%, para *Rhizoctonia solani*, a 200 mL L⁻¹ de Tiabendazol, con dosis superior comparado con esta investigación.

Captan, Mancozeb, Prochloraz y Tiofanato-metil inhibieron 100% del hongo a altas concentraciones evaluadas, datos inferiores a lo reportado por Imran *et al.* (2013), donde registraron el 53% de inhibición de *B. oryzae* a 50 mg L⁻¹. Arce *et al.* (2019), puntualizaron que los porcentajes de inhibición de *Bipolaris* spp. con Benomil, Mancozeb y Tiofanato-metil fueron bajos, en comparación a los valores observados en la presente investigación (Cuadro 2). Rondón *et al.* (2006) reportan datos similares de inhibición (100%) en *Colletotrichum gloeosporioides* con Prochloraz y a partir de 100 mg L⁻¹.

Para el caso particular del producto biológico *B. subtilis*, este fue más eficiente que los fungicidas químicos a las concentraciones evaluadas, con porcentaje de inhibición micelial de 94.7 a 100%. Datos similares a aquellos reportados por Rivero

53% of *B. oryzae* at 50 mg L⁻¹. Arce *et al.* (2019) pointed out that the percentages of inhibition of *Bipolaris* spp. with Benomyl, Mancozeb and Thiophanate-methyl were low in comparison with the values observed in this investigation (Table 2). Rondón *et al.* (2006) report similar data for inhibition (100%) in *Colletotrichum gloeosporioides* with Prochloraz and starting at 100 mg L⁻¹.

For the particular case of the biological product *B. subtilis*, this was more efficient than the chemical fungicides at the concentrations evaluated, with a percentage of mycelial inhibition between 94.7 and 100%. The data are similar to those reported by Rivero *et al.* (2008). For *B. subtilis*, a CE₅₀ of 0.00023 mg L⁻¹ is reported. This concentration is lower than the rest of the fungicides evaluated (Table 3).

Effect on the mycelial growth of *Fusarium incarnatum*. Thiophanate-methyl displayed a lower efficiency of mycelial inhibition for the fungus in the highest dose, with 88.5%. The rest of the fungicides displayed an efficiency of mycelial inhibition between 93 and 100% in the highest doses evaluated. These data show the susceptibility of the fungus to the fungicides evaluated. Regarding CE₅₀, Mancozeb requires high doses (300 mg L⁻¹)

et al. (2008). Para *B. subtilis* se reporta un CE₅₀ de 0.00023 mg L⁻¹, concentración inferior al resto fungicidas evaluados (Cuadro 3).

Efecto sobre el crecimiento micelial de *Fusarium incarnatum*. El Tiofanato-metil presentó menor eficiencia de inhibición micelial para el hongo en la dosis más alta evaluada, con 88.5% de inhibición. El resto de los fungicidas presentaron eficiencia de inhibición micelial que osciló de 93 a 100%, en las dosis más elevadas evaluadas. Estos datos evidencian la susceptibilidad del hongo a los fungicidas evaluados. Respecto a CE₅₀, Mancozeb requiere altas dosis (300 mg L⁻¹) para inhibir 50% de hongo, por lo que su eficiencia fue baja. Por otra parte, *B. subtilis* (CE₅₀ a 0.00014 mg L⁻¹) fue eficiente en todas las dosis evaluadas, con inhibición que osciló de 97 a 100%, mostrando que, a partir de 0.01 mg L⁻¹ inhibió el 100% a *F. incarnatum*. Romero *et al.* (2015), obtuvieron datos similares con *B. subtilis* a dosis de 0.01 mg L⁻¹ contra *F. solani*, aislado de chayote; por otro lado, Song *et al.* (2014) observaron que a concentración de 1 x 10⁶ UFC de *B. subtilis*, se alcanzó un control de 70% contra *F. incarnatum*, aislado de raíz de Ginseng (*Panax ginseng*).

Table 3. Doses of the fungicides that inhibit 50% of the mycelial growth in fungi isolated from commercial *Bouteloua curtipendula* seeds.

Cuadro 3. Dosis de los fungicidas que inhiben 50% del crecimiento micelial en hongos aislados de semilla comercial de *Bouteloua curtipendula*.

Producto	CE ₅₀ mg L ⁻¹		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bipolaris cynodontis</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>
Captan	61.90	37.44	16.48
Mancozeb	4.40	9.50	36.00
Benomilo	>100	>100	14.50
Prochloraz	0.014	0.018	0.004
Tiabendazol	>5.00	>5.00	2.66
Tiofanato-metil	0.77	0.49	0.28
<i>B. subtilis</i>	0.00015	0.00023	0.00014

to inhibit 50% of the fungus, therefore its efficiency was low. On the other hand, *B. subtilis* (CE_{50} at $0.00014 \text{ mg L}^{-1}$) was efficient in all doses evaluated, with inhibitions ranging from 97 to 100%, showing that, starting at 0.01 mg L^{-1} , it inhibited *F. incarnatum* by 100%. Romero *et al.* (2015) obtained similar data with *B. subtilis* at doses of 0.01 mg L^{-1} against *F. solani* isolated from chayote. On the other hand, Song *et al.* (2014) observed that at a concentration of 1×10^6 UFC of *B. subtilis*, a control of 70% was reached against *F. incarnatum*, isolated from ginseng (*Panax ginseng*) roots.

Captan inhibited an average of 93% of the mycelial growth of the three fungi (Table 3), due to its multisite action that interferes with the cell respiration mechanism, making mycelial development difficult and translocating to different tissues to seeds or soil from the treatment (Peláez *et al.*, 2016). Mancozeb presented an efficiency of 93%. Its mechanism of action is based on the modification and inactivation of proteins sensitive to redox, such as those for transcription, translation, and DNA oxidative stress, as well as other metabolic processes that result in cytotoxicity and with a multisite action that generates no resistance in the pathogen (Roede and Miller, 2014). Benomyl was only effective for *F. incarnatum*, which, like Thiabendazole, was effective only for *Fusarium*; this was also observed with Benomyl, since they belong to the same chemical group and have similar mechanisms of action (Peláez *et al.*, 2016). Sandoval *et al.* (2011) mentioned that *Fusarium* is sensitive to Benomyl. However, it is likely to be mutagenic and may increase the resistance of pathogens to its effect. On the other hand, Prochloraz displayed an effectiveness of 94%. This fungicide belongs to the chemical group of the Imidazoles, with a preventive, interlaminar, systemic, and curative action that inhibits the biosynthesis of ergosterol in the fungal cell membrane, which also relates to cell

Captan inhibió en promedio, 93% del crecimiento micelial de los tres hongos (Cuadro 3); lo anterior, debido a su modo de acción multisitio que interfiere con el mecanismo de respiración celular, dificultando el desarrollo micelial y translocándose hacia diversos tejidos a partir del tratamiento a semillas o suelo (Peláez *et al.*, 2016). Mancozeb presentó efectividad de 93%, su mecanismo de acción se basa en la modificación e inactivación de proteínas sensibles a redox como aquellas para transcripción, traducción y estrés oxidativo del ADN, además de otros procesos metabólicos que resultan en citotoxicidad; además, a través de un modo de acción de multisitio que no genera resistencia en el patógeno (Roede y Miller, 2014). Benomilo solo fue efectivo para *F. incarnatum*; al igual que Thiabendazol, resultó efectivo solo para *Fusarium*; lo anterior se observó también con Benomilo, dado que pertenecen al mismo grupo químico y poseen similitud de acción (Peláez *et al.*, 2016). Sandoval *et al.* (2011) mencionaron que *Fusarium* es sensible a Benomilo; sin embargo, es probable que sea mutagénico y puede incrementar el grado de resistencia de patógenos ante su efecto. Por otro lado, Prochloraz presentó efectividad de 94%, este fungicida pertenece al grupo químico de Imidazoles, con acción preventiva, translaminar, sistémica y curativa que inhibe la biosíntesis de ergosterol en la membrana celular fúngica, mismo que se relaciona con el crecimiento y división celular (Tapia, 2005). Tiofanato-metil presentó alta efectividad de inhibición (96%) de crecimiento de las tres especies de hongos investigadas, este es un fungicida sistémico (con movimiento en la planta a través de xilema), de tipo preventivo; el cual, causa anomalías en la germinación de esporas, interfiere en la mitosis y la síntesis del ADN de las células fúngicas (Alburquerque y Gusqui, 2018). Es reconocido que el tratamiento a semillas controla patógenos de raíz como *Rhizoctonia* y *Fusarium* spp.; sin embargo,

growth and division (Tapia, 2005). Thiophanate-methyl displayed a high effectiveness in the inhibition (96%) of growth in the three species of fungi investigated. This is a systemic fungicide (with movement in the plant through the xylem), of the preventive type, which causes abnormalities in the germination of spores, interferes in mitosis and the DNA synthesis of fungal cells (Alburqueque and Gusqui, 2018). The treatment on seeds is known to control root pathogens, such as *Rhizoctonia* and *Fusarium* spp., although the best inhibitor was the biological inhibitor *B. subtilis*, since the minimum concentration evaluated (0.005 mg L^{-1}) inhibited 97% of the mycelial growth of the three fungal species of phytopathogenic fungi isolated earlier and defined as dominant in commercial *B. curtipendula* seeds. *B. subtilis* has been identified as a producer of a wide range of bioactive compounds that potentially inhibit the growth of phytopathogenic fungi (Bottero *et al.*, 2017), which have several action mechanisms, altering cell processes such as the intracellular calcium homeostasis, energetic metabolism, and the processing of RNA (Villareal *et al.*, 2018).

The evaluated concentrations are represented by their logarithmic analog, resulting in the sigmoidal line in which *B. subtilis* establishes a clear antagonistic response and has a high resistance to handling and easy acquisition in the market, making it a valuable tool to optimize the establishment of prairies of this species, thus improving the seed's health safety.

The results show the effectiveness of the fungicides evaluated for the control of the three fungi, with the exception of Benomyl and Thiabendazole. Combining contact + systemic fungicides is a common practice that supplements the treatment, ensuring the protection of the seed and its germination by suppressing the action of phytopathogenic fungi (Arriagada, 2000).

el mejor inhibidor fue el biológico *B. subtilis*; lo anterior, dado que a la concentración mínima evaluada (0.005 mg L^{-1}) inhibió 97% del crecimiento micelial de las tres especies de hongos fitopatógenos aislados previamente y definidos como dominantes en semilla comercial de *B. curtipendula*. Se ha identificado a *B. subtilis* como productor de una amplia gama de compuestos bioactivos potencialmente inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos (Bottero *et al.*, 2017); los cuales, tienen múltiples mecanismos de acción, alterando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento de ARN (Villareal *et al.*, 2018).

Las concentraciones evaluadas están representadas por su análogo logarítmico, dando como resultado la línea sigmoidea donde *B. subtilis* establece una marcada respuesta antagonica, la cual, además, posee elevada resistencia al manejo y de fácil adquisición en el mercado, por lo que es una herramienta valiosa para optimizar el establecimiento de praderas de esta especie, mejorando así la sanidad de la semilla.

Los resultados muestran la efectividad de los fungicidas evaluados para el control de los tres hongos; con excepción de Benomilo y Tiabendazol. La combinación de fungicidas contacto + sistémico es una práctica común que complementan el tratamiento, asegurando la protección de la semilla y su germinación suprimiendo la acción de hongos patógenos (Arriagada, 2000).

Los fungicidas de contacto Captan y Mancozeb y los sistémicos Procloraz y Tiofanato-metil dieron resultados variables para el control de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*. Los fungicidas sistémicos inhibieron el crecimiento micelial a bajas concentraciones; lo anterior, en comparación con aquellas alcanzadas por Captan y Mancozeb. No es recomendable el uso de Benomilo y Tiabendazol debido a la baja inhibición presentada. *Bacillus*

The contact fungicides Captan and Mancozeb and systemic fungicides Prochloraz and Thiophanate-methyl gave variable results for the control of *A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum*. The systemic fungicides inhibited the mycelial growth at low concentrations in comparison with those reached by Captan and Mancozeb. The use of Benomyl and Thiabendazole is not recommendable due to the low inhibition displayed. *Bacillus subtilis* displayed the highest mycelial growth, starting at 90% for the lowest concentration evaluated (0.005 mg L⁻¹), therefore representing an important alternative for the improvement of the sanitary quality of the *Bouteloua curtipendula* seogens, due to its low cost and availability in the market.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Línea de Generación y Aplicación de Conocimiento: Innovación Tecnológica y Calidad Alimentaria en Ganadería of the Colegio de Postgraduados. To CONACyT, for the Master of Science scholarship granted to the main author.

LITERATURE CITED

- Alburquerque AD and Gusqui MR. 2018. Effectiveness of chemical fungicides for *in vitro* control of different phytopathogens in controlled conditions. *Arnaldea* 25(2): 489-498. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v25n2/a09v25n2.pdf>
- Arce AC, Varela BI y Torres PS. 2019. Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana* 30(2): 381-393. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.32653>
- Arriagada V. 2000. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 228p. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/13128>
- Bottero JY, Rose J, De Garidel C, Masion A, Deutsch T, Brochard G and Lanone S. 2017. Serenade: Safer and ecodesign research and education applied to nanomaterial development, the new generation of materials safer by design. *Environmental Science: Nano*, 4(3): 526-538. <https://doi.org/10.1039/C6EN00282J>
- Chirinos DT, Castro R, Cun J, Castro J, Peñarrieta S, Solis L y Geraud F. 2020. Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 21(1): e1276. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276
- Cristóbal AJ, Navarrete MZ, Herrera PE, Mis MM, Tun SM y Ruiz SE. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genética y evaluación de fungicidas para su control. *Revista Protección Vegetal* 28(2): 138-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf>
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 132-163p. [https://www.scrip.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2200210](https://www.scrip.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2200210)
- FAO y AfricaSeeds. 2019. Materiales para capacitación en semillas - Módulo 3: Control de calidad y certificación de semillas. Roma. 128 p. <http://www.fao.org/3/ca1492es/CA1492ES.pdf>
- Flores JDY, Villegas AY, Castro RR, Carrillo RJC, Castañeda HE y Gómez VA. 2019. Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos en el rendimiento de avena forrajera. *Agroproductividad* 12(8): 23-27. <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1446>
- Gabriel OJ, Valverde LA, Indacochea GB, Castro PC, Vera TM, Aleivar CJ y Vera VR. 2021. Diseños Experimentales: Teoría y Práctica para Experimentos Agropecuarios. Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Ecuador. 146 p. <http://142.93.18.15:8080/jspui/handle/123456789/116>
- Herrera PE, Bacab PIM, Alejo JC, Tun SJM y Ruiz SE. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad* 15(4):231-236. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>

AGRADECIMIENTOS

A la Línea de Generación y Aplicación de Conocimiento: Innovación Tecnológica y Calidad Alimentaria en Ganadería del Colegio de Postgraduados. A CONACyT, por la beca de Maestría en Ciencias otorgada a la primera autora.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Iacomini VB, Avenot H, Bataillé SN, Laurent E and Simoneau P. 2004. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection* 23(6): 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.003>
- Imran AHM, Hussein N, Ali S, Ahmed KJ, Saleem K and Babar MM. 2013. Behavior of *Bipolaris oryzae* at different temperatures, culture media, fungicides and rice germplasm for resistance. *Pakistan J of Phytopathology* 25(1): 8-90. [https://www.researchgate.net/publication/270452094\\_Behaviour\\_of\\_Bipolaris\\_oryzae\\_at\\_different\\_temperatures\\_culture\\_media\\_fungicides\\_and\\_rice\\_germplasm\\_for\\_resistance](https://www.researchgate.net/publication/270452094_Behaviour_of_Bipolaris_oryzae_at_different_temperatures_culture_media_fungicides_and_rice_germplasm_for_resistance)
- Madia MC y Perris S. 1994. Hongos patógenos en semillas de especies forrajeras tropicales. Nota de investigación. *Pasturas Tropicales*, 16(1): 41-43. [https://tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Elements/DOCUMENTS/1994-vol16-rev1-2-3/Vol16\\_rev1\\_94\\_art9.pdf](https://tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Elements/DOCUMENTS/1994-vol16-rev1-2-3/Vol16_rev1_94_art9.pdf)
- Malandrakis AA, Apostolidou ZA, Markoglou A and Flouri F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitor and Mancozeb. *European J of Plant Pathology* 142(3): 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>
- Maude RB. 1985. Erradicative seed treatment. *Seed Science and Technology*. 11, 907-920. <https://worldveg.tind.io/record/17569>
- Merlington AA. 2014. Management options for control of *Fusarium* dry rot (*Fusarium* spp.) and potato common scab (*Streptomyces* spp.) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Michigan. Michigan State University. Thesis–Master of Science. 148 p. <https://doi.org/doi:10.25335/M5GX8R>
- Ñacato SCA, Valencia GMF y Acurio VRD. 2018. Aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var. *italica*. Tesis de Grado. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>
- Patiño L. y Rodríguez M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinifera*), variedad chardonnay en el viñedo dan Martin en el municipio de Sogamoso. Sogamoso: Trabajo de grado Pontificia Universidad Javeriana. 12-14
- Parveen S, Ganie AA and Wani AH. 2013. *In vitro* efficacy of some fungicides on mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Mucor pyriformis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46(10): 1230–1235. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.763617>
- Peláez ÁA, de los Santos VS, Yépez EA, Parra CFI y Reyes RRT. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6): 1401-1412. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n6/2007-0934-remexca-7-06-1401.pdf>
- Pirelli GJ, Anderson NP, Craig AM and Young CA. 2016. Endophyte toxins in grass and other feed sources. Risk to Livestock. EM-9156. Oregon State University. 10p. <https://catalog.extension.oregonstate.edu/em9156>
- PMARP (Plan Maestro de la Alianza Regional para la Conservación de los Pastizales). 2012. Plan Maestro de la Alianza Regional para la Conservación de los Pastizales del Desierto Chihuahuense 2011-2016. J. C. Guzmán-Aranda, J. Hoth y H. Berlanga (eds.). Comisión para la Cooperación Ambiental. Montreal, Canadá. 64p
- Quero CAR, Hernández GFJ, Velázquez MM, Gámez VH, Landa SP y Aguilar LP. 2016. Métodos de establecimiento de pasturas en zonas áridas de México utilizando semillas crudas o carióspsides. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales* 4(1):29-37. [https://doi.org/10.17138/tgft\(4\)29-37](https://doi.org/10.17138/tgft(4)29-37)
- Quero CAR, Hernández FJ, Pérez GP, Hernández RA, García LG, Landa SP y Ramírez SES. 2017. Germinación de carióspsides clasificados por tamaño y diásporas de cuatro pastos para temporal semiárido. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(3):489-502. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.26>
- Quero CAR, Enríquez QJF y Miranda JL. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o *status quo*. *Interciencia* 32(8): 566-571. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33932812.pdf>
- Quero CAR, Zárate RA, Robles YL, Nava DC, Miranda JL and González MS. 2020. Pathogenic fungi associated to commercial seed of Mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*. *Mexican J of Phytopathology* 38(2): 198-214. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-4>
- Rivero G.D, Martínez B, Ramírez AM, Cruz A y Rodríguez PAT. 2008. Actividad antifúngica *in vitro* de las quitosanas k1 y sigma frente a *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem. *Rev. Protección Vegetal* 23 (1): 43-47. [https://www.researchgate.net/publication/262502313\\_ACTIVIDAD\\_ANTIFUNGICA\\_in\\_vitro\\_DE\\_LAS\\_QUITOSANAS\\_k1\\_y\\_SIGMA\\_FRENTE\\_A\\_Bipolaris\\_oryzae\\_B\\_de\\_Haan\\_Shoem](https://www.researchgate.net/publication/262502313_ACTIVIDAD_ANTIFUNGICA_in_vitro_DE_LAS_QUITOSANAS_k1_y_SIGMA_FRENTE_A_Bipolaris_oryzae_B_de_Haan_Shoem)
- Roede JR and Miller GW. 2014. Mancozeb. *Encyclopedia of Toxicology*, 144-146. Elsevier Inc. (consultation, august 2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00157-3>
- Rondón O, Sanabria de AN y Rondón A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Tropical* 56(2): 219-235. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2006000200005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2006000200005)
- Romero VSD, Tlapal BB, Cadena IJ, Nieto DÁ y Arévalo GL. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su control *in vitro*. *Revista Agronomía Costarricense* 39(2): 19-32. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/436/43642603002/43642603002.pdf>
- Sandoval CRA, Martínez PRÁ, Hernández IM, Fernández EE, Arvizu MS and Soto ML. 2011. Postharvest biological and chemical control of *Fusarium stilboides* on bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(2): 161-172. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2011000200009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000200009)
- Sandoval ME, Leyva MSG, Villaseñor MHE, Rodríguez GMF y Mariscal ALA. 2012. Diversidad de hongos en semilla de trigo de temporal. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:145-149. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v30n2/v30n2a5.pdf>

- Sánchez AJF, Wehenkel C, Carrete CFO, Murillo OM, Herrera TE and Quero CAR. 2018. Establishment attributes of *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. Populations native to México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(3): 237-243. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v41n3/0187-7380-rfm-41-03-237.pdf>
- Song M., Yun HY and Kim YH. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of Ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *J of Ginseng Research* 38(2): 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.016>
- Tapia C. 2005. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Meadwave* 5(4): 3548. <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3548>
- Villareal DF, Villa RE, Cira CL, Estrada AI, Parra CF y de los Santos VS. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>