

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 32 NÚMERO 1, 2014



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

Revista Mexicana de Fitopatología
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C.

Editor en Jefe (Editor in Chief)

Dr. Gustavo Mora Aguilera Colegio de Postgraduados

Editor Técnico (Technical Editor)

Lic. Ivonne Aracely Sáenz Ortega RMF

Editoras(es) Adjuntos (Senior Editors)

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía UMSNH
Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro CIAD
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada CIAD
Dr. Guillermo Fuentes Dávila INIFAP
Dr. Ángel Rebollos Alviter Universidad Autónoma Chapingo

Comité Editorial Internacional (International Editorial Advisory Board)

Dra. Liliana Aragón Caballero Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú
Dra. Anna Maselli Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela
Dr. R. Kenneth Horst Cornell University, USA
Dr. Eduardo R. French Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú
Dr. Rodrigo Valverde Louisiana State University, USA
Dr. Charles L. Wilson USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA
Dr. André Lévesque Agriculture and Agri-Food, Canada
Dr. Rafael M. Jiménez Díaz Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España
Dr. Terence L. Robinson Cornell University, USA
Dr. Kenneth Evans Rothamsted Research, UK
Dr. Louis K. Prom USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA
Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana Auburn University, USA
Dr. Sami Jorge Michereff Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil
Dr. Marco Hernández Bello USDA-ARS, Postdoctoral Research Associate, USA

Editoras(es) Asociados (Associate Editors)

Dra. María de Jesús Yáñez Morales Colegio de Postgraduados
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada CIAD
Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados
Dr. Gabriel Gallegos Morales Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Dr. Ignacio Cid del Prado Vera Colegio de Postgraduados
Dr. Jairo Cristóbal Alejo Tecnológico Nacional de México
Dr. Roberto Montes Belmont Instituto Politécnico Nacional

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

Volumen 32, número 1, 2014

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Scientific articles)

Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri* {Evaluation of native yucatecan plant extracts against *Alternaria chrysanthemi* and antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*}. Vargas Díaz AA, Gamboa Angulo M, Medina Baizabal IL, Pérez Brito D, Crsitóbal Alejo J y Ruiz Sánchez E.

Incidencia de infecciones virales mezcladas en un área de producción de fresa en Guanajuato, México {Incidence of mixed viral infections in a strawberry producing area in Guanajuato, Mexico}. Contreras Paredes CA, Silva Rosales L, Gallegos V, Ortiz Castellanos ML, Jofre Garfías A E y Dávalos González PA.

Comportamiento de la pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) en vivero de nogales {Behavior of the cotton root rot (*Phymatotrichopsis omnivora*) in a pecan plant nursery}. Samaniego Gaxiola JA, Fontes Puebla AA, Tarango Rivero SH y Pedroza Sandoval A.

Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México {Detection of virus affecting chilli pepper crop (*Capsicum annuum* L.) in Chihuahua, Mexico}. González Franco AC, Gil Langanica EM, Robles Hernández L, Núñez Barrios A, Pérez Leal R, Hernández Rodríguez OA y Pérez Moreno L.

Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas {Molecular characterization and pathogenicity assays of *Colletotrichum acutatum*, causal agent for lime anthracnose in Texas}. Ruiz A, Parra CC, da Graça JV, Salas B, Malik NSA y Kunta M.

Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium* {Colonization of *Trichoderma* and *Bacillus* in seedlings of *Agave tequilana* weber, var. Azul and the effect on the plant physiology and *Fusarium* density}. Tlapal Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI y Rubio Cortes R.

1

12

26

38

52

62

Portada: Síntomas de la enfermedad de la antracnosis del limón (KLA) en Texas. Gel de agarosa que muestra fragmentos de PCR producidos por la amplificación de aislado de KLA.

Original: Madhurababu Kunta

Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas Contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad Antifúngica de *Acalypha gaumeri*

Evaluation of Native Yucatecan Plant Extracts Against *Alternaria chrysanthemi* and Antifungal Activity Spectrum of *Acalypha gaumeri*

Arely A. Vargas Díaz, Marcela Gamboa Angulo, Irma L. Medina Baizabal, Daisy Pérez Brito, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Chuburná, Mérida, Yucatán, CP 97200, México; **Jairo Cristóbal Alejo, Esaú Ruiz Sánchez,** Departamento de Posgrado, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, Yucatán, CP 97345, México. Correspondencia: mmarcela@cicy.mx

(Recibido: Mayo 19, 2014 Aceptado: Agosto 14, 2014)

Vargas Díaz AA, Gamboa Angulo M, Medina Baizabal IL, Pérez Brito D, Crsitóbal Alejo J y Ruiz Sánchez E. 2014. Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 1-11.

Resumen. Un total de 24 extractos (acuosos y etanólicos) de nueve especies de plantas se evaluaron contra *Alternaria chrysanthemi*, el agente causal del tizón foliar en crisantemo. La mayor actividad antifúngica se detectó con los extractos etanólico y acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri* (inhibición del crecimiento, IC=75 y 69%, respectivamente), y los acuosos del tallo y hoja de *Bonellia flammae* (IC= 63 y 50%, respectivamente). Estos extractos activos subsecuentemente se evaluaron en el bioensayo de dilución en agar, donde el extracto etanólico (EE) de la raíz de *A. gaumeri* causó una alta inhibición del crecimiento micelial y esporulación, con una Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 0.53 mg/mL contra la IC de *A. chrysanthemi*. Este extracto se particionó y la mayor actividad se observó en la fracción de mediana polaridad (ACR-1E) con una CI₅₀=0.13 mg/mL. Esta fracción completamente inhibe la infección causada por *A. chrysanthemi* en las hojas de crisantemo a una concentración de 85 µg/cm². También el EE de *A. gaumeri* inhibe el crecimiento de las cepas fúngicas *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), y *Helminthosporium* sp. (ITC04). El EE de la raíz de *A. gaumeri* puede ser un fungicida botánico potencial para el control de fitopatógenos.

Palabras clave adicionales: *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, ensayos antifúngicos, ensayo en microdilución, fungicidas naturales, extractos de plantas.

Abstract. A total of 24 extracts (aqueous and ethanolic) from nine plant species were evaluated against *Alternaria chrysanthemi*, the causal agent of leaf spot of chrysanthemum. The highest antifungal activity was shown by ethanolic and aqueous extracts of *Acalypha gaumeri* root (Growth inhibition, GI = 75 and 69%, respectively), and by the aqueous extracts of *Bonellia flammae* stem and leaf (GI = 63 and 50%, respectively). These active extracts were subsequently assessed by agar dilution assay, where ethanolic extract (EE) of *A. gaumeri* root caused the highest inhibition of mycelial growth and sporulation, with a median Inhibitory Concentration (IC₅₀) of 0.53 mg/mL against *A. chrysanthemi* GI. This extract was partitioned and the highest activity was observed in the medium polarity fraction (ACR-1E), where an IC₅₀ of 0.13 mg/mL was recorded. This fraction completely inhibited *A. chrysanthemi* infection in chrysanthemum leaf, at concentrations of 85 µg/cm². Also, *A. gaumeri* extract was able to inhibit the fungal strains *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), and *Helminthosporium* sp. (ITC04). The EE of *A. gaumeri* root may be a potential source of botanical fungicide to control phytopathogens.

Additional keywords. *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, antifungal assays, microdilution assay, natural fungicides, plant extracts.

Alternaria chrysanthemi is recognized as the causal agent of *Alternaria* leaf spot, a very important disease of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat)). This plant is a valuable ornamental species that is used all over the world as a source of cut, garden and pot flowers (Anderson, 2007; Deng *et al.*, 2012). *Alternaria*

El hongo *Alternaria chrysanthemi* es reconocido como el agente causal del tizón foliar por *Alternaria*, la cual es una enfermedad muy importante del crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat)). Esta planta es una especie ornamental valiosa que se utiliza en todo el mundo como flor de corte, en jardín y macetas (Anderson, 2007; Deng *et al.*, 2012). *Alternaria chrysanthemi* se presenta principalmente en condiciones de altas temperaturas y lluvias continuas; los síntomas de la enfermedad aparecen en el follaje afectando la calidad y vida útil de las flores (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). La principal estrategia de control para *A. chrysanthemi* es el uso de fungicidas sintéticos o semisintéticos, tales como la azoxistrobina, benomilo, captan, carbendazim, clorotalonil y folpet (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010), con sus conocidos impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, los productos naturales derivados de plantas actualmente están siendo evaluados como nuevas alternativas ecológicas para el manejo de los hongos patógenos de plantas (Dayan *et al.*, 2009).

En la última década, los estudios sobre productos botánicos para el control de hongos fitopatógenos se han incrementado notablemente (Dellavalle *et al.*, 2011; Gahukar 2012; Talibi *et al.*, 2012). Un gran número de familias de plantas han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antifúngicas, tales como Acanthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae y Meliaceae (Gahukar 2012; Ravikumar y Garampalli 2013; Zaker, 2013). Los extractos de diversas plantas han sido evaluados *in vitro* en el género *Alternaria*; en particular, los extractos alcohólicos y acuosos se han probado en *Alternaria alternata* (Carvalho *et al.*, 2011), *Alternaria solani* (Yanar *et al.*, 2011; Ravikumar y Garampalli, 2013), y *Alternaria sesami* (Zaker, 2013), donde los extractos de varias especies de plantas se han encontrado prometedores. Además, para el tratamiento de las especies de *Alternaria*, algunos productos botánicos ya están disponibles en el mercado, tales como extractos de *Reynoutria sachalinensis* (Regalia™) y extractos acuosos de *Macleaya cordata* (Qwel®), los cuales contienen una mezcla de cloruro de sanguinarina y cloruro de queleritrina y se han utilizado con éxito en el campo (Copping y Duke, 2007; Newman and Roll, 1999).

La bio-prospección de productos naturales para el manejo hongos fitopatógenos de importancia económica, llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación ha dado lugar a la evaluación de plantas nativas de la Península de Yucatán como fuente de nuevos biopesticidas. En un trabajo anterior, encontramos nueve especies de plantas (*Acalypha gaumeri*, *Ambrosia hispida*, *Bonellia flammea*, *Calea urticifolia*, *Croton chichenensis*, *Furcraea cahum*, *Randia obcordata*, *Trichilia minutiflora* y *Vitex gaumeri*) con potencial para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo fue la evaluación *in vitro* de 24 extractos de plantas yucatecas nativas contra *A. chrysanthemi*, con la finalidad de encontrar alternativas ecológicas para el control del tizón foliar causado por *Alternaria* en el crisantemo, y además explorar el espectro de actividad antifúngica del

chrysanthemi occurs mainly at high temperatures in continuous rainy season conditions, and disease symptoms appear in the foliage, affecting the quality and shelf life of the flowers (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). The main control strategy for *A. chrysanthemi* is the use of synthetic or semisynthetic fungicides, such as the azoxystrobin, benomyl, captan, carbendazim, chlorothalonil and folpet (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010), with their well-known negative impact on human health and the environment. In this sense, natural products derived from plants are currently being screened as new eco-friendly alternatives to manage plant pathogenic fungi (Dayan *et al.*, 2009).

In the last decade, studies on botanical products to control phytopathogenic fungi have notably increased (Dellavalle *et al.*, 2011; Gahukar 2012; Talibi *et al.*, 2012). A number of plant families have been extensively studied for their antifungal properties such as Acanthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae and Meliaceae (Gahukar 2012; Ravikumar and Garampalli 2013; Zaker, 2013). Extracts of diverse plants have been screened *in vitro* on *Alternaria* genus; in particular, aqueous and alcoholic extracts have been tested on *Alternaria alternata* (Carvalho *et al.*, 2011), *Alternaria solani* (Yanar *et al.*, 2011; Ravikumar and Garampalli, 2013), and *Alternaria sesami* (Zaker, 2013), where extracts of various plant species have been found promising. Moreover, for the management of *Alternaria* species, a few botanical products are already available on the market, such as extracts of *Reynoutria sachalinensis* (Regalia™) and aqueous extracts of *Macleaya cordata* (Qwel®), which contain a mixture of sanguinarine chloride and chelerythrine chloride and have been successfully used in the field (Copping and Duke, 2007; Newman and Roll, 1999).

The bioprospection for natural products to manage economically important phytopathogenic fungi carried out by our research group has led to the screening of native plants of the Yucatan Peninsula as a source of new biopesticides. In a previous work, we found nine plant species (*Acalypha gaumeri*, *Ambrosia hispida*, *Bonellia flammea*, *Calea urticifolia*, *Croton chichenensis*, *Furcraea cahum*, *Randia obcordata*, *Trichilia minutiflora* and *Vitex gaumeri*) with the potential to inhibit *in vitro* growth of *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). The goal of the present research was to evaluate *in vitro* 24 extracts from native yucatecan plants against *A. chrysanthemi*, in order to find ecological alternatives in the control of *Alternaria* leaf spot in chrysanthemum, and furthermore to explore the antifungal activity spectrum of the most active plant extract with other fungal strains.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of extracts. All plant material was collected from various locations in the Yucatan peninsula, Mexico; plants were dried under artificial light (50-60 °C, 3 days). A sample of each species was kept in the herbarium of the Natural Resources Unit of the Scientific Research Center of Yucatan (Table 1).

Ethanollic extracts (EE): Dried plant material (40 g)

extracto vegetal más activo con otras cepas de hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos. Todo el material vegetal se obtuvo de varias localidades de la península de Yucatán, México; las plantas se secaron bajo luz artificial (50-60 °C, 3 d). Una muestra de cada especie se mantuvo en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (Cuadro 1).

Extractos etanólicos (EE): El material vegetal seco (40 g) se maceró con etanol (600 mL) tres veces a temperatura ambiente durante 24 h cada uno. Para obtener los extractos crudos orgánicos se filtró el disolvente, se concentró a vacío y se eliminó en un rotavapor a 40 °C (Cristobal-Alejo *et al.*, 2006).

Extractos acuosos de las plantas (EA): El material vegetal seco (12 g) se extrajo en agua hirviendo (70 mL) durante 20 min. El extracto resultante se filtró (papel de filtro Whatman No. 1) y se diluyó para obtener el extracto acuoso (12% p/v). Los extractos se esterilizaron a través de un filtro Millipore de 0.45 µm antes de su uso en los bioensayos.

Partición del extracto etanólico. El extracto etanólico (482 mg) de la raíz de *A. gaumeri* se resuspendió en agua-metanol (2:1) y se particionó con disolventes en polaridad ascendente (hexano y acetato de etilo, 3 ×, 2:1, 1:1, 1:1 cada uno). Los disolventes se eliminaron a presión reducida para obtener fracciones de polaridad baja (ACR-1A, 21%), media (ACR-1B, 5%) y alta (ACR-1C, residuo acuoso). Adicionalmente, se evaluaron dos precipitados (ACR-1D, el 14%; ACR-1E, 0.7%).

El extracto activo y las fracciones ACR-1E de la raíz de *A. gaumeri* se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice 60F, se detectaron con luz UV y se rociaron con ácido fosfomolibdico como agente revelador, seguido de calentamiento.

Cepas fúngicas. Los hongos fueron aislados de plantas del campo utilizando como medio de crecimiento papa dextrosa agar (PDA). La identificación de los hongos fue realizada por sus características morfológicas utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972). Los hongos y sus hospederos fueron los siguientes: *Alternaria chrysanthemi* E. G. Simmons & Crosier (CICY004) de *Dendranthema grandiflorum* Ramat; *Alternaria* sp. (ITC02) de *Heliconia* sp.; *Colletotrichum capsici* (CC2) y *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CG4) de *Carica papaya* L.; *Corynespora cassicola* Berk. & M. A. Curtis (ITC03) de *Capsicum annum* L.; *Curvularia* sp. (ITC10) de *Zea mays* L. y *Helminthosporium* sp. (ITC04) de *Veitchia merrillii* Becc. Todos los hongos se mantuvieron en tubos inclinados con PDA dentro de aceite mineral a 4 °C. Antes de su uso, los hongos se cultivaron en cajas de Petri con PDA a 25 ± 2 °C con luz natural durante 5-7 d.

Inhibición del crecimiento (IC) de *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución en caldo. *Alternaria chrysanthemi* fue cultivada en PDA e incubada a 18-20 °C en oscuridad total para inducir la esporulación. Después de seis días se añadió una solución salina estéril (5 mL) sobre la superficie del micelio y se

was macerated with ethanol (600 mL) three times at room temperature for 24 h each. To obtain organic crude extracts, the solvent was filtered, vacuum-concentrated and eliminated in a rotary evaporator at 40 °C (Cristobal-Alejo *et al.*, 2006).

Aqueous plant extracts (AE): Dried plant material (12 g) was extracted in boiling water (70 mL) for 20 min. The resulting extract was filtered (Whatman filter paper No. 1) and diluted to obtain the aqueous extract (12% w/v). Extracts were sterilized by filtration in a Millipore filter of 0.45 µm before use in the bioassays.

Partition of ethanolic extract. Ethanolic extract (482 mg) of *A. gaumeri* root was re-suspended in water-methanol (2:1) and partitioned by solvents of increased polarity (hexane and ethyl acetate, 3×, 2:1, 1:1, 1:1, each). Solvents were eliminated under reduced pressure to obtain fractions of low (ACR-1A, 21%), medium (ACR-1B, 5%) and high polarity (ACR-1C, aqueous residue). In addition, two precipitates (ACR-1D, 14%; ACR-1E, 0.7%) were also tested.

The active extract and fractions ACR-1E of *A. gaumeri* root were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F plates, detection under UV light and by spraying phosphomolybdic acid as revealing agent, followed by heating.

Fungal strains. Fungi were isolated from field plants using potato dextrose agar (PDA) as growth medium. Identification of fungi was carried out by their morphological characteristics using taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1972). Fungi and hosts were as follows: *Alternaria chrysanthemi* E. G. Simmons & Crosier (CICY004) from *Dendranthema grandiflorum* Ramat; *Alternaria* sp. (ITC02) from *Heliconia* sp.; *Colletotrichum capsici* (CC2) and *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CG4) from *Carica papaya* L.; *Corynespora cassicola* Berk. & M. A. Curtis (ITC03) from *Capsicum annum* L.; *Curvularia* sp. (ITC10) from *Zea mays* L. and *Helminthosporium* sp. (ITC04) from *Veitchia merrillii* Becc. All fungi were maintained in PDA in slant tubes under mineral oil and kept at 4 °C. Prior to use, fungi were cultured in Petri dishes containing PDA and maintained at 25 ± 2 °C with natural light for 5-7 d.

Growth inhibition of *Alternaria chrysanthemi* by broth microdilution assay. *Alternaria chrysanthemi* was cultured in PDA and incubated at 18-20 °C in complete darkness to induce sporulation. After six days a sterile saline solution (5 mL) was added over the mycelial surface and gently scraped with a sterile slide. The resulting spores/hyphal mixture was filtered through a double-layer sterilized cheesecloth. The spore suspension was adjusted to 5 × 10⁴ conidia/mL with the aid of a hemocytometer (Höller *et al.*, 1999).

Growth inhibition (GI) of *A. chrysanthemi* by the effect of extracts was determined by broth microdilution techniques as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004) with slight modifications. Briefly, all organic extracts and their fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 40 µg/µL. They were subsequently mixed with synthetic

rasparon suavemente con un portaobjetos estéril. La mezcla de esporas / hifas resultante se filtró a través de una gasa de doble capa esterilizada. La suspensión de esporas se ajustó a 5×10^4 conidios/mL con la ayuda de un hemocitómetro (Höller *et al.*, 1999).

La inhibición del crecimiento (IC) de *A. chrysanthemi* por el efecto de los extractos se evaluó mediante técnica de microdilución en caldo según lo descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS, 2004) con ligeras modificaciones. Todos los extractos orgánicos y sus fracciones se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO) a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente se mezclaron con medio sintético Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) y 100 μL de las muestras se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Para evaluar el extracto acuoso, este se mezcló directamente con el medio RPMI-1640 y luego se transfirió a la placa como se mencionó anteriormente para los extractos orgánicos. La suspensión de conidios de *A. chrysanthemi* (100 μL) se añadió a cada pocillo en la placa a la concentración final de esporas de 2.5×10^4 conidios/mL; concentración final de extractos orgánicos o fracciones a 1, 0.5 y 0.25 mg/mL; y extracto acuoso a 3, 1.5 y 0.75% p/v. La anfotericina B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se utilizó como control positivo y el RPMI-1640- 2.5% de DMSO como control negativo. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Las placas de microdilución se incubaron a 23 ± 2 °C en la oscuridad durante 96 h y el crecimiento de las hifas (CH) se determinó visualmente con un microscopio (50 \times) siguiendo la norma NCCLS. Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como IC aplicando la fórmula de Abbott: $[(\% \text{ CH en el control} - \% \text{ CH en el tratamiento}) / \% \text{ CH en el control} \times 100]$ (Cuadro 1) (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CMF) se determinó mediante el ensayo de microdilución. La CMI se registró como la concentración donde no se observó crecimiento del micelio en el pozo (valores de IC del 100%), mientras que la CMF se registró como la concentración de los extractos que no permitieron crecimiento del micelio después de que las esporas tratadas se inocularon en PDA libre del extracto e incubadas durante 48 h a 24 ± 2 °C. Adicionalmente, se calcularon las concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{90}) para las fracciones de *A. gaumeri* (Cuadro 3).

Inhibición del crecimiento micelial (ICM) por el ensayo de dilución en agar. Para evaluar la ICM, el EE de *A. gaumeri* se disolvió en DMSO (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se añadió directamente al medio de cultivo esterilizado (PDA) cuando se enfrió a aproximadamente 50 °C, los extractos acuosos de *A. gaumeri* y *B. flammea* se añadieron directamente al medio. Los medios se mezclaron homogéneamente y se transfirieron a placas de Petri (6 cm). Las concentraciones finales del EE fueron 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL, mientras que para los extractos acuosos fueron 3.0, 1.5 y 0.75% p/v. Para el ensayo, se utilizó un sacabocados para preparar discos de micelio fúngico (5 mm de diámetro) tomados de la zona de cultivo con 5-7 d de crecimiento. Un disco se colocó en el centro de una placa de Petri después de la solidificación

medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) and samples of 100 μL were transferred to a 96-microwell plate. To assay the aqueous extract, this was directly mixed with the medium RPMI-1640 and then transferred to the plate as previously mentioned for organic extracts. Conidial suspension of *A. chrysanthemi* (100 μL) was then added to each microwell in the plate to a final spore concentration of 2.5×10^4 conidia/mL; final concentration of organic extracts or fractions of 1, 0.5 and 0.25 mg/mL; and aqueous extract of 3, 1.5 and 0.75% w/v. Amphotericin B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control and RPMI-1640-2.5% DMSO as negative control. Tests were carried out in triplicate. The microdilution plates were incubated at 23 ± 2 °C in the dark for 96 h and hyphal growth (HG) was determined visually with a microscope (50 \times) following NCCLS standard. Data were converted to percentages and results were reported as GI applying the Abbott's formula: $[(\% \text{ HG in control} - \% \text{ HG in treatment}) / \% \text{ HG in control} \times 100]$ (Table 1) (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were also calculated by microdilution assay. MIC was recorded as the concentration where no mycelial growth was observed (GI values of 100%) in the well, while MFC was recorded as the concentration of extracts that caused no mycelial growth after inoculation on PDA of treated spores and incubation for 48 h at 24 ± 2 °C. Inhibitory concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also calculated to *A. gaumeri* fractions (Table 3).

Mycelial growth inhibition (MGI) by agar dilution assay. To evaluate MGI, EE of *A. gaumeri* was dissolved in DMSO (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and added directly to the sterilized culture medium (PDA) when cooled down to approximately 50 °C; the aqueous extracts of *A. gaumeri* and *B. flammea* were added directly to the medium. Media were homogeneously mixed and transferred to Petri dishes (6 cm). The final concentrations for EE were 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL, while for the aqueous extracts; these were 3.0, 1.5, and 0.75% w/v. For the assay, a cork borer was used to prepare mycelial disks (5 mm diameter) taken from the growing area of 5-7 day old cultures of the fungi. One disk was placed at the center of a Petri dish after solidification of the PDA medium. Fungal colonies were also cultured in PDA medium with and without 5% DMSO for negative control and with Prochloraz 45 CE (0.2 mg/mL) for positive control. Fungal cultures were maintained in the dark for 5-7 days at 18 ± 2 °C for *A. chrysanthemi* and at 25 ± 2 °C for the rest of the phytopathogenic fungi. All assays were performed with four replicates. Evaluation of MGI was carried out as described by Saetae and Suntornsuk (2010) (Table 2). Inhibitory Concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also determined (Table 4).

Sporulation inhibition (SI) on *Alternaria chrysanthemi* by agar dilution assay. Saline solution (5 mL) was added to *A. chrysanthemi* colonies treated with extracts. Spores were obtained as described (*vide supra*) and spore concentration (conidia/mL) was counted in a hemocytometer. Results were reported as percentage of sporulation inhibition (SI) following the Abbott's formula (Table 2) (Höller *et al.*, 1999).

del medio PDA. Las colonias de hongos también se cultivaron en medio PDA con y sin 5% de DMSO para el control negativo y con procloraz 45 CE (0.2 mg / mL) para el control positivo. Los cultivos de hongos se mantuvieron en la oscuridad durante 5-7 d a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ para *A. chrysanthemi* y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para el resto de los hongos fitopatógenos. Todos los ensayos se realizaron con cuatro repeticiones. La evaluación de la ICM se llevó a cabo como se describe en Saetae y Suntornsuk (2010) (Cuadro 2). Las concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{90}) también se estimaron (Cuadro 4).

Inhibición de la esporulación de *Alternaria chrysanthemi*. La solución salina (5 mL) se añadió a las colonias de *A. chrysanthemi*. Las esporas se obtuvieron como se describió anteriormente (*vide supra*) y la concentración de esporas (conidios/mL) se contaron con un hemocitómetro. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de la esporulación (IS) siguiendo la fórmula Abbott (Cuadro 2) (Höller *et al.*, 1999).

Ensayo en discos de hoja. Discos foliares de crisantemo (1.5 cm^2) se cortaron de plantas establecidas bajo condiciones de invernadero. Las hojas se desinfectaron con 1% NaOCl (1 min) y etanol al 70% (1 min). Los discos foliares se colocaron en placas de múltiples pocillos (formato de 12 pocillos) en agar-agua (2%). La fracción ACR-1E se disolvió en agua:etanol:DMSO:tween 20 (50:47.5:2.5:0.06, v/v) a concentraciones de 8, 4 y 2 mg / mL. Los discos foliares se impregnaron con 16 μL de la fracción de cada concentración (85, 42.5 and 21.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); después de la evaporación del disolvente, los discos se inocularon con 16 μL de la suspensión de esporas (2.5×10^4 esporas/mL) de *A. chrysanthemi*. Los discos foliares se incubaron entonces durante siete días a 24°C y luz natural. La actividad antifúngica se registró como se describe en Boehlendorf *et al.* (2004) usando el siguiente escala: 10 = presencia de micelio sin IC, 7 = Buena pero IC micelial incompleta, 3 = ligera IC micelial, y 0 = no se observó IC micelial.

Análisis estadísticos. Los datos de porcentajes (IC, ICM y IS) se transformaron a $y = \arcsin(\arct/100)$. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, $P = 0.05$) utilizando el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.1.3 para windows. Las concentraciones de inhibición (CI_{50} y CI_{90}) se calcularon por análisis Probit.

RESULTADOS

Actividad antifúngica de extractos de plantas contra *Alternaria chrysanthemi*. De todos los extractos (acuosos y etanólicos) evaluados por el ensayo de microdilución, sólo seis mostraron actividad IC contra *A. chrysanthemi* (Cuadro 1). Los más activos fueron los extractos etanólicos y acuosos de raíces de *A. gaumeri* (75 y 69% IC, respectivamente) y los EA del tallo y hojas de *B. flammea* (63 y 50%, respectivamente) (Cuadro 1).

Estos extractos de plantas también se evaluaron en el ensayo de dilución en agar mediante diluciones en serie. El EE de la raíz de *A. gaumeri* mostro la más alta ICM (78%) y también la más baja CI_{50} y CI_{90} (0.53 y 1.50 mg/ mL,

Leaf disk assay. Leaf-disks of chrysanthemum (1.5 cm^2) were cut from plants established under greenhouse conditions. Leaves were disinfected with 1% NaOCl (1 min) and 70% ethanol (1 min). Leaf disks were placed in multiwell plates (12-well format) onto water agar (2%). ACR-1E fraction was dissolved in water:ethanol:DMSO:tween 20 (50:47.5:2.5:0.06, v/v) to concentrations of 8, 4, and 2 mg/mL. Leaf disks were impregnated with 16 μL of the fraction of each concentration (85, 42.5 and 21.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); subsequently, after solvent evaporation, leaf disks were inoculated with 16 μL of the spore suspension (2.5×10^4 spores/mL) of *A. chrysanthemi*. Leaf disks were then incubated for seven days at 24°C and natural light. Antifungal activity was recorded as described by Boehlendorf *et al.*, (2004) using the following rank: 10 = presence of mycelia with no GI, 7 = good but incomplete mycelia GI, 3 = slight mycelia GI, and 0 = no mycelia GI was observed.

Statistical analyses. Data in percentages (GI, MGI and SI) were transformed to $y = \arcsin(\arct/100)$. Data were analyzed using analysis of variance and multiple means comparison (Tukey, $P = 0.05$) by Statistical Analysis System (SAS) version 9.1.3 for windows. Inhibition concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were calculated by Probit analysis.

RESULTS

Antifungal activity of plant extracts against *Alternaria chrysanthemi*. Of all the plant extracts (aqueous and ethanolic) evaluated by microdilution assay, only six showed GI activity against *A. chrysanthemi* (Table 1). The most active were the ethanolic and aqueous extracts of *A. gaumeri* roots (75 and 69% GI, respectively) and AE of *B. flammea* stem and leaf (63 and 50%, respectively) (Table 1).

These plant extracts were also evaluated by agar dilution assay in serial dilutions. The EE of *A. gaumeri* root displayed the highest MGI (78%) and also the lowest IC_{50} and IC_{90} (0.53 and 1.50 mg/mL, respectively) (Table 2, 4). In addition, MIC and MFC values were 2 mg/mL. The aqueous extract of *B. flammea* stem and leaf showed moderate activity (MGI = 57 and 45%, respectively) (Table 2).

Sporulation inhibition was not significantly different (77-82 %) in *A. chrysanthemi* exposed to AE of *B. flammea* stem and leaf (both 9.1×10^3 spores/mL) and EE and AE of *A. gaumeri* roots (1.3×10^4 and 1.2×10^4 , respectively) (Table 2).

Antifungal activity of fractions from ethanolic extract of *Acalypha gaumeri*. The bioassay-guided partition of the EE of *A. gaumeri* root was performed by microdilution assay (Table 3). Antifungal activity was observed in the medium polarity fractions ACR-1B and ACR-1E, where GI values were 50 and 100 %, respectively. In addition, the fraction ACR-1E showed MIC values of 0.25 mg/mL, and IC_{50} and IC_{90} of 0.13 and 0.14 mg/mL, respectively (Table 3).

Leaf disk assay of fraction ACR-1E. The fraction ACR-1E was tested at different concentrations against *A. chrysanthemi* on chrysanthemum leaf disk assay. Data showed no mycelial growth of *A. chrysanthemi* on the treated leaf disks at 8 mg/mL (85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), while incomplete

Cuadro 1. Evaluación antifúngica de los extractos de plantas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución.

Table 1. Antifungal screening of yucatecan plant extracts against *Alternaria chrysanthemi* by microdilution assay.

Plant species	Family	Voucher	Plant part	GI (%)	
				E	A
<i>Acalypha gaumeri</i>	Euphorbiaceae	PS 2584	R	75 ± 0b	69 ± 12b
<i>Ambrosia hispida</i>	Asteraceae	PS 2579	L	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Bonellia flammea</i>	Theophrastaceae	PS 2782	S/R	6 ± 0d	13 ± 0d
			L	0 ± 0d	50 ± 0bc
			S	0 ± 0d	63 ± 19b
<i>Calea urticifolia</i>	Asteraceae	FM 1721	R	6 ± 0d	38 ± 12c
<i>Croton chichenensis</i>	Euphorbiaceae	PS 2571	S	0 ± 0d	0 ± 0d
			R	0 ± 0d	0 ± 0d
			R	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Furcraea cahum</i>	Agavaceae	PS 2583	R	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Randia obcordata</i>	Rubiaceae	PS 2582	S	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Trichilia minutiflora</i>	Meliaceae	PS 2586	S	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Vitex gaumeri</i>	Verbenaceae	PS 2598	L	0 ± 0d	0 ± 0d
Negative control				0 ± 0d	0 ± 0d
Positive control				100 ± 0a	100 ± 0a

Mean followed by the same letter within the columns are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

L: Leaves R: Root S: Stem GI: growth inhibition

E: Ethanol extract (1 mg/mL) A: Aqueous extract (3% w/v)

Negative control: RMPI + 2.5% DMSO + spore suspension of *Alternaria chrysanthemi*

Positive control: Amphotericin B (4 µg/mL)

respectivamente) (Cuadro 2, 4). Además, los valores de CMI y CMF fueron de 2 mg/mL. El extracto acuoso del tallo y las hojas de *B. flammea* mostró una actividad moderada (ICM = 57 y 45%, respectivamente) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los extractos de plantas sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Alternaria chrysanthemi* en el ensayo de dilución en agar.

Table 2. Effect of plant extracts on the mycelial growth and sporulation of *Alternaria chrysanthemi* by agar dilution assays.

Plant species	Part Plant	Solvent	MGI (%)	SI (%)
<i>Acalypha gaumeri</i>	Root	E	78 ± 1.0b	78 ± 2.0b
		A	51 ± 2.3c	77 ± 2.0b
<i>Bonellia flammea</i>	Leaf	A	45 ± 2.1c	82 ± 2.0b
	Stem	A	57 ± 1.5c	82 ± 5.1b
Negative control			0 ± 0d	0 ± 0c
Positive control			100 ± 0a	100 ± 0a

Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

MGI: Mycelial growth inhibition SI: Sporulation inhibition

E: Ethanol extract (1 mg/mL) A: Aqueous extract (3% w/v)

Positive control: Prochloraz 45 CE (0.2 mg/mL)

Negative control: PDA + 5% DMSO

inhibition of mycelial growth was observed when 4 mg/mL (42.5 µg/cm²) was applied on the chrysanthemum leaf disks (Figure 1).

Antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*. The EE of *A. gaumeri* root was evaluated by agar dilution assay against six common fungi (Table 4). The EE of *A. gaumeri* root inhibited mycelial growth of all tested fungi, the antifungal activity ranged from 68 to 97% at a concentration of 1 mg/mL (Table 4). The calculated IC₅₀ (0.33 mg/mL) and IC₉₀ (1.01 mg/mL) showed that the most sensitive fungal species was *C. cassiicola*. In contrast, the least sensitive was *C. capsici* (IC₅₀ = 0.60 mg/mL and IC₉₀ = 4.60 mg/mL).

DISCUSSION

In the present work, we have searched for natural antifungal products from local flora of the Yucatan Peninsula. We have evaluated ethanol and aqueous extracts from nine selected plant species on *A. chrysanthemi*. Data from *in vitro* antifungal assays (Table 1, 2) showed that both types of extracts of *A. gaumeri* root inhibited mycelial growth and sporulation of *A. chrysanthemi* using concentrations of 1 mg/mL for EE and 3% w/v for AE. In addition, we observed that EE showed lower values for IC₅₀ and IC₉₀ to inhibit the growth of *A. chrysanthemi* compared to those of AE (Table 2). Previous works have also reported greater activity from alcoholic extracts in comparison with that of aqueous extracts of plants on *Alternaria* species (Hassanein *et al.*, 2008; Shirzadian *et al.*, 2009; Zaker,

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las fracciones de *Acalypha gaumeri* contra *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución y la determinación de su concentración inhibitoria (CI₅₀ y CI₉₀).

Table 3. Percentage of growth inhibition of *Acalypha gaumeri* fractions against *Alternaria chrysanthemi* by microdilution assay and determination of their inhibitory concentration (IC₅₀ and IC₉₀).

<i>Acalypha gaumeri</i> Fractions	Solvent	mg/mL		
		GI (%) 0.5 mg/mL	IC ₅₀	IC ₉₀
ACR-1A	<i>n</i> -hexane	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1B	Ethyl acetate	50 ± 0b	0.5	0.57
ACR-1C	Aqueous residue	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1D	Ethanol pp	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1E	Ethyl acetate pp	100 ± 0a	0.13	0.14
Positive control: Amphotericin B: 4 µg/mL		100 ± 0a	0.001	0.003
Negative control: 2.5% DMSO		0 ± 0c		

Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

GI: growth inhibition of *A. chrysanthemi*

IC: Inhibitory concentration at 50 and 90

ND: not determined

La inhibición de la esporulación no fue significativamente diferente (77- 82%) en *A. chrysanthemi* expuesta al EA del tallo y hojas de *B. flammea* (ambos a 9.1×10^3 esporas /mL) ni el EE y EA de las raíces de *A. gaumeri* (1.3×10^4 y 1.2×10^4 , respectivamente) (Cuadro 2).

Actividad antifúngica de las fracciones del extracto etanólico de *Acalypha gaumeri*. La partición guiada por bioensayo del EE de la raíz de *A. gaumeri* se realizó mediante el ensayo de microdilución (Cuadro 3). La actividad antifúngica se observó en las fracciones de polaridad media ACR-1B y ACR-1E, donde los valores de IC fueron 50 y 100%, respectivamente. Además, la fracción ACR-1E mostró valores de CMI de 0.25 mg/ mL, y la CI₅₀ y CI₉₀ de 0.13 y 0.14 mg/ mL, respectivamente (Cuadro 3).

Ensayo de disco de hoja de la fracción de ACR-1E. La fracción ACR-1E se evaluó a diferentes concentraciones contra *A. chrysanthemi* en ensayo de disco de hoja de crisantemo. Los datos no mostraron ningún crecimiento del micelio de *A. chrysanthemi* en los discos tratados a 8 mg/ mL ($85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), mientras que se observó una inhibición incompleta de crecimiento micelial cuando se aplicaron 4 mg/ mL ($42.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en los discos de hoja de crisantemo (Figura 1).

Espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. El EE de la raíz de *A. gaumeri* se evaluó mediante el ensayo de dilución en agar contra seis hongos comunes (Cuadro 4). El EE de la raíz de *A. gaumeri* inhibió el crecimiento micelial de todos los hongos evaluados, la actividad antifúngica varió de 68 hasta 97% a una concentración de 1 mg/ mL (Cuadro 4). La CI₅₀ calculada (0.33 mg/ mL) y la CI₉₀ (1.01 mg/ mL) mostraron que la

2013). The effectiveness of *A. gaumeri* extracts was within the range reported for other species of *Alternaria* when exposed to other plant extracts (Ammar *et al.*, 2013; Wenqiang *et al.*, 2006).

To follow the antifungal activity produced by *A. gaumeri* on *A. chrysanthemi*, the EE was subjected to preliminary separation by partition with solvents of increasing polarity. Fractions and precipitates obtained were then tested against *A. chrysanthemi*, where fractions of medium polarity (ACR-1B and ACR-1E) were the most active. Both fractions displayed lower values of IC₅₀ and IC₉₀ than those of the EE (Table 3). In addition, the fraction ACR-1E was *in vitro* evaluated on chrysanthemum by leaf disk assay. Results showed full inhibition of hyphal growth of *A. chrysanthemi* at concentrations of 8 mg/mL (Figure 1). Lower concentrations of the extracts allowed mycelial growth in the medium, at the leaf disk border. This indicates that EE of *A. gaumeri* might affect the penetration or establishment of *A. chrysanthemi* on the foliar tissue of chrysanthemum leaves. Lin *et al.*, (2011) reported that crude extracts of *Solanum nigrum* effectively inhibited the development of symptoms of cabbage black leaf spot caused by *A. brassicicola* at a concentration of 5 mg/mL.

The species *A. gaumeri* (Euphorbiaceae) is an endemic herbaceous plant of the Yucatan Peninsula (Fernández-Concha *et al.*, 2010). With the exception of our studies (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) no reports have been documented on its biological properties or chemical composition. The *Acalypha* genus includes 462 species, and a search in literature yielded various reports on the potential

Cuadro 4. Espectro antifúngico de *Acalypha gaumeri* contra hongos fitopatógenos por el ensayo de dilución en agar.
Table 4. Antifungal spectrum of *Acalypha gaumeri* against phytopathogens by the agar dilution assay.

Phytopathogens	MGI (1 mg/mL)	mg/mL	
		IC ₅₀	IC ₉₀
<i>Alternaria chrysanthemi</i> (CICY004)	78 ± 1.0d	0.53 (0.48 - 0.58)	1.50 (1.28 - 1.89)
<i>Alternaria</i> sp. (ITC02)	91 ± 1.8b	0.48 (0.45 - 0.51)	1.26 (1.14 - 1.42)
<i>Colletotrichum capsici</i> (CC2)	68 ± 1.0e	0.60 (0.45 - 0.67)	4.60 (3.22 - 7.68)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CG4)	86 ± 1.9c	0.41 (0.38 - 0.44)	1.43 (1.25 - 1.70)
<i>Corynespora cassiicola</i> (ITC03)	97 ± 0.6a	0.33 (0.31 - 0.36)	1.01 (0.91 - 1.15)
<i>Curvularia</i> sp. (ITC10)	83 ± 1.5d	0.46 (0.43 - 0.49)	1.59 (1.38 - 1.90)
<i>Helminthosporium</i> sp. (ITC04)	87 ± 1.0c	0.41 (0.38 - 0.44)	1.35 (1.19 - 1.57)

MGI: Mycelial growth inhibition IC: inhibitory concentration
Median between column columns is statistically equal (Tukey P = 0.05).

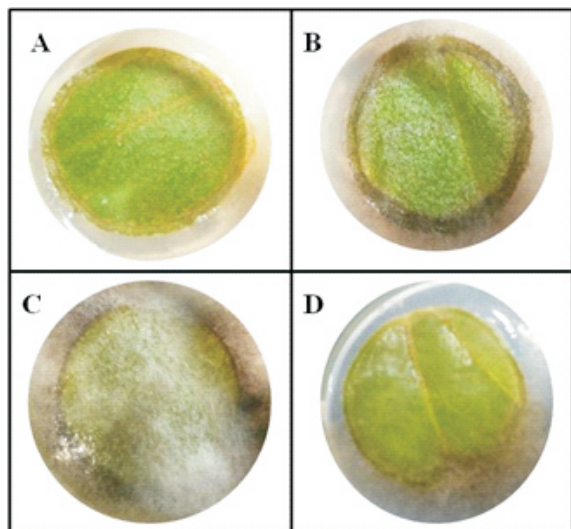


Figura 1. Efectos de la fracción ACR-1E en la inhibición de *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de disco de hoja después de siete días de incubación. A. 85 µg/cm² B. 42.5 µg/cm². C. EtOH:H₂O 1:2 D. Mirage 45 CE (2 µg/cm²).
Figure 1. Effects of the fraction ACR-1E on *Alternaria chrysanthemi* inhibition in leaf disk assay after seven days of incubation. A. 85 µg/cm² B. 42.5 µg/cm². C. EtOH:H₂O 1:2 D. Mirage 45 CE (2 µg/cm²).

especie fúngica más sensible fue la *C. cassiicola*. En contraste, la menos sensible fue *C. capsici* (CI₅₀ = 0.60 mg/mL y la CI₉₀ = 4.60 mg/mL).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se buscaron productos antifúngicos naturales provenientes de la flora local de la

of *Acalypha* species on plant pathogenic fungi, for example, *Acalypha australis* against *Colletotrichum lagenarium* (Inagaki *et al.*, 2008); *Acalypha indica* against *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, and *Microsporium canis* (Siva *et al.*, 2008; Jebakumar *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2010), and *Acalypha wilkesiana* against *Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *F. solani*, *Trichophyton interdistale*, and *T. mentagrophytes* (Alade and Irobi, 1993). Phytochemical studies on various *Acalypha* species showed the presence of metabolites such as flavonoids, polyketides, and terpenes (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002) alkaloids (Hungeling *et al.*, 2009) and an amide (Siems *et al.*, 1996). Chemical studies to identify the metabolites responsible for the antifungal effects of *A. gaumeri* are now in progress.

Previous works have also found that *A. gaumeri* was active on other fungi, such as *Colletotrichum* and *Fusarium* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Therefore, the EE was tested on several fungi (Table 4). Data showed that EE of *A. gaumeri* suppressed mycelial growth of all evaluated fungi; these included three strains of *Alternaria*, two species of *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* and *C. capsici*), *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), *Fusarium oxysporum*, and *Helminthosporium* sp. (ITC04). In particular, the inhibition (GI) of *Alternaria* species, ranged from 78% to 94% against *A. tagetica*, *Alternaria* sp. (ITC02), and *A. chrysanthemi*.

Another plant with significant effect against *A. chrysanthemi* was *B. flammea* (Theophrastaceae, before *Jacquinia flammea* Millsp.) leaf and stem, an endemic tree from the Yucatan peninsula. It is used in Mayan traditional medicine for treating fever. The methanol extract of the roots of this species has been reported with antifungal activity against dermatophytes (García-Sosa *et al.*, 2011) and against HeLa and RAW 264.7 human cancer cell lines. This

Península de Yucatán. Se evaluaron extractos etanólicos y acuosos de nueve especies de plantas contra *A. chrysanthemi*. Los datos de los ensayos *in vitro* antifúngicos (Cuadro 1, 2) mostraron que ambos tipos de extractos de raíz de *A. gaumeri* inhibieron el crecimiento micelial y la esporulación de *A. chrysanthemi* usando concentraciones de 1 mg/mL para el EE y 3% p/v para el EA. Además, se observó que el EE mostró valores más bajos de CI_{50} y CI_{90} para inhibir el crecimiento de *A. chrysanthemi* en comparación con el EA (Cuadro 2). Algunos trabajos anteriores también han reportado una mayor actividad de los extractos alcohólicos en comparación con los extractos acuosos contra las especies de *Alternaria* (Hassanein *et al.*, 2008; Shirzadian *et al.*, 2009; Zaker, 2013). La eficacia de los extractos de *A. gaumeri* estuvo dentro del rango reportado para otras especies de *Alternaria* cuando se expusieron a otros extractos de plantas (Ammar *et al.*, 2013; Wenqiang *et al.*, 2006).

Para monitorear la actividad antifúngica de *A. gaumeri* en *A. chrysanthemi*, el EE se sometió a separación preliminar por partición con disolventes de polaridad creciente. Las fracciones y los precipitados obtenidos se evaluaron contra *A. chrysanthemi*, donde las fracciones de polaridad media (ACR-1B y ACR-1E) fueron las más activas. Ambas fracciones mostraron valores menores de CI_{50} y CI_{90} que las del EE (Cuadro 3). Además, la fracción ACR-1E fue evaluada *in vitro* en crisantemo mediante el ensayo de disco de hoja. Los resultados mostraron una inhibición completa de crecimiento de hifas de *A. chrysanthemi* a concentraciones de 8 mg/mL (Figura 1). Concentraciones menores de los extractos permitieron el crecimiento del micelio en el medio de cultivo y en el bode del disco de hoja. Esto indica que el EE de *A. gaumeri* podría afectar a la penetración o el establecimiento de *A. chrysanthemi* en el tejido foliar de las hojas de crisantemo. Lin *et al.*, (2011) reportaron que los extractos crudos de *Solanum nigrum* inhibieron de manera eficiente el desarrollo de los síntomas de mancha de la hoja en col negra causada por *A. brassicicola* a una concentración de 5 mg/mL.

La especie *A. gaumeri* (Euphorbiaceae) es una planta endémica herbácea de la Península de Yucatán (Fernández-Concha *et al.*, 2010). Con la excepción de nuestros estudios (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) no hay reportes anteriores sobre sus propiedades biológicas o composición química. El género *Acalypha* incluye 462 especies, y una búsqueda en la literatura produjo varios informes sobre el potencial de las especies de *Acalypha* contra hongos patógenos de plantas, por ejemplo, *Acalypha australis* contra *Colletotrichum lagenarium* (Inagaki *et al.*, 2008); *Acalypha indica* contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, y *Microsporium canis* (Siva *et al.*, 2008; Jebakumar *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2010), y *Acalypha wilkesiana* contra *Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *F. solani*, *Trichophyton interdistale*, y *T. mentagrophytes* (Alade and Irobi, 1993). Estudios fitoquímicos en varias especies de *Acalypha* mostraron la presencia de metabolitos tales como

plant produces vanillic acid 4-O-neohesperidoside and sakurososaponin. Last compound is one of the responsible principles of antifungal effect of *B. flammea* (Sánchez-Medina *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

The EE of *A. gaumeri* root EA showed *in vitro* the highest antifungal activity against *A. chrysanthemi*, followed only by AE of *B. flammea* stem and leaves. Results of the chrysanthemum leaf disk assay could have a high effectiveness in greenhouse assays and in the field. Moreover, the spectrum of antifungal action of *A. gaumeri* will increase when other pathogens are tested. The results presented in this study suggest that extracts of *A. gaumeri* have the potential to be developed as a natural fungicide. In addition, this is the first report of an antifungal screening of *A. chrysanthemi* using microdilution assay. This assay could be used in programs where a large number of extracts are evaluated in the search for natural antifungal products. Finally, this search corroborates the valuable potential of our regional flora for developing eco-friendly fungicides in the near future.

Acknowledgements. The authors thank Eduardo Balam, Paulino Simá-Polanco, Filogonio May-Pat and Sergio Pérez for their valuable technical assistance. This research was supported by Fomix-Conacyt (Project YUC-2011-C09-168624). A.A.V.D. thanks to Conacyt for the provision of a graduate student fellowship (No. 211999).

LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, and Salameh A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3208-3213.
- Adesina SK, Idowu O, Ogundaini AO, Oladimeji H, Olugbade TA, Onawunmi GO, and Pais M. 2000. Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14:371-374.
- Alade PI, and Irobi ON. 1993. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *Journal Ethnopharmacology* 39:171-174.
- Ammar MI, Nenaah GE, and Mohamed AHH. 2013. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 49:21-25.
- Anderson NO. 2007. Chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora* Tzvelv.). pp 389 - 437. *In: Anderson, N.O. (Ed.), Flower Breeding and Genetics*, Springer-Verlag, Netherlands. 815 p.
- Barnett HL, and Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Minneapolis, MN, USA. 241p.
- Boehlandorf B, Neff S, Shuez TC, Molleyres LP, Winkler T, Dobler M, and Huang Y. 2004. Patent GB 2396349. Compounds obtained from a fungal microorganism and derivatives thereof. 44p.
- Carvalho DDC, Alves E, Camargos RB, Oliveira DF,

flavonoides, policétidos, y los terpenos (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002) alcaloides (Hungeling *et al.*, 2009) y una amida (Siems *et al.*, 1996). Actualmente se están llevando a cabo estudios químicos para identificar los metabolitos responsables de los efectos antifúngicos de *A. gaumeri*.

Algunos trabajos anteriores también reportan que *A. gaumeri* fue activo en otros hongos, tales como *Colletotrichum* y *Fusarium* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Por lo tanto, el EE fue probado en varios hongos (Tabla 4). Los resultados mostraron que el EE de *A. gaumeri* suprimió el crecimiento micelial de todos los hongos evaluados; éstos incluyen tres cepas de *Alternaria*, dos especies de *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* y *C. capsici*), *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), *Fusarium oxysporum*, y *Helminthosporium* sp. (ITC04). En particular, la inhibición (IC) de las especies de *Alternaria*, varió del 78% al 94% contra *A. tagetica*, *Alternaria* sp. (ITC02) y *A. chrysanthemi*.

Otra planta con efecto significativo contra *A. chrysanthemi* fue *B. flammea*, hojas y tallos (Theophrastaceae, antes *Jacquinia flammea* Mill sp.), y el cual es un árbol endémico de la península de Yucatán. Se utiliza en medicina tradicional maya para tratar la fiebre. El extracto metanólico de las raíces de esta especie ha sido reportado con actividad antifúngica contra dermatofitos (García-Sosa *et al.*, 2011) y contra las líneas HeLa y RAW 264.7 de células cancerosas humanas. Esta planta produce ácido vanílico 4-0-neohesperidósido y sakurososaponina. Este último compuesto es uno de los responsables del efecto antifúngico de la *B. flammea* (Sánchez-Medina *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

El EE de la raíz de *A. gaumeri* en estudios *in vitro* mostró la más alta actividad antifúngica contra *A. chrysanthemi*, seguida sólo por el EA del tallo y hojas de la *B. flammea*. Los resultados del ensayo de disco foliar de crisantemo fueron altamente eficientes, por lo que, podrían ser efectivos en ensayos en invernadero y en el campo. Además, el espectro de actividad antifúngica de *A. gaumeri* aumentará cuando se evalúen otros patógenos. Los resultados presentados en este estudio sugieren que los extractos de *A. gaumeri* tienen el potencial de actuar como fungicidas naturales. Además, este es el primer reporte donde se evalúa la actividad antifúngica de *A. chrysanthemi* utilizando el ensayo de microdilución. Este ensayo podría ser utilizado en programas donde se evalúe un gran número de extractos en la búsqueda de productos antifúngicos naturales. Y para finalizar, esta búsqueda corrobora el valioso potencial de nuestra flora regional para el desarrollo de fungicidas ecológicos en un futuro próximo.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Eduardo Balam, Paulino Simá-Polanco, Filogonio May-Pat y a Sergio Pérez por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue apoyada económicamente por Fomix-Conacyt (Proyecto YUC-2011-C09-168624). A.A.V.D. agradece a CONACYT por la beca de estudiante de doctorado (N° 211999).

- Scolforo JRS, de Carvalho DA, and Batista TRS. 2011. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tanger fruits. *Revista Iberoamericana de Micología* 28:173-178.
- Copping LG, and Duke SO. 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63:524-554.
- Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Moguel-Catzín S, Marbán-Mendoza N, Medina-Baizabal L, Simá-Polanco P, Peraza-Sánchez SR, and Gamboa-Angulo MM. 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native Yucatecan plants. *Nematropica* 36:89-97.
- Cruz-Estrada A, Gamboa-Angulo M, Borges-Argáez R, and Ruiz-Sánchez E. 2013. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology* 16:1-9.
- Dayan FE, Cantrell CL, and Duke SO. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17:4022-4034.
- Deng Y, Chen S, Chang Q, Wang H, and Chen F. 2012. The chrysanthemum × *Artemisia vulgaris* intergeneric hybrid has better rooting ability and higher resistance to *Alternaria* leaf spot than its chrysanthemum parent. *Scientia Horticulturae-Amsterdam* 134:185-190.
- Dellavalle PD, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, and Rizza MD. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71:231-239.
- Fernández-Concha GC, Tapia-Muñoz JL, Duno-de Stefano R, y Ramírez-Morillo IM. 2010. Flora ilustrada de la península de Yucatán. Lista florística. pp 311 - 312. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 326p.
- Gahukar RT. 2012. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. *Crop Protection* 42:202-209.
- Gamboa-Angulo MM, Cristóbal-Alejo J, Medina-Baizabal IL, Chí-Romero F, Méndez-González R, Simá-Polanco P, and May-Pat F. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1955-1959.
- García-Sosa K, Sánchez-Medina A, Álvarez SL, Zacchino S, Veitch NCP, Simá-Polanco P, and Peña-Rodríguez LM. 2011. Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research* 25:1185-1189.
- Gutierrez-Lugo MT, Singh MP, Maiese WM, and Timmermann BN. 2002. New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Product* 65:872-875.
- Hassanein NM, Abou ZMA, Youssef IF, and Mahmoud DA. 2008. Efficacy of leaf extracts of neem (*Azadirachta indica*) and chinaberry (*Melia azedarach*) against early blight and wilt diseases of tomato. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2:763-772.
- Höller U, Köng M, and Wright AD. 1999. Three new

- metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *Journal of Natural Product* 62:114-118.
- Hungeling M, Lechtenberg M, Fronczek FR, and Nahrstedt A. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 70:270-277.
- Inagaki H, Yamaguchi A, Kato K, Kageyama C, Iyozumi H, and Oki Y. 2008. Screening of weed extracts for antifungal properties against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. *Weed Biology and Management* 8:276-283.
- Jebakumar RDS, Kallidass S, and Vimalan J. 2005. Isolation, identification and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant *Acalypha indica* (Indian-nettle). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1231-1236.
- Lin TC, Fan MC, Wang SY, and Huang JW. 2011. Identification of the *Solanum nigrum* extract component involved in controlling cabbage black leaf spot disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:1667-1672.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guidance. Document M44-A. Wayne, PA: NCCL. 29 p.
- Newman SE, and Roll MJ. 1999. A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *Hortscience* 34:686-689.
- Ravikumar MC, and Garampalli RH. 2013. Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46:1897-1903.
- Saetae D, and Suntornsuk W. 2010. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:319-324.
- Sánchez-Medina A, Peña-Rodríguez LM, May-Pat F, Karagianis G, Waterman PG, Mallet AI, and Habtemariam S. 2009. Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications* 4:1-6.
- Shirzadian S, Azad HA, and Khalghani J. 2009. Introductory study of antifungal activities of bryophyte extracts. *Applied Entomology and Phytopathology* 77:1-22.
- Siems K, Jakupovic J, Castro V, and Poveda, L. 1996. Constituents of two *Acalypha* species. *Phytochemistry* 41:851-853.
- Siva N, Ganesan S, Banumathy N, and Muthuchelian. 2008. Antifungal effect of leaf extract of some medicinal plants against *Fusarium oxysporum* causing wilt disease of *Solanum melongena* L. *Ethnobotanic Leaflets* 12:156-63.
- Somchit MN, Rashid RA, Abdullah A, Zuraini A, Zakaria ZA, Sulaiman MR, Arifah AK, and Mutalib AR. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of leaves of *Acalypha indica* Linn. (Euphorbiaceae). *African Journal of Microbiology Research* 4:2133-2136.
- Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Saadi B, and Aoumar AAB. 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection* 35:41-46.
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J, y Tún-Suárez J. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramant.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:49-56.
- Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, and Yanfeng H. 2006. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research* 20:992-998.
- Xu G, Chen S, and Chen F. 2010. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpin_{soo} gene demonstrate induced resistance to *Alternaria* leaf spot and accelerated development. *Russ. Journal of Plant Physiology* 57: 548-553.
- Yanar Y, Gökçe A, Kadioglu I, Çam H, and Whalon M. 2011. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology* 10:8291-8295.
- Zaker M. 2013. Screening some medicinal plant extracts against *Alternaria sesame*, the causal agent of *Alternaria* leaf spot of sesame. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 3:1-8.

Incidencia de Infecciones Virales Mezcladas en un Área de Producción de Fresa en Guanajuato, México

Incidence of Mixed Viral Infections in a Strawberry Producing Area in Guanajuato, Mexico

Carlos Alberto Contreras Paredes, Laura Silva Rosales, Violana Gallegos, M. Lucila Ortiz Castellanos, Alba Estela Jofre Garfias*, Departamento de Ingeniería Genética at Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato (Cinvestav Irapuato). Km 9.6, Libram. Nte. Irapuato, Guanajuato. CP 36821, México; Pedro Antonio Dávalos González, Centro de Investigación Regional Centro, Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel Allende, Celaya, Guanajuato. CP 38110, México. *Corresponding author: ajofre@ira.cinvestav.mx

(Recibido: Abril 10, 2014 Aceptado: Agosto 14, 2014)

Contreras Paredes CA, Silva Rosales L, Gallegos V, Ortiz Castellanos ML, Jofre Garfias AE y Dávalos González PA. 2014. Incidencia de infecciones virales mezcladas en un área de producción de fresa en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 32: 12-25.

Resumen. Irapuato, en el estado de Guanajuato, fue el principal productor de fresa a nivel nacional. La pérdida de ese estatus fue debida a infecciones virales, entre otras causas. El virus del moteado de la fresa (SMoV), el del arrugamiento de la fresa (SCV) y el virus latente del anillo necrótico de la fresa (SLRSV) fueron encontrados previamente en Irapuato; sin embargo, la diversidad viral es aún desconocida. Este estudio se realizó en los municipios de Irapuato y Abasolo, en donde se había reportado su presencia. Detectamos siete especies virales en 57 muestras colectadas: SCV, SMoV, el virus críptico de *Fragaria chiloensis* (FCICV), el latente de *Fragaria chiloensis* (FCICLV), el asociado a la palidosis de la fresa (SPaV), el del choque necrótico de la fresa (SNSV) y el amarillamiento marginal tenue de la fresa (SMYEV). Éstos se encontraron en infecciones sencillas y en 24 mezclas, conformando el complejo viral local de fresa (LSVC). Los más abundantes fueron: SMoV, FCICV, SNSV y SMYEV. Se compararon las secuencias de nucleótidos de los aislamientos virales mexicanos con los de EE. UU.

Palabras clave adicionales: virus de fresa, infecciones virales mixtas.

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una fruta pequeña de gran importancia en todo el mundo. México ha sido un importante productor de fresa durante muchos años (FAOSTAT, 2011). Aunque, existen 12 estados diferentes productores de fresa, sólo tres estados -Michoacán (Mich.),

Abstract. Irapuato county, in Guanajuato state in central Mexico, was the main strawberry producer at national level, where viral infections was one of the causes for the decrease in the amount of acres cultivated with this crop. *Strawberry mottle virus* (SMoV), *Strawberry crinkle virus* (SCV), and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) were previously found affecting strawberry production in Irapuato; however, the viral diversity present in strawberry fields of Mexico is unknown. This survey was carried in a small area of Irapuato and Abasolo counties, in Guanajuato state, where the highest viral diversity associated to strawberry has been reported. We detected seven different viral species in 57 samples collected: SCV, SMoV, *Fragaria chiloensis* cryptic virus (FCICV), *Fragaria chiloensis* latent virus (FCILV), *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV), *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV), and *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV). All in single and in 24 different mixed infections, conforming the Irapuato's Local Strawberry Virus Complex (LSVC). The most abundant viruses were SMoV, FCICV, SNSV, and SMYEV. We compared nucleotide sequences of strawberry Mexican viral isolates with those that affect strawberry in the USA, finding deletions, silent and non-silent mutations in the Mexican isolates.

Additional keywords: strawberry viruses, mixed viral infections.

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a small fruit crop of great importance throughout the world. Mexico has been an important strawberry producer for many years (FAOSTAT, 2011). Although, there are 12 different states producing strawberries, only three states Michoacan (Mich.), Baja California (B.C.) and Guanajuato (Gto.), generate more than 90% of the national production. Within

Baja California (BC) y Guanajuato (Gto.)- generan más del 90% de la producción nacional. Dentro de estos tres estados, las ciudades de Zamora en Mich., Ensenada en BC e Irapuato en Gto., son las más importantes. En la década de los 70's, Irapuato fue el principal productor, y ha sido históricamente una zona de producción de fresa en los últimos 100 años. Recientemente, la introducción de cultivos hortícolas nuevos y más rentables, tales como el brócoli y la coliflor, en la zona agrícola de Irapuato, han desplazado el cultivo de la fresa. Además, los problemas fitopatológicos, incluyendo las enfermedades virales, podrían haber desempeñado un papel importante influyendo en el desplazamiento de este cultivo.

En 1989 la incidencia de los virus dentro de los viveros de Irapuato varió del 10% - 67%. En los campos de producción, la incidencia fue aún mayor en las localidades (93% y 25%, respectivamente), según lo reportado por Teliz-Ortiz y Trejo-Reyes, (1989). En ese reporte, con el uso de injertos de plantas indicadoras se observaron dos virus en infecciones simples y mixtas: el virus del moteado (SMoV) y el del enrollamiento (SCV) de la fresa (Teliz-Ortiz y Trejo-Reyes, 1989). En otro estudio realizado en el 2004 en Irapuato, se detectó el virus de la mancha anular latente (SLRSV) mediante ELISA (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). Nuestro grupo ha reportado infecciones virales de la fresa con hasta seis especies diferentes en una muestra de una pequeña área de producción en el centro de México (Silva-Rosales *et al.*, 2013). Por último, existen reportes de infecciones virales mixtas en plantas de fresa en los EE.UU. (Martin y Tzanetakis, 2006) y en Europa (Fránová-Honetslegrová *et al.*, 1999). En este estudio, se realizó una investigación en Irapuato utilizando 11 diferentes pares de cebadores (primers) diseñados para detectar varios virus encontrados en los EE.UU.: SLRSV (Postman *et al.*, 2004), el del choque necrótico (SNSV) (Tzanetakis *et al.*, 2001), el clorótico moteado de la fresa (SCFaV) (Tzanetakis and Martin, 2007), el virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV) (Tzanetakis *et al.*, 2003), el latente de *Fragaria chiloensis* (FCILV) (Tzanetakis and Martin, 2005b), el de la palidosis asociada a la fresa (SPaV) (Tzanetakis *et al.*, 2004), el críptico de *Fragaria chiloensis* (FCICV) (Tzanetakis and Martin, 2005a), SMoV (Martin *et al.*, 2009), el virus de la rizadura (SVBV), SCV y el del amarillamiento marginal tenue (SMYEV) (Thompson *et al.*, 2003). Algunos de estos virus fueron detectados en infecciones simples o mixtas conformando el "complejo local viral de la fresa en Irapuato" (LSVC). Con el fin de tener una valoración inicial de la diversidad viral y la variabilidad del LSVC en Irapuato, México, las secuencias de algunos segmentos virales amplificadas fueron obtenidas y se compararon con los reportados en EE.UU.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se recolectaron un total de 57 muestras de fresas de las variedades "Camino Real", "Festival" y "Sweet Charlie", así como algunos clones resultantes de un programa local de mejoramiento desarrollado entre el INIFAP y el CIVESTAP-Irapuato. Todas las muestras se recolectaron en un área de 851

these federal states, Zamora in Mich., Ensenada in BC and Irapuato in Gto., are the most important. In the 1970s, Irapuato was the main producer, and has historically been a strawberry producing area for the last 100 years. Lately, the introduction of new and more profitable horticultural crops, such as broccoli and cauliflower, to the agricultural zone of Irapuato, has displaced the strawberry cultivation. Furthermore, phytopathological problems, including viral diseases, might have played an important role affecting strawberry cultivation.

In 1989 the virus incidence within the nurseries of Irapuato ranged from 10% to 67%. In producing fields, the incidence was even higher in both localities (93% and 25%, respectively), as reported by Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, (1989). In that report, using grafting indicator plants two viruses were found in single and mixed infections: *Strawberry mottle virus* (SMoV) and *Strawberry crinkle virus* (SCV) (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). Other study conducted in 2004 in the Irapuato county found *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) through ELISA (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). We have also previously reported strawberry viral infections with up to six different species in a sample from a small producing area in central Mexico (Silva-Rosales *et al.*, 2013). Mixed infections of virus have been reported before in strawberry plants in the USA (Martin and Tzanetakis, 2006) and Europe (Fránová-Honetslegrová *et al.*, 1999). In the present work, a survey was conducted in Irapuato using 11 different pairs of primers designed to detect several viruses reported in the USA: SLRSV (Postman *et al.*, 2004), *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV) (Tzanetakis *et al.*, 2001), *Strawberry chlorotic fleck virus* (SCFaV) (Tzanetakis and Martin, 2007), *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV) (Tzanetakis *et al.*, 2003) *Fragaria chiloensis latent virus* (FCILV) (Tzanetakis and Martin, 2005b), *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV) (Tzanetakis *et al.*, 2004), *Fragaria chiloensis cryptic virus* (FCICV) (Tzanetakis and Martin, 2005a), SMoV (Martin *et al.*, 2009), *Strawberry vein banding virus* (SVBV), SCV and *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) (Thompson *et al.*, 2003). Some of these viruses were detected in single or mixed infections conforming the Irapuato's Local Strawberry Virus Complex (LSVC). In order to have an initial approach for the viral diversity and variability of the LSVC in Mexico, the sequences for some amplified viral segments were obtained and compared with those reported from USA.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. A total of 57 samples from the 'Camino Real', 'Festival' and 'Sweet Charlie' commercial strawberry varieties, and some advanced clones from a local breeding program between INIFAP and Cinvestav-Irapuato, were collected within an 851 sq km area of Irapuato County. Strawberry UC-4 and UC-10 were grown at the same time as indicator of virus infection in one of the locations, La Mocha. These cultivar lines have been reported to show the characteristic viral symptoms when infected with some pathogens including virus (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010). UC-4 is susceptible

kilómetros cuadrados en la ciudad de Irapuato. Los clones UC-4 y UC-10 se cultivaron al mismo tiempo como indicadoras de las infecciones virales en una de las locaciones llamada "La Mocha". Se ha reportado previamente que estas líneas de cultivares mostraron los síntomas virales característicos cuando se infectaron con algunos patógenos, incluyendo algunos virus (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010). La UC-4 es susceptible a SCV, SMYEV y SMoV, y la UC-10 es susceptible a SPaV (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010).

Muestreo. Se recolectaron hojas de plantas con síntomas virales en plantaciones experimentales y comerciales de 13 lugares diferentes en áreas de Irapuato y Abasolo, en el estado de Guanajuato, durante las temporadas de cosecha 2007-2008, 2008-2009 y 2012-2013 (abril y diciembre de 2007, julio y diciembre de 2008 y julio del 2013), conformando cinco conjuntos diferentes de muestras (Cuadro 1). El número de áfidos (vectores de transmisión de virus) se registró en cada lugar de acuerdo con Holman *et al.*, (1991), junto con una escala hedónica de vigor de la planta, con valores asignados de la 5, donde 1 corresponde al más débil y 5 al más fuerte.

Aislamiento de ARN total. La extracción del ARN total se realizó de acuerdo a lo descrito por Halgren *et al.*, (2007), donde 150 mg de tejido foliar se molieron y homogeneizaron con 1 mL de amortiguador de extracción (200 mM Tris-HCl, 300 mM LiCl, 1.5% de litio-dodecil-sulfato, 10 mM EDTA, 1% de desoxicolato de sodio, 2% de polivinilpirrolidona, 1% Tergitol NP-40 y 1% de 2-mercapto-etanol) después de la centrifugación (16000 xg durante 20 min). Se recolectó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de acetato de potasio 6 M, pH 6.5. La mezcla se incubó a -20°C durante 30 min y se centrifugó a 16000 xg durante 10 min. El ARN se precipitó con alcohol isopropílico frío por centrifugación a 16000 xg durante 20 min. El sedimento se resuspendió en 500 µL de solución de lavado (Tris 10 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM y etanol al 50%). El sedimento final que contenía el ARN se resuspendió mediante la adición de una solución de Tris-EDTA y 25 µL de leche de sílice/vidrio. Para finalizar, se realizó una centrifugación más a 2375 xg durante 10 seg, según lo sugerido por Rott and Jelkmann (2001), y modificado por Tzanetakis *et al.*, (2005). La concentración de ARN se cuantificó por medición de absorbancia a 260 nm y su calidad se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Detección viral por PCR y su secuenciación. Se llevaron a cabo experimentos de PCR para todas las muestras de ARN extraídas utilizando primers desarrollados en el laboratorio de Bob Martin (USDA), y dirigidos contra once de los virus más importantes que afectan a las fresas en todo EE.UU. (SLRSV, SNSV, SCFaV, BPYV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SVBV, SCV y el SMYEV). El mRNA endógeno NADH deshidrogenasa se amplificó como un control interno (Cuadro 2). Se utilizó la SuperScript III (Invitrogen Corporation; California, EE.UU.) para realizar la transcripción reversa y la DreamTaq DNA Polimerasa (Fermentas) para PCR, ambos de acuerdo con las

to SCV, SMYEV, and SMoV, and UC-10 is susceptible to SPaV (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010).

Sampling procedure. Plant leaves with viral symptoms were collected in experimental and commercial plantations from 13 different locations in Irapuato and Abasolo areas, in the Guanajuato state, during the 2007-2008, 2008-2009 and 2012-2013 growing seasons (April and December, 2007, July and December, 2008 and July, 2013), conforming five different sampling sets (Table 1). The number of aphids (virus-transmitting vectors), were recorded at each location, according to Holman *et al.* (1991), along with an assigned plant vigor scale ranging from 1 to 5, from the weakest to the strongest for the general plant appearance.

Total RNA isolation. Total RNA extraction was performed as described by Halgren *et al.* (2007), 150 mg of leaf tissue was grinded and homogenized with 1 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 300 mM LiCl, 1.5% lithium-dodecyl-sulfate, 10 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 2% polyvinyl-pyrrolidone, 1% Tergitol NP-40 and 1% 2-mercapto-ethanol) after centrifugation (16000 xg 20 min). Supernatant was recovered and an equal volume of 6 M potassium acetate pH 6.5 was added. The mixture was incubated at -20 °C for 30 min and centrifuged at 16000 xg for 10 min. The RNA was precipitated with cold isopropyl alcohol by centrifugation at 16000 xg for 20 min. The pellet was re-suspended in 500 µL of washing solution (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl and 50% ethanol). The pellet containing the RNA was re-suspended by adding a Tris-EDTA solution and 25 µL of silica/glass milk. Finally, a further centrifugation at 2375 xg for 10 sec was carried out as suggested by Rott and Jelkmann, 2001, and modified by Tzanetakis *et al.* (2005). The RNA concentration was quantified by measuring absorbance at 260 nm and its quality was verified by electrophoresis in a 1% agarose gel.

Viral detection by PCR and sequencing. PCRs were carried out for all extracted RNA samples using primers developed in Bob Martin's laboratory (USDA), directed against eleven of the most important viruses affecting strawberries mainly in the USA (SLRSV, SNSV, SCFaV, BPYV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SVBV, SCV, and SMYEV). The endogenous NADH dehydrogenase mRNA was amplified as an internal control (Table 2). SuperScript III (Invitrogen Corporation; California, USA) was used to perform the reverse transcription and DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas) for PCR, both according to the manufacturer instructions.

The nucleotide sequences of viral fragments were obtained after PCR amplification and cloned into pJET1.2/blunt CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). The sequences were cured and deposited in the GenBank database with the following accession numbers: FCILV (JQ629412), SCV (JQ629413), SMoV (JQ629414), SMYEV (JQ629417), SNSV (JQ629415) and SPaV (JQ629416). The fragment obtained after FCICV amplification was 152 bp in length and did not meet GenBank requirements to be included in the database (at least 200 bp).

Cuadro 1. Muestras de fresa recolectadas de los cultivares de Abasolo e Irapuato, Guanajuato, México. Los insectos vectores y sus síntomas (vigor de la planta) se asociaron a la presencia viral.

Table 1. Strawberry samples collected in cultivars from Abasolo and Irapuato counties, Guanajuato, Mexico. Insects vectors and symptoms (plant vigour) were associated to viral presence.

Sample	Locality	Cultivar	Plant origin: (L) Irapuato or (F) Abasolo	Aphid population ^f	Plant Vigour ^g	Number of viral species found
1	La Mocha	'Camino Real'	L	1	4.5	2
2	Malvas	'Camino Real'	L	2	3.5	2
3	La Garrida	'Camino Real'	L	5	2	1
4	La Calera	'Sweet Charlie'	L	5	3.5	2
5	Marquez	'Sweet Charlie'	L	5	3	1
6	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	2
7	Tomelopitos	'Sweet Charlie'	L	3	4.5	2
8	Rivera de Guadalupe	'Festival'	L	1	4.5	3
9	Guadalupe de Rivera	'Camino Real'	F	1	4.5	0
10	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	5	2
11	La Mocha	'Camino Real'	L	1	3	4
12	Malvas	'Festival'	L	1	3.5	1
13	Malvas	'Camino Real'	L	1	3.5	3
14	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	1
15	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	4	1
16	Tomelopitos	'Sweet Charlie'	L	3	2	3
17	Tomelopitos	'Festival'	L	1	3.5	1
18	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	4	0
19	Ojo de Agua	'Camino Real'	F	1	4	0
20	Tomelopitos	'Festival'	L	2	4	4
21	Malvas	'Festival'	F	2	3	5
22	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	1	3	5
23	La Mocha	'Festival'	L	1	4.5	6
24	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	1	2.5	2
25	Ojo de Agua	'Camino Real'	F	1	4.5	3
26	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	4	3
27	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	2
28	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	0
29	El Copalillo	'Camino Real'	L	1	3	3
30	Serrano	'Camino Real'	F	2	4	2
31	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
32	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	4
33	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
34	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
35	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	2
36	La Mocha	'Festival'	L	5	1	4
37	La Mocha	'Festival'	L	5	1	2
38	La Mocha	'Festival'	L	5	1	2
39	La Mocha	'Festival'	L	5	1	0
40	La Mocha	'Festival'	L	5	1	3
41	La Mocha	10.50	L	5	3.8	0
42	La Mocha	10.50	L	5	3.8	1
43	La Mocha	10.61	L	5	2.8	3
44	La Mocha	10.19	L	5	1.8	1
45	La Mocha	10.49	L	5	1.5	1
46	La Mocha	Nikté	L	5	2.8	0
47	La Mocha	10.51	L	5	4.0	0
48	La Mocha	10.21	L	5	1.0	2
49	La Mocha	8.508	L	5	2.3	1
50	La Mocha	8.453	L	5	4.3	1
51	La Mocha	8.453	L	5	4.3	1
52	La Mocha	7.168	L	5	2.5	2
53	La Mocha	7.168	L	5	2.5	1
54	La Mocha	8.453	L	5	4.3	0
55	La Mocha	8.453	L	5	4.3	0
56	La Mocha	8.492	L	5	3.6	1
57	La Mocha	8.492	L	5	3.6	3

Collects: A (April, 2007), B (December, 2007), C (July, 2008), D (December, 2008), E (July, 2013)

^f = Arbitrary scale where 1 means absence of aphids and 5 more than 20 aphids per plant.

^g = Arbitrary scale 1 to 5, where 1 means a meager plant, 2 poor vigorous plant, 3 medium vigorous plant, 4 vigorous plant and 5 extremely vigorous plant.

Cuadro 2. Primers utilizados para detectar los diferentes virus reportados en este trabajo y el fragmento de tamaño esperado.
 Table 2. Primers used to detect the different viruses reported in this work and the expected size fragment.

Acronyms/Virus name and primers	Amplified fragment size	Reference
SLRSV Strawberry latent ringspot nepovirus		
CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	SLRSV DET F SLRSV DET R	497bp (Postman <i>et al.</i> , 2004)
SNSV Strawberry Necrotic Shock virus		
GAG TAT TTC TGT AGT GAA TTC TTG GA ATT ATT CTT AAT GTG AGG CAA CTC G	SNSV CPbeg F SNSV CPend R	800+bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2001)
SCFaV Strawberry chlorotic fleck		
CGT GGG TGA TCG CTA C ATA CGA CGC CTT CTGT	SCFV p60detF SCFV p60detR	392bp (Tzanetakis and Martin, 2007)
BPYN Beet pseudo-yellow virus		
TGA AAG ATG TCC RCT AAT GAT A TTC ATA TTA AGG ATG CGC AGA	BPY CPm R BPY CPm F	334bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2003)
FCILV Fragaria chiloensis latent virus		
ACC ACT TCA CCA CCA GAT CG CAA GCC AAC TCA CCA TGA CC	FC F FC R,	~330bp (Tzanetakis and Martin, 2005b)
SPaV Strawberry pallidosis associated virus		
GTG TCC AGT TAT GCT AGG TC, TAG CTG ACT CAT CAA TAG TG,	SP F SP R	517bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2004)
FCICV Fragaria chiloensis cryptic virus		
AAG TCC GTG AGC ACT GCC AT, TGA ATA CAA GTA ACG GGA ATT GA,	CRYPTIC F CRYPTIC R	151bp (Tzanetakis and Martin, 2005a)
SMoV Strawberry mottle virus		
GTA GTT TAG TGA CAA TCC AAG CGG A ACA TCT CCA/G AAC AGT TTA TA/TG TCA/G TGT/A TGG AC	SMoV1 F SMoV1 R	384bp (Thompson and Jelkmann, 2003)
SVBV Strawberry vein banding virus		
TGA ACG CAA AAA ATC CTA TC TGT TCT GAA CAG ATT GAA TC	SVBV1 SVBV2	472bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003)
SCV Strawberry crinkle virus		
CAT TGG TGG CAG ACC CAT CA TTC AGG ACC TAT TTG ATG ACA	SCD1 F SCD1 R	345bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003)
SMYEV Strawberry mild yellow edge virus		
GTG TGC TCA ATC CAG CCA G, CAT GGC ACT CAT TGG AGC TGG G	SMYEVF SMYEV R	271bp (Chang <i>et al.</i> , 2007)
Internal control NADH dehydrogenase Nd2 subunit		
GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C AGT AGA TGC TAT CAC ACA TAC AAT	NADH F NADH R	721bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003) (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2007)

instrucciones del fabricante.

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos virales se obtuvieron después de la amplificación PCR y se clonaron en el pJET1.2/blunt CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). Se curaron las secuencias y se depositaron en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: FCILV (JQ629412), SCV (JQ629413), SMoV (JQ629414), SMYEV (JQ629417), SNSV (JQ629415) y SPaV (JQ629416). El fragmento obtenido después de la amplificación del FCICV fue de 152 pb de longitud y no cumplió con los requisitos de GenBank para ser incluido en la base de datos (por lo menos 200 pb).

RESULTADOS

Análisis de los síntomas. Se analizaron 57 muestras de fresas provenientes de Irapuato y Abasolo. Cuarenta correspondieron a las variedades comerciales 'Camino Real', 'Festival' y 'Sweet Charlie', y doce fueron clones desarrollados dentro de un programa local de mejoramiento de fresas locales. Las fresas UC-4 y UC-10 se cultivaron al mismo tiempo, como plantas indicadoras de infecciones virales, y sirvieron como un marcador indirecto para establecer cuales virus serían parte del LSVC. Durante el verano, las plantas UC-4 generalmente desarrollaron un enrojecimiento prematuro visible en los bordes de las hojas, el cual se extendió a lo largo de toda la hoja dándoles una apariencia de pseudo-latencia. Estas hojas infectadas murieron prematuramente y a la planta le crecieron hojas nuevas. Por lo general, estas hojas eran más pequeñas de lo normal, y en algunos casos, estaban arrugadas, deformadas, moteadas con manchas cloróticas o curvadas. Las plantas indicadoras infectadas UC-4 y/o UC-10, mostraron enfermedades crónicas durante tres o cuatro meses y luego murieron.

Se encontraron áfidos en casi la mitad de los sitios de muestreo y se identificaron utilizando una guía taxonómica para áfidos de la región (Holman *et al.*, 1991). Las especies de áfidos predominantes fueron: *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell), vector de SCV y SMYEV, y *Aphis gossypii* vector para la transmisión del SMoV (Tzanetakis and Martin, 2013).

Diversidad viral asociada a los cultivos de fresa mexicana. La diversidad viral asociada a los cultivos de fresa mexicana es poco conocida. En este estudio, se analizaron 57 muestras de fresas procedentes de 13 ubicaciones diferentes en Irapuato y Abasolo, dentro de la subregión geográfica conocida como "El Bajío" (Cuadro 1). El análisis fue realizado después de la amplificación de fragmentos virales presentes en las muestras analizadas por PCR. Los resultados revelaron la presencia de siete especies virales diferentes: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV y SMYEV, ya sea en infecciones simples o mixtas. Cuarenta y siete muestras fueron positivas para al menos uno de los siete virus presentes, y 10 no dieron lugar a ningún producto viral amplificado, y, por lo tanto, fueron negativas. La presencia de FCICV fue asignado basándose en la secuencia del fragmento amplificado por PCR de 151 nucleótidos (AAGTCCGTGAGCACTGCCAATGCCCCGTGACGAATTACTCTGCCTTCGAATGCTCA

RESULTS

Symptom survey. Fifty-seven strawberry samples from Irapuato and Abasolo counties were analyzed. Forty correspond to 'Camino Real', 'Festival' and 'Sweet Charlie' commercial varieties and twelve to advanced clones from a local strawberry breeding program. Strawberry UC-4 and UC-10 were grown at the same time, as indicator control plants of virus infections, and served as an indirect hint to establish which viruses would be part of the LSVC. During the summer, UC-4 plants usually developed visible premature redness at the edges of the leaves, which spread throughout the entire leaf, giving them the appearance of pseudo-dormancy. These infected leaves died prematurely and the plant grew new leaves. Usually, these leaves were smaller than normal, and in some cases, they were wrinkled, deformed, mottled with chlorotic spots, or curled. Infected UC-4 and/or UC-10 indicator plants showed chronic illness for three or four months and then died.

Aphids were found in almost half of the sampling sites and were identified using a taxonomic guide for aphids in the region (Holman *et al.*, 1991). The prevailing aphid species were *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell), vector for SCV, SMYEV and *Aphis gossypii* vector for SMoV transmission (Tzanetakis and Martin 2013).

Viral diversity associated to Mexican strawberry crops. The viral diversity associated to Mexican strawberry crops is poorly known. In this study, we analyzed 57 strawberry samples from 13 locations in the Irapuato and Abasolo counties, within "El Bajío" geographical sub-region (Table 1). The analysis was done after the amplification of the viral fragments present on the samples, by PCR. Our data revealed the presence of seven different viral species: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV and SMYEV, either in single or mixed infections. Forty-seven samples were positive for at least one of the seven viruses present, and 10 did not give rise to any amplified viral product, and were therefore negative. The presence of FCICV was assigned based on the sequence of the PCR amplified fragment of 151 nucleotides (AAGTCCGTGAGCACTGCCAATGCCCCGTGACGAATTACTCTGCCTTCGAATGCTCAATTTCCAGAATACGTCGTAGAATCTGGCGCAATGTCAACTTTGCGTGACATTCCATTCACCAAGACGCTGGAATCAATTCCCCTACTTGTATTCA) which was identical to the same stretch of the RNA1 segment of the only isolate from Chile (DQ093961.2), available on NCBI (Tzanetakis and Martin, 2005a).

SMoV (*Secoviridae*), was detected in 31 out of the 57 samples tested (54%), two members of the *Bromoviridae* family, FCILV and SNSV, in 25 samples (44%), SMYEV (*Alphaflexiviridae*) in 15 samples (26%), SCV (*Rhabdoviridae*) in 16 samples (28%), SPaV (*Closteroviridae*) in 9 samples (16%), and FCICV in 14 samples (24%).

We identified 14 samples infected with only one virus: eight had SMoV, five had SCV and one had SPaV. (Table 3). The remaining 29 samples had mixed infections with two or more viruses present conforming 23 combinations (C) (Table 3). Of the 14 samples with two

ATTTCAGAATACGTCGTAGAAATCTGGCGCAATGT
CAACTTTGCGTGCACATTCCATTCACCAAGACGCT
GGAATCAATTCCCGTTACTTGTATTCA) el cual fue
idéntico al mismo tramo del segmento de ARN1 del único
aislado de Chile (DQ093961.2) disponible en el NCBI
(Tzanetakis and Martin, 2005a).

El SMoV (*Secoviridae*) se detectó en 31 de las 57
muestras analizadas (54%), dos miembros de la familia
Bromoviridae, FCILV y SNSV, en 25 muestras (44%),
SMYEV (*Alphaflexiviridae*) en 15 muestras (26%), SCV
(*Rhabdoviridae*) en 16 muestras (28%), SPaV
(*Closteroviridae*) en 9 muestras (16%) y el FCICV en 14
muestras (24%).

Se identificaron 14 muestras infectadas con sólo un
virus: ocho tenían SMoV, cinco tenían SCV y uno tenía
SPaV. (Cuadro 3). Las 29 muestras restantes tenían
infecciones mixtas con dos o más virus presentes en 23
combinaciones (C) (Cuadro 3). De las 14 muestras con dos
virus, cinco contenían la combinación SMoV + FCICV
(C1), dos con SMoV + SMYEV (C2), dos con SMoV +
SNSV (C6) y dos con SMYEV + SNSV (C7). Las otras tres
muestras contenían una combinación no repetitiva de
FCICV + FCILV (C3), FCILV + SCV (C4) y SMoV + SPaV
(C5). Doce muestras tenían mezclas de tres virus: dos con
SMoV + FCICV + FCILV (C9), dos con SMYEV + SNSV +
SPaV (C10) y dos con SMoV + SCV + SMYEV (C16). Los
seis restantes tenían las combinaciones SCV + SNSV +
SPaV (C8), SMoV + FCICV + SCV (C11), SMoV + SNSV +
SPaV (C12), SMoV + SCV + SNSV (C13), SMoV + FCICV +
SNSV (C14) y SCV + SMYEV + SNSV (C15).
Adicionalmente, se observaron cuatro muestras únicas con
mezclas de cuatro virus FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV
(C17), SMoV + SCV + SNSV + SPaV (C18), SMoV +
SMYEV + SNSV + SPaV (C19) y SMoV + SCV + SMYEV +
SNSV (C20). Las dos muestras con cinco virus mixtos
fueron: FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SNSV (C21) y
SMoV + FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV (C22). Por
último, únicamente se encontró una muestra con seis virus:
FCICV + FCILV + SCV + SMoV + SMYEV + SPaV (C23)
(Cuadro 4).

Con la finalidad de determinar la relación de las
cepas virales que se encontraron con aquellas reportadas en
los EE.UU., de donde provenían la mayoría de las plántulas,
se compararon las secuencias parciales de los diferentes
segmentos de los nucleótidos de las siete especies virales
detectadas (Figura 1). No se observaron diferencias entre la
secuencia de nucleótidos de SPaV parecida a HSP70 del
aislamiento de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2004) y el
aislamiento encontrado en éste trabajo. El FCICV de esta
región geográfica mostró dos diferencias con la secuencia de
referencia del Chile (Tzanetakis *et al.*, 2008): un nucleótido
cambió y otro fue escindido en el ORF de la RdRp (ARN
polimerasa dependiente de ARN). Se encontraron más
diferencias de nucleótidos en el SMoV mexicano con ocho
diferencias de nucleótidos en comparación con el 3' UTR de
su par chileno más similar (Thompson and Jelkmann, 2003).
Todas las otras especies virales detectadas e identificadas en
este estudio, mostraron diferencias de nucleótidos que
resultaron en cambios de aminoácidos en diferentes ORFs

viruses, five contained the SMoV+FCICV combination
(C1), two of SMoV+SMYEV (C2), two of SMoV+SNSV
(C6) and two of SMYEV+SNSV (C7). The other three
samples contained a non-repetitive combination of
FCICV+FCILV (C3), FCILV+SCV (C4) and SMoV+SPaV
(C5). Twelve samples had mixtures of three viruses: two of
SMoV+FCICV+FCILV (C9), two of
SMYEV+SNSV+SPaV (C10) and two of
SMoV+SCV+SMYEV (C16). The remaining six had the
combinations SCV+SNSV+SPaV (C8),
SMoV+FCICV+SCV (C11), SMoV+SNSV+SPaV (C12),
SMoV+SCV+SNSV (C13) SMoV+FCICV+SNSV (C14)
and SCV+SMYEV+SNSV (C15). We found four unique
samples with mixes of four viruses
FCICV+FCILV+SMYEV+SNSV (C17),
SMoV+SCV+SNSV+SPaV (C18),
SMoV+SMYEV+SNSV+SPaV (C19) and
SMoV+SCV+SMYEV+SNSV (C20). The two samples
with five viruses mixed
FCICV+FCILV+SCV+SMYEV+SNSV (C21) and
SMoV+FCICV+FCILV+SMYEV+SNSV (C22). Lastly,
we found just one sample with six viruses contained
FCICV+FCILV+SCV+SMoV+SMYEV+SPaV (C23)
(Table 4).

In order to determine the relatedness of viral isolates
found with those reported in the USA, where most of the
plantlets came from, the partial nucleotide sequences from
different segments of the seven viral species detected were
compared (Figure 1). There are no differences between the
SPaV nucleotide HSP70-like sequence of USA isolate
(Tzanetakis *et al.*, 2004) and isolate found in this work. The
FCICV from this geographic region showed two differences
with the reference sequence from Chile (Tzanetakis *et al.*,
2008), one nucleotide change and other was deleted in the
ORF of the RdRp (RNA-dependent RNA polymerase). More
nucleotide differences were found in the Mexican
SMoV with eight nucleotide differences compared with the
3' UTR of its most similar Chilean counterpart (Thompson
and Jelkmann, 2003). All the other viral species detected and
identified here had nucleotide differences resulting in amino
acid changes in different ORFs in four of the seven species
from Mexico when compared to their closest homologues: a
substitution of one Asparagine in the carboxy region of the
coat protein (CP) instead of a Glutamine in the SNSV of
USA (Tzanetakis *et al.*, 2010). One Serine was found instead
of one Proline in the same region (CP), of the *Strawberry
mild yellow edge virus* from Germany (Jelkmann *et al.*,
1990), and one Arginine for one Glutamic acid in the mid-
region of the RNA-dependent RNA polymerase of FCILV
from USA (Tzanetakis *et al.*, 2008). Finally, two amino acid
changes were inferred in the core region of the L protein
(RNA-dependent RNA polymerase) of the *Strawberry
crinkle virus*; one Leucine for an Isoleucine; and one Proline
for an Arginine, when compared to the Netherlands' isolate
(Klerks *et al.*, 2004).

DISCUSSION

Near to 30 DNA and RNA viruses have been
associated to strawberry in worldwide (Tzanetakis and

Cuadro 3. Muestras positivas y negativas para los siete virus detectados en las 57 muestras analizadas.
Table 3. Positive and negative samples for seven viruses detected in the 57 samples tested.

Family Virus	FCICV	Bromo FCILV	Rhabdo SCV	Sequi SMoV	Fexi SMYEV	Bromo SNSV	Closteros SPaV	...viridae	Viral diversity	Viral combination
Sample	-	JQ629412*	JQ629413	JQ629414	JQ629417	JQ629415	JQ629416			
1	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
2	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
3	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
4	-	-	-	+	-	-	+	-	2	C5
5	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
6	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
7	-	-	-	+	-	+	-	-	2	C6
8	+	-	-	+	-	+	-	-	3	C14
9	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
10	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
11	-	-	+	+	-	+	+	-	4	C18
12	-	-	-	-	-	-	+	-	1	S
13	-	-	-	+	-	+	+	-	3	C12
14	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
15	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
16	-	-	+	+	-	+	-	-	3	C13
17	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
18	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
20	+	+	-	-	+	+	-	-	4	C17
21	+	+	+	-	+	+	-	-	5	C21
22	+	+	-	+	+	+	-	-	5	C22
23	+	+	+	+	+	-	+	-	6	C23
24	+	+	-	-	-	-	-	-	2	C3
25	+	-	+	+	-	-	-	-	3	C11
26	+	+	-	+	-	-	-	-	3	C9
27	-	+	+	-	-	-	-	-	2	C4
28	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
29	+	+	-	+	-	-	-	-	3	C9
30	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
31	-	-	-	-	+	+	+	-	3	C10
32	-	-	+	-	+	+	-	-	3	C15
33	-	-	-	+	+	+	+	-	4	C19
34	-	-	+	+	+	-	-	-	3	C16
35	-	-	-	-	+	+	+	-	3	C10
36	-	-	-	+	+	-	-	-	2	C2
37	-	-	+	+	+	+	-	-	4	C20
38	-	-	-	-	+	+	-	-	2	C7
39	-	-	-	+	+	-	-	-	2	C2
40	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
42	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
43	-	-	+	-	-	+	+	-	3	C8
44	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
45	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
46	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
48	-	-	-	+	-	+	-	-	2	C6
49	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
50	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
51	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
52	-	-	-	-	+	+	-	-	2	C7
53	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
54	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
56	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
57	-	-	+	+	+	-	-	-	3	C16

* Refers to Gene Bank (NCBI) accession number
S Refers to single infection
- No virus present in these samples

Cuadro 4. Abundancia y diversidad de mezclas virales encontradas en muestras de fresa.
Table 4. Abundance and diversity of the viral mixes found in strawberry samples.

Mixed viruses	Abundance	Viral mixes	ID
2	5	SMoV + FCICV	C1
	2	SMoV + SMYEV	C2
	2	SMoV + SNSV	C6
	2	SMYEV + SNSV	C7
	1	FCICV + FCILV	C3
	1	FCILV + SCV	C4
	1	SMoV + SPaV	C5
	3	2	SMoV + FCICV + FCILV
2		SMYEV + SNSV + SPaV	C10
2		SMoV + SCV + SMYEV	C16
1		SCV + SNSV + SPaV	C8
1		SMoV + FCICV + SCV	C11
1		SMoV + SNSV + SPaV	C12
1		SMoV + SCV + SNSV	C13
1		SMoV + FCICV + SNSV	C14
1		SCV + SMYEV + SNSV	C15
4		1	FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV
	1	SMoV + SCV + SNSV + SPaV	C18
	1	SMoV + SMYEV + SNSV + SPaV	C19
	1	SMoV + SCV + SMYEV + SNSV	C20
5	1	FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SNSV	C21
	1	SMoV + FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV	C22
6	1	SMoV + FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SPaV	C23

en cuatro de las siete especies de México, en comparación con sus homólogos más cercanos: una sustitución de una asparagina en la región carboxi de la proteína de la cápside (CP) en lugar de una glutamina en el SNSV de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2010). Se encontró una serina en lugar de una prolina en la misma región (CP), del virus del amarillamiento marginal tenue de la fresa de Alemania (Jelkmann *et al.*, 1990), y una arginina en lugar de un ácido glutámico en la región media de la ARN polimerasa dependiente de ARN del FCILV de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2008). Finalmente, dos cambios de aminoácidos se infirieron en la región central de la proteína L (ARN polimerasa de ARN) del virus del arrugamiento de la fresa; una leucina por una isoleucina; y una prolina en lugar de una arginina, en comparación con el aislado de Holanda (Klerks *et al.*, 2004).

DISCUSIÓN

Cerca de 30 virus de ADN y ARN se han asociado a la fresa en todo el mundo (Tzanetakis and Martin, 2013), sin embargo, la diversidad viral asociada al cultivo de fresa es desconocido. En este trabajo, se detectaron siete virus en parcelas de fresa en una pequeña área del central estado mexicano de Guanajuato, en la región "El Bajío". Las infecciones mixtas no son nuevas en los campos de fresa, tal

Martin, 2013), however, the viral diversity associated to strawberry crop is unknown. In this work, seven viruses were detected in strawberry plots in a small area of the Mexican central state of Guanajuato, within "El Bajío" region. Mixed infections are not new to strawberry fields, as reports from the 1930s proposed the coexistence of viral mixtures involving mostly SCV (Martin and Tzanetakis, 2006). Also, SMYEV, SMoV, SPaV, *Strawberry latent C virus* (SLCV), and SVBV have been suggested to be present in mixed infections (Martin and Tzanetakis, 2006), but there are few reports outside of the USA addressing this issue. In this survey, SMoV was frequently found in mixed infections. From the 22 plants detected with mixed infection, 15 of them included SMoV. This is not surprising since this viral species, along with the SCV, was initially reported more than 20 years ago in this area (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). The prevalence for mixed infections seems to be a hallmark for strawberry viral infections. Two factors might have influenced the prevalence of SMoV and SCV in this region. The first one is the persistence of aphid populations that can transmit both viral species (Martin and Tzanetakis, 2006). The presence of aphid vectors might have facilitated the wide spread of mixed infections in the area under study, as roughly 75% of the samples analyzed here, have mixed infections. The second is the agronomic

como lo muestran los reportes de la década de los 30's donde se propone la coexistencia de mezclas virales conformadas principalmente por el SCV (Martin y Tzanetakis, 2006). También por el SMYEV, SMoV, SPaV, virus latente C (SLCV) y SVBV han sido sugeridos por estar presentes en infecciones mixtas (Martin and Tzanetakis, 2006), pero no hay muchos reportes fuera de los EE.UU. que aborden este tema. En el presente estudio se encontró al SMoV presente

cultural practices. Even though certificated plant is import from the USA, plants are infected as some of the producers in the region have nurseries in close proximity to first or second year production fields, acting as reservoirs for the LSVC.

The majority of mixed infections consisted of three or more different viral species, as shown by the sixteen different viral combinations (C8 to C23 in Table 4),

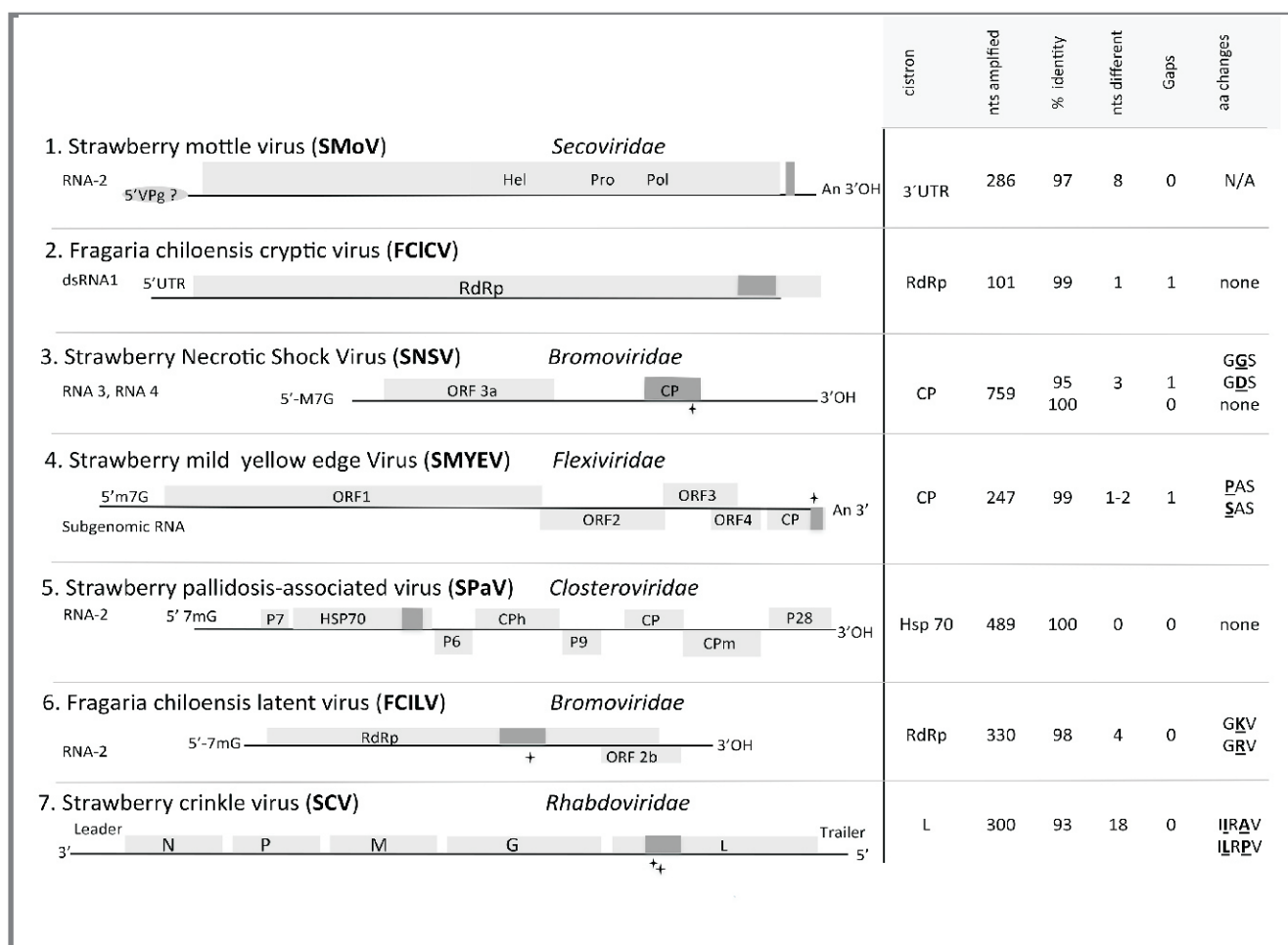


Figura 1. Segmentos de nucleótidos amplificados de los siete virus encontrados en infecciones simples o mixtas. Representación esquemática de los siete virus detectados correspondientes a las familias *Sequiviridae*, *Bromoviridae*, *Partitiviridae*, *Closteroviridae* y *Rhabdoviridae*; FCICV no está asignado a ninguna familia taxonómica. Los recuadros grises representan ORF dentro de las secuencias genómicas. Los pequeños recuadros de color gris oscuro representan las secuencias de nucleótidos amplificadas obtenidas en el presente estudio. Las cruces negras indican los sitios donde se detectaron los cambios en los aminoácidos. La tabla de la derecha muestra el nombre cistron y el tamaño de su fragmento amplificado y secuenciado, su porcentaje de identidad (con otras secuencias en el NCBI), así como el número de diferentes nucleótidos, presencia de huecos y los cambios en los aminoácidos (en negrita y subrayado). Las representaciones esquemáticas fueron realizadas basándose en (Fauquet *et al.*, 2005).

Figure 1. Amplified nucleotide segments of the seven viruses found in single or mixed infections. Schematic representation of the seven viruses detected corresponding to the *Sequiviridae*, *Bromoviridae*, *Partitiviridae*, *Closteroviridae* and *Rhabdoviridae* families; FCICV is not assigned to a taxonomic family. Grey boxes represent ORF within the genomic sequences. Small dark grey boxes represent the amplified nucleotide sequences reported here. Black crosses indicate the sites where amino acids changes were detected. The table on the right side shows the cistron name and size of its amplified and sequenced fragment, its percentage identity (with other sequences at NCBI), as well as the number of differing nucleotides, gaps presence and the amino acid changes (in bold and underlined). Schematic representations based on (Fauquet *et al.*, 2005).

con frecuencia en las infecciones mixtas. De las 22 plantas detectadas con infecciones mixtas, 15 de ellas incluyeron al SMoV. Esto no es de sorprenderse, ya que esta especie viral, junto con el SCV fue reportada por primera vez hace más de 20 años en esta área (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). La prevalencia de infecciones mixtas parece ser un sello distintivo de las infecciones virales de la fresa. Hay dos factores que podrían haber influido en la prevalencia del SMoV y del SCV en esta región. La primera de ellas es la persistencia de las poblaciones de áfidos que pueden transmitir ambas especies virales (Martin and Tzanetakis, 2006). La presencia de vectores áfidos podría haber facilitado la amplia propagación de infecciones mixtas en el área de estudio, ya que aproximadamente el 75% de las muestras analizadas presentó infecciones mixtas. La segunda, son las prácticas agronómicas del cultivo. A pesar de que la planta certificada es importada de los EE.UU., las plantas son infectadas ya que algunos de los productores de la región tienen viveros de plantas en las proximidades cercanos al primer o segundo año de producción, actuando como reservorios del LSV.

La mayoría de las infecciones mixtas se componía de tres o más diferentes especies virales, como se muestra por las dieciséis combinaciones virales diferentes (C8 a C23 en el cuadro 4), independientemente del cultivar de fresa evaluado. Las infecciones mixtas podrían verse favorecidas por la presencia de áfidos transmisores de SCV, SMYEV, SMoV y mosca blanca, transmitiendo el SPaV. Además, el FCILV y el SNSV se transmiten por el polen. Los trips, los cuales fueron observados pero no registrados en este trabajo, también pueden contribuir a la propagación del SNSV. La fresa se cultiva en esta región durante todo el año. La presencia de hospederos alternativos durante todo el año en muchos lugares donde se cultive la fresa, como especies de *Chenopodium* entre otras, en esta región (Vibrans, 2012), podría facilitar la presencia de las especies virales detectadas.

A pesar de tener pequeños productos amplificados por PCR, con el conjunto de oligonucleótidos utilizado, la secuenciación directa e inversa confirmó la fiabilidad de los cambios observados a nivel de nucleótidos o de aminoácidos. La falta de cambios en el SPaV en el gen HSP70 podría indicar que, o bien la misma cepa está presente en México y en los EE.UU., o las plántulas importadas ya estaban infectadas con el virus al entrar al país. Los cambios silenciosos de nucleótidos, ya sea en las regiones no codificantes, como en el caso de SMoV o el FCICV, así como los no-silenciosos, como en el caso de SNSV, SMYEV, FCILV y el SCV, sugieren la diversificación de virus ya sea desde los primeros años después de primera introducción del virus, si se introdujo primero en plantas contaminadas, o bien derivados de plantas silvestres y malas hierbas en las inmediaciones del área de siembra.

La frecuencia de infecciones virales mixtas en la fresa, ya sean de material importado contaminado o bien de cepas virales preexistentes, enfatiza la importancia de utilizar nuevos métodos y más rápidos para garantizar que las plántulas de fresa importadas estén libres de virus. Las

regardless of the strawberry cultivar tested. Mixed infections could be favored by the presence of aphids, transmitting SCV, SMYEV, SMoV and whiteflies, transmitting SPaV. Additionally, FCILV and SNSV are transmitted by pollen. Thrips, observed but not registered in this work, could also contribute to the spread of SNSV. Strawberry is cultivated in this region all year round. The presence of alternative hosts throughout the year in many places, where this crop is grown, like *Chenopodium* species among others, in this region (Vibrans, 2012), could facilitate the presence of the viral species detected.

In spite of having small products amplified by RT-PCR, with the set of oligonucleotides used, the forward and reverse sequencing confirmed the reliability of the changes observed at the nucleotide or amino acid level. The lack of changes in the SPaV at the HSP70 gene might indicate that either the same strain is present in both Mexico and the USA, or the imported plantlets were already infected with the virus upon entering the country. Silent nucleotide changes, either in the non-coding regions, as in the case of SMoV and FCICV, as well as non-silent ones, as in the case of SNSV, SMYEV, FCILV and SCV, suggest virus diversification either from earlier years after first viral introduction, if firstly introduced in contaminated plants, or else stemming from feral and weed plants in the nearby planting area.

The frequency of mixed viral infections in strawberry, either from contaminated imported material as well as from pre-existing viral strains, highlights to the importance of using new and fast methods to ensure that imported strawberry plantlets are virus-free. Mexican phytosanitary regulations require the *in situ* evaluation imported products. However, though sometimes aided by ELISA techniques to detect the presence of a few viruses, inspections have been mostly visual. This study suggests the need to develop molecular detection methods to detect viral strains in all regions that produce strawberry.

Single and mixed plant infections having up to six viral species of SMoV, SCV, FCILV, SPaV, FCICV, SNSV and SMYEV, were found in a very small area in the central Mexico surveyed here (El Bajío Region), in 23 different combinations. However, the number of viral combinations does not seem to be equivalent to the diversity in viral symptoms probably as a reflection of synergistic or antagonistic viral relationships or with the plant in the field. Different viral combinations as well as their order of arrival to the host produce different responses in the plant as observed for other systems. In the work, being SMoV the most frequent virus it is tempting to speculate that the combination of this virus with all the other remaining six viruses might be responsible for the outcome of symptoms on the plant (Figure 2). More controlled experiments with the different combinations of viruses are underway to test this hypothesis.

Viral modifications such as non-silent mutations were found in four viral species (SNSV, SMYEV, FCILV and SCV), when compared to their most similar counterparts would be a possible indication of the adaptation of the viruses to a new environment in case they were introduced from abroad. In addition, these changes present

regulaciones fitosanitarias mexicanas requieren la evaluación *in situ* de los productos importados. Sin embargo, aunque a veces con la ayuda de técnicas de ELISA para detectar la presencia de algunos virus, las inspecciones han sido en su mayoría visuales. Este estudio sugiere la necesidad de desarrollar métodos de detección molecular para detectar cepas virales en todas las regiones productoras de fresa.

Infecciones individuales o mixtas de plantas que tienen hasta seis especies virales de SMoV, SCV, FCILV, SPaV, FCICV, SNSV y SMYEV, fueron encontradas en un área muy pequeña en el centro de México (región del Bajío), en 23 combinaciones diferentes. Sin embargo, el número de combinaciones virales no parece ser equivalente a la diversidad de síntomas virales probablemente como un reflejo de las relaciones virales sinérgicas o antagonistas o con la planta en el campo. Diferentes combinaciones virales, así como su orden de llegada al hospedero, producen diferentes respuestas en la planta como se ha observado para otros sistemas. En el presente estudio, el SMoV fue virus más frecuente por lo que se podría especular que la combinación de este virus con los otros seis virus restantes podría ser el responsable de los síntomas en la planta (Figura 2). Actualmente están en marcha experimentos más controlados con las diferentes combinaciones de virus para comprobar esta hipótesis.

Se observaron algunas modificaciones virales tales como mutaciones no silentes en cuatro especies virales (SNSV, SMYEV, FCILV y SCV) en comparación con sus contrapartes más similares, esto sería una posible señal de la adaptación de los virus a un nuevo ambiente en caso de que hubieran sido introducidos del extranjero. Además, estos

in either structural (Coat protein or CP) or replication proteins (RNA dependent RNA polymerase or RdRp), could be of benefit for viruses to prevail (competing) with other viruses in the LSVC.

CONCLUSIONS

This study is an approach to the knowledge of the diversity of the strawberry viruses from Abasolo and Irapuato Counties, in Guanajuato State, we detected in 57 strawberry samples seven viruses: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV and SMYEV in simple or mixed viral infection, conformed the Irapuato's LSVC.

In the other hand, we found some changes in the viral sequences obtained that might lead to understand the relationship between viruses and the plant in an ecological niche.

Acknowledgements. This work was supported with grants no. 07-03-K662-051 A02 from Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) to AEJG, and 330/04 from “Fundación Guanajuato Produce, A.C.” to PADV and AEJG, and 2012-06-190290 from SAGARPA-CONACYT to LSR, PADG and AEJG. We are grateful to Dr. Ioannis Tzanetakis for providing some of the cDNAs that were used as positive controls of the experiments, and RNA isolation methodology, and to Nélida Vázquez and Jimena Carrillo Tripp for their technical assistance with part of the PCR and the cloning of the viral fragments.

LITERATURACITADA

Chang L, Zhang Z, Yang H, Li H and Dai H. 2007. Detection

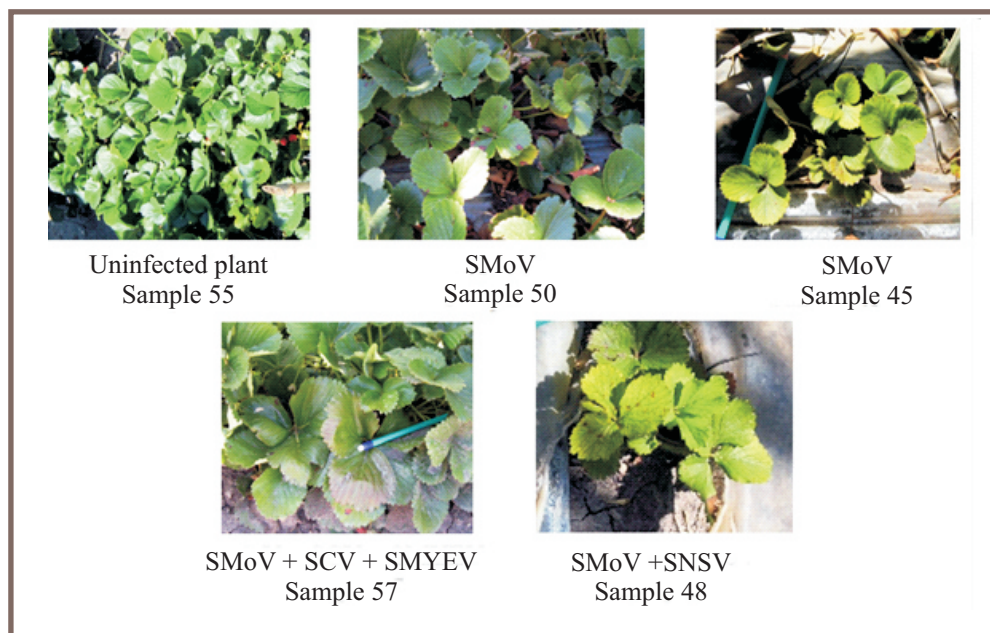


Figura 2. El SMoV fue el virus más abundante el cual produce síntomas diferenciales ante una infección única (superior) y en infección mixta viral (inferior). En cada caso se indica el virus encontrado y el número de muestra.

Figure 2. SMoV was the virus more abundant producing differential symptoms in single infection (upper) and in viral mixed infection (lower). In each case is indicated the virus found and the number of sample.

cambios presentes en cualquiera de las proteínas estructurales (proteína de la cápsida o CP) o de replicación (ARN polimerasa dependiente de ARN o RdRp) podrían ser de beneficio para que los virus prevalezcan (compitieran) con otros virus en el LSVC.

CONCLUSIONES

Este estudio es una aproximación al conocimiento de la diversidad de los virus de la fresa de Abasolo e Irapuato, en el estado de Guanajuato. En 57 muestras de fresas se detectaron siete virus: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV y SMYEV en infecciones virales simples o mixtas, conformando el LSVC de Irapuato.

Por otra parte, se observaron algunos cambios en las secuencias virales obtenidas lo cual podría llevar a entender la relación entre virus y la planta en un nicho ecológico.

Agradecimientos. Esta obra fue financiada con el apoyo financiero de los proyectos no. 07-03-K662-051 A02 del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) a AEJG, el 330/04 de "Fundación Produce Guanajuato, AC" para PADV y AEJG y el 2012-06-190290 de SAGARPA-CONACYT a LSR, PADG y AEJG. Estamos muy agradecidos con el Dr. Ioannis Tzanetakis por proporcionar algunos de los cDNAs que se utilizaron como controles positivos de los experimentos, y por la metodología de aislamiento del ARN. A Nélida Vázquez y Jimena Carrillo Tripp por su asistencia técnica con parte de los experimentos de PCR y la clonación de los fragmentos virales.

of Strawberry RNA and DNA Viruses by RT-PCR Using Total Nucleic Acid as a Template. *Journal of Phytopathology* 155:431-436.

FAOSTAT. 2011. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Retrieved September 10, 2011.

Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. 2005. *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 1259+p.

Fránová-Honetslegrová J, Mráz I, Nebesárová J and MS. 1999. Preferential binding of secondary veins in strawberry is caused by mixed virus infection. *Acta Virologica* 43:349-355.

Halgren A, Tzanetakis IE and Martin RR. 2007. Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology* 97:44-50.

Holman J, Peña MR y Bujanos MR. 1991. Guía para la identificación y análisis de los pulgones alados (Homóptera: Aphidae) del Bajío (Mexico City: CONACYT, INIFAP-SARH, COFAA-IPN.) pp. 8-11.

Jelkmann W, Martin RR, Lesemann DE, Vetten HJ and Skelton F. 1990. A new potyvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. *The Journal of General Virology* 71:1251-1258.

Klerks MM, Lindner JL, Vaskova D, Spak J, Thompson JR, Jelkmann W, and Schoen CD. 2004. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates.

European Journal of Plant Pathology 110:45-52.

Martin RR, Marcum DB and Buchner R. 2009. Evaluation of nursery greenhouse strawberries for the presence of viruses. In Annual Production Research Report. California Strawberry Commission. Watsonville. pp. 99-105.

Martin RR and Tzanetakis IE. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90:384-396.

Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Palé JR, Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R y Rivera-Bustamante RF. 2004. Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Hortícolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:187-197.

Postman JD, Tzanetakis IE and Martin RR 2004. First report of Strawberry latent ringspot virus in a *Mentha* sp from North America. *Plant Disease* 88:907-907.

Rott ME and Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420.

Silva-Rosales L, Vazquez-Sanchez MN, Gallegos V, Ortiz-Castellanos ML, Rivera-Bustamante R, Davalos-Gonzalez PA and Jofre-Garfias AE. 2013. First Report of *Fragaria chiloensis* cryptic virus, *Fragaria chiloensis* latent virus, Strawberry mild yellow edge virus, Strawberry necrotic shock virus, and Strawberry pallidosis associated virus in Single and Mixed Infections in Strawberry in Central Mexico. *Plant Disease* 97:1002-1002.

Teliz-Ortiz D and Trejo-Reyes A. 1989. Strawberry virus diseases in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7:38-40.

Thompson JR and Jelkmann W. 2003. The Detection and Variation of Strawberry mottle virus. *Plant Disease* 87:385-390.

Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vaskova D, Schoen, CD, Spak J and Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* 111:85-93.

Tzanetakis IE, Halgren AB, Keller KE, Hokanson SC, Maas JL, McCarthy PL and Martin RR. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease* 88:383-390.

Tzanetakis IE, Keller KE and Martin RR. 2005. The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *Journal of Virological Methods* 124:73-77.

Tzanetakis IE, Mackey IC and Martin RR. 2001. *Strawberry Necrotic Shock Virus: A New Virus Previously Thought to be Tobacco Streak Virus*. *Acta Horticulturae* 656:27-31.

Tzanetakis IE and Martin RR. 2005a. *Fragaria chiloensis* cryptic virus: A new strawberry virus found in *Fragaria chiloensis* plants from Chile. *Plant Disease* 89:1241-

- 1241.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2005b. New features in the genus Ilarvirus revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus. *Virus Research* 112:32-37.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2007. Strawberry chlorotic fleck: identification and characterization of a novel *Closterovirus* associated with the disease. *Virus Research* 124:88-94.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2013. Expanding Field of Strawberry Viruses Which Are Important in North America. *International Journal of Fruit Science* 13:184-195.
- Tzanetakis IE, Martin RR. and Scott SW. 2010. Genomic sequences of blackberry chlorotic ringspot virus and strawberry necrotic shock virus and the phylogeny of viruses in subgroup 1 of the genus Ilarvirus. *Archives of Virology* 155:557-561.
- Tzanetakis IE, Postman JD and Martin RR. 2007. Identification, detection and transmission of a new vitivirus from *Mentha*. *Archives of Virology* 152:2027-2033.
- Tzanetakis IE, Price R and Martin RR. 2008. Nucleotide sequence of the tripartite *Fragaria chiloensis* cryptic virus and presence of the virus in the Americas. *Virus Genes* 36:267-272.
- Tzanetakis IE, Wintermantel WM and Martin RR. 2003. First Report of Beet pseudo yellows virus in Strawberry in the United States: A Second Crinivirus Able to Cause Pallidosis Disease. *Plant Disease* 87:1398-1398.
- Vibrans, H. 2012. "Sitio Malezas de México". Retrieved Jun 28, 2012, 2012, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Welsh-Assembly-Goverment 2010. Special requirements for strawberry plants to qualify as nuclear stock. Food and Environment Research Agency). pp. 4.
- Yoshikawa N and Converse RH. 1990. Strawberry Pallidosis Disease-Distinctive Dsrna Species Associated with Latent Infections in Indicators and in Diseased Strawberry Cultivars. *Phytopathology* 80:543-548.

Comportamiento de la Pudrición Texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) en Vivero de Nogales

Behavior of the Cotton Root Rot (*Phymatotrichopsis omnivora*) in a Pecan Plant Nursery

José Alfredo Samaniego Gaxiola, INIFAP, Campo Experimental La Laguna, Blvd. José Santos Valdez 1200 Pte., Col. Centro, Matamoros, Coahuila, CP 27440, México; **Ana Aurora Fontes Puebla**, INIFAP, Campo Experimental Costa de Hermosillo, Blvd. del Bosque No.7 Esq. Paseo de la Pradera, Col. Valle Verde, Hermosillo, Sonora, CP 83200, México; **Socorro Héctor Tarango Rivero**, INIFAP, Campo Experimental Delicias, km 2 Carretera Delicias-Rosales, Delicias, Chihuahua, CP 33000, México; **Aurelio Pedroza Sandoval**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Zonas Áridas, Bermejillo, Durango, CP 56230, México. Correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx

(Recibido: Febrero 07, 2014 Aceptado: Agosto 14, 2014)

Samaniego Gaxiola JA, Fontes Puebla AA, Tarango Rivero SH y Pedroza Sandoval A. 2014. Comportamiento de la pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) en vivero de nogales. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 26-37.

Resumen. Se establecieron 14 parcelas en suelo con presencia de *Phymatotrichopsis omnivora*. Los objetivos fueron determinar en nogales muertos por el hongo en el 2013: i) mortandad *versus* lluvia; ii) modelos epidemiológicos de la enfermedad; iii) incidencia *versus* población por parcela y tamaño de árboles; iv) diámetro de tallo *versus* crecimiento del brote principal, de acuerdo a los días julianos en las que el árbol murió; v) mortandad de árboles establecidos en parcelas o bolsas con suelo previamente desecados *versus* los establecidos en suelo no desecado. Murieron 93 nogales en 98 días cuando llovió 5.8 mm, pero con 58 mm de lluvia murieron 85 árboles en 48 d. Predominó el modelo monomolecular, lo que sugiere que el inóculo en nogales muertos no se incrementó lo suficiente para contagiar nogales sanos en ese mismo año. El número de árboles por parcelas *versus* mortandad tuvo un coeficiente de determinación de 0.905. La enfermedad mató de manera indistinta a los nogales sin importar su tamaño. El tamaño de brote varió fuertemente para un mismo diámetro de tallo, lo que sugiere que el ataque del hongo a las raíces fue previo a la brotación. Sólo nogales establecidos en suelo desecado no murieron.

Palabras clave adicionales: Hongos fitopatógenos, suelo, control.

El cultivo de nogal pecanero *Carya illinoensis* [(Wangenh.) K. Koch] actualmente tiene en México importancia económica y crecimiento en superficie. En el estado de Chihuahua, se han establecido 20 mil ha de nogal desde el año 2003 al 2013 (SAGARPA, 2013). Un factor limitante del cultivo es la pudrición texana asociada

Abstract. Fourteen plots were established in soil with the presence of *Phymatotrichopsis omnivora*. The objectives were to determine in dead pecans by the fungus in 2013: I) tree death rate *versus*; ii) epidemiological models for disease development; iii) disease incidence *versus* population per plot and trees' size; iv) stem diameter *versus* growth of the principal bud, according to the Julian days in which the tree died; v) mortality of the trees established in plots or bags with soil previously dried *versus* the ones established in undried soil. Ninety three pecan trees died in 98 days when it rained 5.8mm, but with 58mm, 85 trees died in 48 d. The monomolecular model predominated, which suggests that the inoculum in dead pecan trees did not increased enough to spread the disease into healthy pecan trees during that year. The number of trees per plot *versus* the mortality had a determination coefficient of 0.905. The disease killed pecan trees regardless their size. Bud's size varied greatly for the same stem's diameter, which suggests that, the attack of the fungus to the roots was previous to bud initiation. Only the pecan trees established in the undried soil did not die.

Additional keywords: Phytopathogenic fungi, soil, control.

Cultivation of pecan *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) in Mexico currently has economic significance and surface growth. In Chihuahua State, from 2003 to 2013, 20 thousand ha of pecan have been established (SAGARPA, 2013). As a limiting factor of this cultivar is the disease known as cotton root rot caused by *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. In Mexico, it is the most important pecan root disease, its incidence may vary from less than 3 to more than 25% of pecan trees, and the severity ranges from mild symptoms (estimate 90% of foliage affected) to tree death (Samaniego -Gaxiola *et al.*, 2001); roots of the trees invaded by the fungus

al hongo *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. En México, es la enfermedad más importante de las raíces del nogal, cuya incidencia puede variar de menos del 3 a más del 25% de nogales y la severidad oscila de síntomas leves (estimación de 90% de follaje afectado) a muerte del árbol (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2001). Las raíces invadidas por el hongo mueren con la consecuente reducción del follaje (Streets y Bloss, 1973). Los nogales menores a 13 años son los susceptibles ((Herrera-Pérez y Samaniego-Gaxiola, 2002), pero no se han estudiado aspectos epidemiológicos en viveros con nogales en desarrollo y hasta los cuatro años.

Algunos productores obtienen sus propios nogales a partir de la nuez que siembran, ello les permite un ahorro significativo durante el establecimiento o reposición de árboles dentro de las huertas. Cuando se establecen viveros de nogales dentro de la huerta, se aprovecha la sombra de los nogales adultos, el agua y el mismo espacio. Sin embargo, si el suelo está infestado con *P. omnivora*, las plántulas y nogales de hasta cuatro años de edad pueden morir a causa del hongo (Herrera-Pérez y Samaniego-Gaxiola, 2002).

Por otra parte, la escasa humedad en el suelo no favorece la expresión de síntomas de pudrición texana en el cultivo del algodón (Rush, 1984; Rush *et al.*, 1984 a); así mismo, los esclerocios de *P. omnivora* empiezan a morir cuando se les deseca (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010). Lo anterior, sugiere que el inóculo de *P. omnivora* podría disminuir si se deseca el suelo y por ende la incidencia de la enfermedad disminuirá.

La expresión de pudrición texana en nogales de vivero dentro de la huerta de nogal, podría estar en función de factores como lluvia, población de árboles por unidad de área establecida, susceptibilidad de los árboles según su tamaño (alto y diámetro de tallo) y efecto del desecado del suelo. El estudio de todos estos factores, con respecto a la epidemiología de la pudrición texana son los objetivos de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del sitio de estudio. El trabajo se realizó en la huerta "Hormiguero" ubicada en Matamoros, Coahuila, México a 25° 41.267', -103° 19.879'. En marzo del 2010, en suelo naturalmente infestado por *P. omnivora*, se establecieron catorce parcelas de 120 m de largo por 1 m de ancho, en cada parcela se sembraron cuatro semillas de nuez por metro lineal de la variedad Riverside. Cada parcela se estableció entre dos líneas de nogales de 30 años de edad. Para el año 2013, sólo 1501 nogales sobrevivieron de las 6720 semillas sembradas en 2010.

Dinámica de la enfermedad versus lluvia. Durante el 2013, se realizaron siete recuentos de nogales muertos por la enfermedad, el primero a los 120 y los siguientes a los 150, 162, 218, 232, 248 y 267 días julianos. Para el número acumulado de nogales muertos versus precipitación acumulada del día 120 al 267 se obtuvo una línea de tendencia polinómica con su ajuste o coeficiente de determinación (R^2). De cada nogal muerto, se extrajo y observó en sus raíces la presencia de cordones de *P. omnivora* para comprobar su muerte asociada al hongo

usualmente die resultando en una reducción de follaje (Streets and Bloss, 1973); pecan trees under 13 years old are particularly susceptible (Herrera-Pérez and Samaniego-Gaxiola, 2002), but there are no epidemiological studies in nurseries with developing up to four year old pecan trees.

Some producers get their own pecan trees from their own seed, this allows them significant savings during the establishment or replacement of trees within the orchards. When pecan nurseries are established within the orchard, the shade by the adult trees, water and the same space are efficiently used. However, if the soil is infested with *P. omnivora*, seedlings and trees up to four years old, may die by the fungus (Herrera-Pérez and Samaniego-Gaxiola, 2002).

Moreover, the low soil moisture does not favor symptom expression of cotton root rot in cotton crop (Rush, 1984, Rush *et al.*, 1984.); additionally, sclerotia of *P. omnivora* start to die when they are dried (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010). This suggests that the *P. omnivora* inoculum could decrease if soil dries, and therefore, the disease incidence would decrease.

Cotton root rot expression in pecan nurseries within the orchard, could be a function of factors such as rainfall, tree population per established unit area, tree susceptibility according to their size (height and stem diameter) and effect of the desiccated soil. The study of all these factors with respect to the epidemiology of cotton root rot are the aims of the present work.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study site. The area where the work was done is known as the "Hormiguero" orchard located in Matamoros, Coahuila, Mexico, at 25° 41.267' and -103° 19.879'. In March 2010, fourteen plots of 120 m long and 1 m wide were established with soil naturally infested with *P. omnivora*; on each of them, four seeds per meter, of Riverside variety were sown.

Each plot was established between two lines of pecan trees 30 years old. During 2013, only 1501 pecan sprouted (survived) out of 6720 seeds that were sown in 2010.

Disease dynamics versus rainfall. During 2013, seven counts of dead pecan trees by the disease were done. The first count was carried out after 120 days, then after 150, 162, 218, 232, 248 and 267 Julian days. For the cumulative number of dead trees versus accumulated rainfall from the 120 to 267th day, a polynomial trend line was obtained with its coefficient of determination (R^2). From every dead tree, roots were observed and *P. omnivora* was isolated from the fungal cords to prove to be the cause of death, as described by Herrera-Pérez and Samaniego-Gaxiola (2002).. Data on rainfall, relative humidity and temperature were taken from the report of the weather station at Francisco I. Madero city, about 8 km from the Hormiguero orchard.

Epidemiological models. In plots where in 2013 more than nine pecan trees died, the epidemiological model with the best fit was determined; the models evaluated were Monomolecular, Logistic, Gompertz and all of them but adjusting the variable time with the natural logarithm (ln); additionally, the exponential model was evaluated as well as

como se describe por Herrera-Pérez y Samaniego-Gaxiola (2002). Los datos de precipitación pluvial, humedad relativa y temperatura se tomaron del reporte de la estación meteorológica de la Ciudad de Francisco I. Madero, aproximadamente a 8 km de la huerta Hormiguero.

Modelos epidemiológicos. En parcelas donde en el 2013 murieron más de nueve nogales, se determinó el modelo epidemiológico con mayor ajuste, los modelos evaluados fueron Monomolecular, Logístico, Gompertz y estos mismos pero ajustando la variable tiempo con logaritmo natural (ln). También se evaluaron los modelos exponencial y éste con ajuste ln y el modelo \log_{10} (Campbell y Madden, 1990).

Incidencia de la enfermedad versus población y tamaño de árboles. En cada parcela se contabilizaron los nogales totales y muertos por pudrición texana hasta el día 267, luego se graficaron ambos y se obtuvo una línea de tendencia polinómica de segundo orden con su R^2 . Asimismo, el tamaño de todos los nogales se midió por altura conformando siete categorías: <15, 15-29, 30-44, 45-59, 60-74, 75-89 y > 89 cm. Entre el número de nogales muertos por la enfermedad versus número de árboles por categorías se obtuvo una gráfica polinómica con su R^2 .

Relación diámetro de tallo versus largo de brote en nogales muertos por fecha. El diámetro de tallo y el largo del brote principal se midió de cada nogal que murió por la enfermedad. Las mediciones se hicieron en las fechas de recuento de árboles muertos, luego se conformó una línea de tendencia entre el diámetro de tallo contra largo de brote de los árboles que murieron en cada fecha de muestreo.

Sanidad de nogales en suelo no desecado versus desecado. En marzo del 2012, se establecieron ocho parcelas de 1.8 x 3 m, en cada una fueron sembradas doce nueces de la variedad Riverside. Cuatro de las parcelas se usaron como testigo (suelo naturalmente infestado con *P. omnivora*). De las otras cuatro parcelas se extrajo el suelo (la parcela de 1.8 x 3 m a profundidad de 0.6 m) en capas de 5 cm y se desecó al ambiente por dos semanas, después el suelo se volvió a reincorporar a sus sitios. En ambos tipos de parcela, se determinó el contenido de humedad justo antes de sembrar las nueces. También durante el mismo año, fue desecado suelo naturalmente infestado con *P. omnivora* y se mezcló 1:1 (v/v) con arena desecada. Cien bolsas de plástico con 15 kg se rellenaron con la mezcla de este suelo arena y se sembraron con nueces de la variedad Riverside.

En frascos de vidrio de 1 L, se colocaron 400 g de suelo desecado, se enterraron e incubaron esclerocios de *P. omnivora* por periodos de 0, 1, 2, 4 y 8 h a 28 °C. Un tratamiento testigo adicional se realizó, enterrando esclerocios en suelo a capacidad de campo por 8 h. Por cada período de incubación se hicieron cuatro repeticiones con 25 esclerocios cada uno y todo el experimento se repitió dos veces. La obtención de los esclerocios, manejo de los mismos y la determinación de su supervivencia en suelo se realizó con la metodología previamente descrita por Samaniego-Gaxiola (2008).

Análisis de datos. La prueba de chi-cuadrada se utilizó para determinar diferencias en mortandad entre nogales muertos establecidos en suelo desecado versus no

its adjustment with ln and with \log_{10} model (Campbell and Madden, 1990).

Disease incidence versus population and tree size.

In each plot, the total and dead pecan trees by cotton root rot were counted until day 267th, then both were plotted and a line of second-order polynomial trend with its R^2 was obtained. Also, the size of all pecan trees was measured by height comprising seven categories: <15, 15-29, 30-44, 45-59, 60-74, 75-89 and > 89 cm. A polynomial graph of the number of dead trees caused by the disease versus the number of pecan trees by categories was done and the R^2 was obtained.

Stem diameter correlation versus shoot length in dead pecan ordered by date. The stem diameter and length of the main shoot were measured in every pecan that died from the disease. Measurements were made at the time of counting the dead trees, then a trend line between the stem diameter against shoot length of the trees that died in each sampling date was done.

Health of pecan in non-desiccated versus desiccated soil. In March 2012, eight plots of 1.8 x 3 m were established, in each of them, twelve nuts of the Riverside variety were seeded. Four plots were used as control (soil naturally infested with *P. omnivora*). From the other four plots the soil was extracted (1.8 x 3 m plot at 0.6 m depth) in 5 cm layers and dried at room temperature during two weeks, then the soil was reincorporated to their extraction sites. In both types of plots, the moisture content was determined just before sowing. Also during the same year, soil naturally infested with *P. omnivora* was desiccated and mixed 1:1 (v/v) with dried sand. One hundred plastic bags with 15 kg each were filled with this mixture of soil and sand, and then nuts of the Riverside variety were sown.

In 1 L glass containers, 400 g of dried soil were placed and *P. omnivora* sclerotia were inserted and incubated for periods of 0, 1, 2, 4 and 8 h at 28°C. An additional control treatment was included by inserting sclerotia in soil at field capacity during 8 h. For each of the incubation periods, another four replicates were done with 25 sclerotia per replication and the entire experiment was repeated twice. Sclerotia isolation, handling and their soil survival determination were carried out using the methodology described by Samaniego-Gaxiola (2008).

Data Analysis. The chi-square test was used to determine differences in mortality among dead pecan trees established in desiccated versus non-desiccated soil. A completely randomized design with factorial arrangement of the treatments (A x B) was used to determine differences between humidity of desiccated versus non-desiccated soil, where A was the depth (0-20, 20-40 and 40-60 cm) and B desiccated and non-desiccated soil; mean separation was determined with the Tukey test with $P= 0.05$. Also, polynomial trend lines of second order and their determination coefficients were implemented in the experiments outlined in previous sections. SAS statistical software (2003) was used for the analysis.

RESULTS

Disease dynamics versus rainfall. Table 1 shows

desechado. Un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (A x B) se utilizó para determinar diferencias entre la humedad de suelo desecado *versus* no desecado, donde A fueron las profundidades (0-20, 20-40 y 40-60 cm) y B suelo desecado y no desecado; la separación de medias se determinó con la prueba Tukey con $P = 0.05$. Asimismo, líneas de tendencia polinómicas de segundo orden y sus coeficientes de determinación se implementaron en los experimentos señalados en secciones previas. En todos los análisis se utilizó el programa estadístico SAS (2003).

RESULTADOS

Dinámica de la enfermedad *versus* lluvia. Los datos de precipitación pluvial, humedad relativa y temperatura durante el tiempo que se realizó el recuento de nogales muertos por la enfermedad se aprecia en el Cuadro 1. En el día juliano 120 se detectó el primer nogal muerto por pudrición texana, luego 37, 29, 26, 39, 5 y 42 árboles muertos que corresponden a las fechas de muestreo de 150, 162, 218, 232, 248 y 267 días, respectivamente. La línea de tendencia entre el número de árboles muertos *versus* la precipitación acumulada tuvo un ajuste o R^2 de 0.917 (Figura 1), donde se aprecian 93 nogales muertos a los 98 días del inicio de la epidemia y 85 más que aparecieron entre los días 99 a 147. Hasta el día 98 se acumularon 5.8 mm de lluvia, mientras que del día 99 al 147 fueron 58 mm.

Modelos epidemiológicos. En cuatro parcelas con más de 110 árboles aparecieron diez o más nogales muertos.

Cuadro 1. Lluvia, temperatura y humedad relativa promedio en periodos de días julianos del 2013.

Table 1. Rainfall, temperature and average relative humidity during periods of Julian days in 2013.

Días Julianos	Lluvia en mm	Temperatura °C	Humedad relativa %	Arboles muertos #
120 a 150	3.8	24.4	34.7	38
151 a 162	0.0	26.7	36.2	29
163 a 218	2.0	26.7	48.3	26
219 a 232	17.4	26.4	38.4	39
233 a 248	2.0	24.9	46.6	5
249 a 267	39.0	23.3	61.1	42

En tres de las cuatro parcelas el modelo que mejor ajustó fue el Monomolecular (Cuadro 2).

Incidencia de la enfermedad *versus* población y tamaño de árboles. La población de árboles por parcela fluctuó de 36 a 247, entretanto, los nogales muertos por parcela fueron de 0 a 79 (Figura 2 A). El R^2 de la línea de tendencia conformada entre árboles por parcela con respecto a los que murieron en ellas fue de 0.905 (Figura 2 B).

Por tamaño de árbol, la categoría de árboles de 75-89

the rainfall, relative humidity and temperature data during the days when the counting of dead trees was done. At the 120th Julian day, the first pecan tree killed by cotton root rot was observed, then 37, 29, 26, 39, 5 and 42 dead trees that corresponded to sampling dates 150, 162, 218, 232, 248 and 267 days, respectively. The trend line between the number of dead trees *versus* accumulated rainfall had a $R^2 = 0.917$ (Figure 1). In this figure, 93 dead pecan trees were observed after 98 days of the outbreak of the epidemic, and 85 more that appeared between the 99-147th day. Until the 98th day, 5.8 mm of rain were accumulated whereas from the 99th day up to the 147th day the accumulation was 58 mm.

Epidemiological models. In four plots with more than 110 trees, ten or more pecan trees were dead. In three out of the four plots, the Monomolecular model was the best fitted (Table 2).

Disease incidence *versus* population and tree size.

The tree population per plot ranged from 36 to 247, meanwhile, dead pecan trees per plot were 0-79 (Figure 2A). The R^2 of the trend line formed between trees per plot and those that died in them was 0.905 (Figure 2B).

As for tree size, the 75-89 cm category was the one with the lowest number of trees (60) and at the same time, it showed the lowest number of dead walnuts (7); in contrast, the 30-44 cm category was the one with the highest number of trees (470) and with the highest number of dead trees (62) (Figure 3A). The trend line obtained between the number of trees per size categories *versus* death caused by cotton root rot gave an adjustment or $R^2 = 0.933$ (Figure 3B).

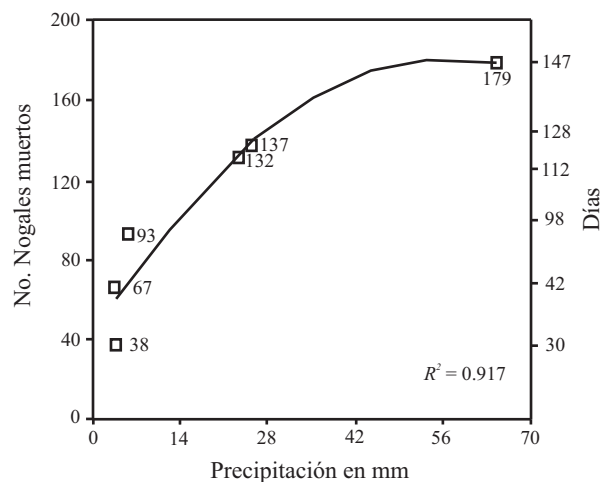


Figura 1. Precipitación pluvial acumulada, acumulado de nogales muertos por pudrición texana y días transcurridos desde el registro del primer nogal muerto (día 120). Los días 30, 42, 98, 112, 128 y 147 corresponden a los días julianos 150, 162, 218, 232, 248 y 267, respectivamente.

Figure 1. Accumulated pluvial precipitation, accumulated dead walnut trees killed by cotton root rot disease and days since the registration of the first dead pecan (day 120). The days: 30, 42, 98, 112, 128 and 147 correspond to the Julian days 150, 162, 218, 232, 248 and 267, respectively.

Cuadro 2. Modelos epidemiológicos para “Putridión texana” en parcelas con diez o más nogales muertos durante el 2013.
 Table 2. Epidemiological models for "Cotton root rot" disease in parcels with more than ten dead walnut trees during 2013.

No. de parcela	No. Nogales por parcela	No. Nogales muertos por parcela	Modelo con mejor ajuste	Ajuste R^2
8	122	10	Monomolecular	0.974
11	137	18	Gompertz In	0.973
12	200	22	Monomolecular	0.930
13	247	79	Monomolecular	0.949

cm fue la de menor número de árboles con 60 y coincidió con el menor número de nogales muertos con siete; en contraste, la categoría de 30-44 fue la de mayor número de árboles con 470 y con el mayor número de árboles muertos con 62 (Figura 3 A). La línea de tendencia obtenida entre el números de árboles por categorías de tamaño *versus* muertos por pudrición texana tuvo un ajuste o R^2 de 0.933 (Figura 3 B).

Relación diámetro de tallo *versus* largo de brote en nogales muertos por fecha. Los nogales con crecimiento de tallos menores a 1 cm, no sobrepasaron crecimiento de brotes mayores a 80 cm. A partir del tercer recuento los nogales muertos por la enfermedad, se empezó a registrar árboles con tamaño de brote de 100 o más cm. (Figura 4).

En la Figura 4, podemos observar que los puntos (nogales muertos) alrededor de las líneas de tendencia recta tuvieron menor dispersión con forme transcurrieron las fecha de muestreo. Por ejemplo, en la primera y sexta fechas de muestreo encontramos nogales con diámetros de tallo similar de 1.0 - 1.1 cm, pero con tamaños de brotes que oscilaron de 20 - 80 y de 32 - 62 cm, respectivamente. Sin embargo, se encontrarán nogales que independientemente de su diámetro de tallo tuvieron una brotación menor

Stem diameter correlation *versus* shoot length in dead pecan ordered by date. The walnuts with stems smaller than 1 cm, did not show shoot length of more than 80 cm. From the third count of dead pecan trees caused by the disease, then trees with 100 cm or more buds size were observed. (Figure 4).

In Figure 4, it is possible to observe that the dots (dead pecan) around the straight tendency lines showed less dispersion as the sampling dates passed. For example, pecan with similar stem diameters (1.0-1.1 cm) were observed during the first and sixth sampling dates, but with buds sizes ranging from 20-80 and 32-62 cm, respectively. However, it also was observed that regardless of pecan stem diameter some sprouts were less than 10 cm.

Health of pecan in non- desiccated *versus* desiccated soil. The minimum humidity obtained in desiccated soil was less than 3.16% and in non- desiccated soil it ranged from 6.84 to 10.94% (Table 3). The sclerotia that remained in dried soil during 0, 1, 2, 4 and 8 h survived an average of 100, 76, 32 and 0%, respectively; while the sclerotia incubated during 8 h in soil at field capacity survived completely. The pecan established in desiccated soil were not killed nor showed any cotton root rot symptoms; in contrast, in non- desiccated soil 3 pecan trees

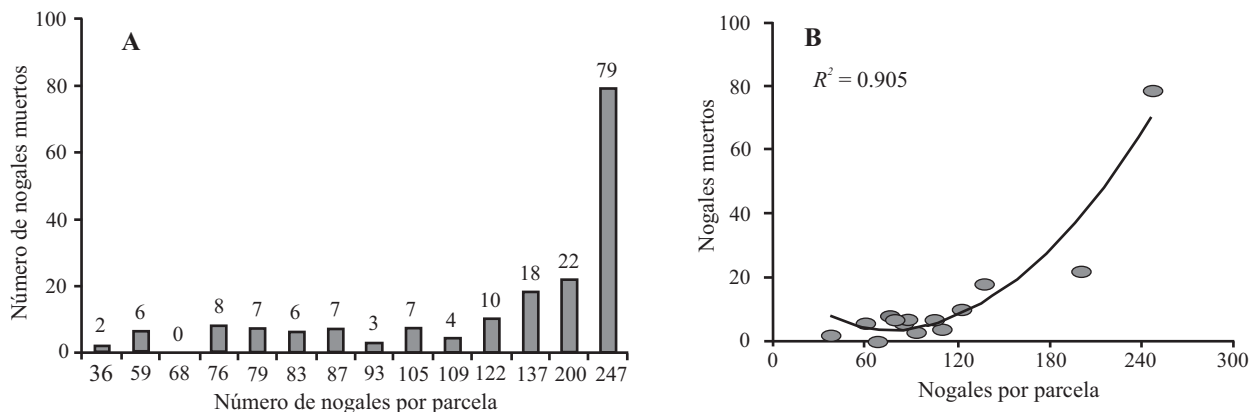


Figura 2 AB. Nogales muertos por pudrición texana del total por parcela durante el 2013. A. Número de nogales por parcela y muertos por la enfermedad, los números sobre las barras indican los nogales muertos. B. Relación entre nogales por parcela contra nogales muertos.

Figure 2 AB. Pecan trees killed by cotton root rot disease from total per parcel during 2013. A. Number of pecan per parcel and killed by the disease, the numbers on the bars are the dead pecan trees. B. Relationship between pecan trees per parcel *versus* dead pecan trees.

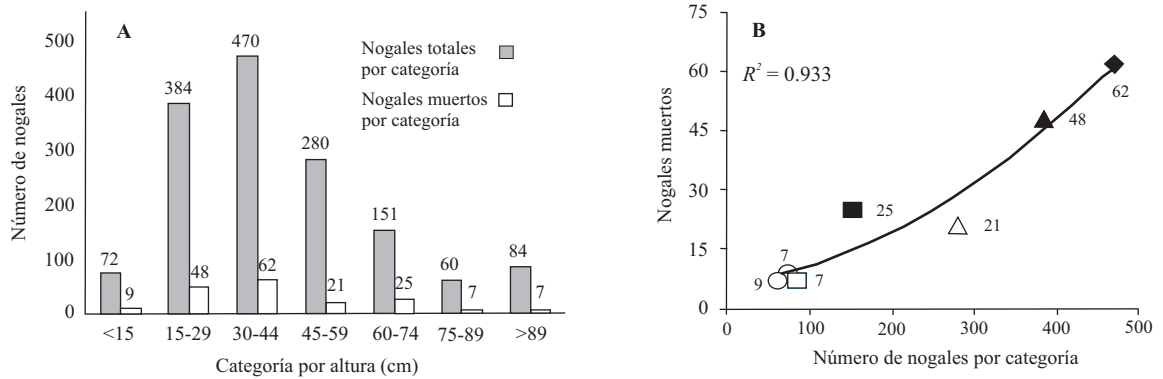


Figura 3 AB. Nogales muertos por pudrición texana con relación a sus categorías por altura. A. Distribución de nogales totales y muertos en cada categoría. B. Relación entre el total de nogales por categoría de altura y muertos en esa categoría. Las categorías de altura son <15 (●), 15-29 (▲), 30-44 (◆), 45-59 (△), 60-74 (■), 75-89 (□) y >89 cm (○). Los números contiguos a cada figura indican los nogales muertos.

Figure 3 AB. Dead pecan trees by cotton root rot disease relative to their height categories. A. Total pecan distribution and dead on each category. B. Relationship between total pecan by height category and dead trees in same category. The height categories are <15 (●), 15-29 (▲), 30-44 (◆), 45-59 (△), 60-74 (■), 75-89 (□) and >89 cm (○). The numbers next to each figure represent the dead pecan trees.

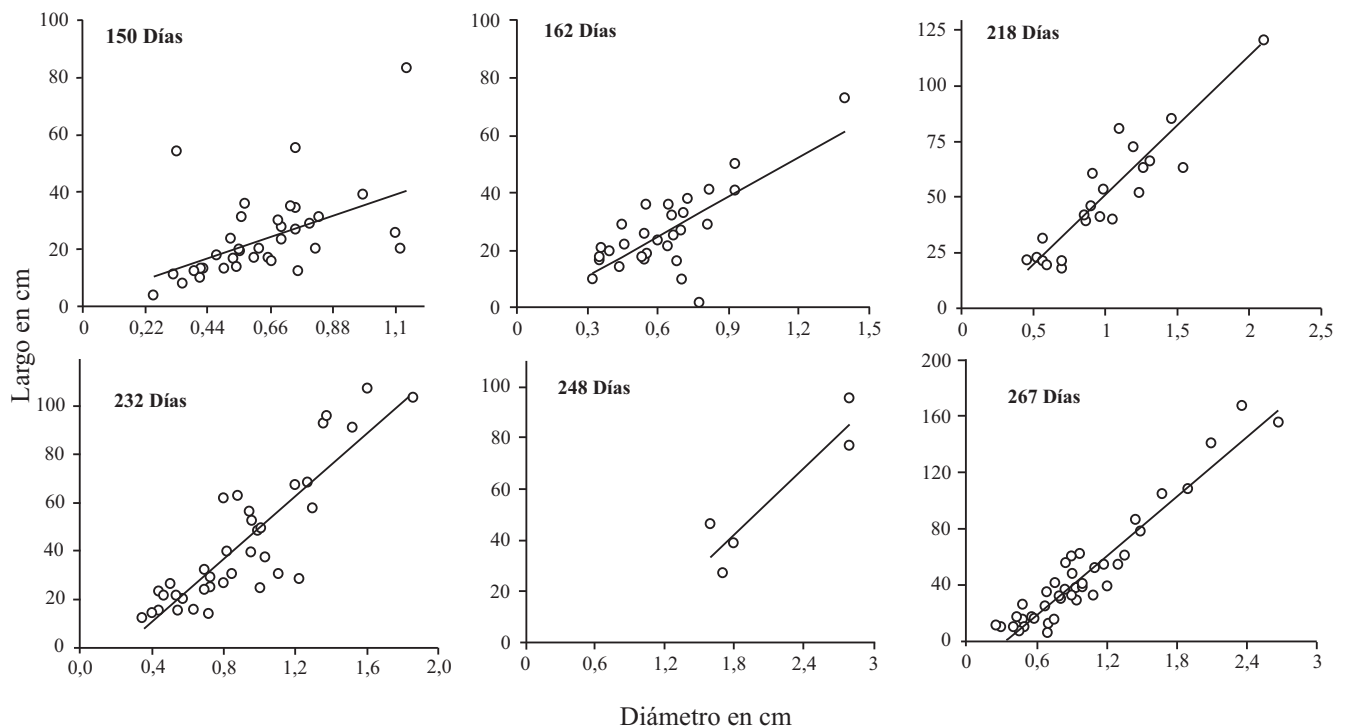


Figura 4. Líneas de tendencia entre diámetros de tallos y largo de brotes en nogales muertos por pudrición texana durante el año 2013. Los registros de los nogales muertos se realizaron en seis fechas (días julianos). En cada fecha se contabilizaron sólo nuevos nogales que aparecieron muertos.

Figure 4. Trend lines between stem diameter and shoot length in dead pecan trees killed by cotton root rot disease during 2013. The counts of dead pecan trees were conducted on six different dates (Julian days). On each date only new dead pecan trees were counted.

a 10 cm.

Sanidad de nogales en suelo no desecado versus desecado. La humedad mínima alcanzada en suelo desecado fue menor al 3.16% y en el suelo no desecado varió de 6.84 a 10.94% (Cuadro 3). Los esclerocios que permanecieron en el suelo desecado 0, 1, 2, 4 y 8 h sobrevivieron en promedio 100, 76, 32 y 0 %, respectivamente, mientras que los esclerocios incubados 8 h en suelo a capacidad de campo sobrevivieron en su totalidad. Nogales establecidos en suelo desecado no murieron, ni manifestaron síntomas de pudrición texana, en contraste, en suelo no desecado murieron tres nogales en las parcelas establecidas en el 2012 y 179 en las 14 parcelas establecidas en el 2010 (Cuadro 4); hubo diferencia significativa en mortandad de árboles entre suelo desecado y no desecado, de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada ($\chi^2 = 21.04$, 2 grados de libertad y $P < 0.001$).

Cuadro 3. Humedad del suelo en almácigo de nogal en la huerta "Hormiguero" en Matamoros, Coahuila, México.
Table 3. Soil moisture in pecan seedling nursery at "Hormiguero" orchard in Matamoros, Coahuila, Mexico.

Profundidad del suelo	*No desecado	*Suelo desecado
	Promedio	Promedio
0-20	6.48 b	2.82 c
20-40	9.63 ab	3.16 c
40-60	10.94 a	2.65 c

*Datos promedio de ocho muestras de suelo por cada profundidad y suelo no desecado o desecado.
Números con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey $P = 0.05$

Cuadro 4. Árboles de nogal muertos por pudrición texana durante el 2013, establecidos en suelos desecados o no desecados*
Table 4. Dead pecan trees (killed by cotton root rot disease during 2013) established in desiccated or non- desiccated soils.

Tratamiento al suelo	Nogales muertos		Nogales vivos	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado
Desecado en parcelas †	0	5	48	43
No desecado en parcelas ‡	3	5	45	43
Desecado en bolsas	0	11	100	89
No desecado en parcelas †	179	161	1322	1340

*La mortandad entre árboles establecidos en suelo desecado versus no desecado fue significativa chi-cuadrada ($\chi^2 = 21.04$, 2 grados de libertad y $P < 0.001$).

‡Parcelas establecidas en el año 2012, cada una con 48 nogales.

†Nogales distribuidos en 14 parcelas, establecidas en el 2010.

DISCUSIÓN

Dinámica de la enfermedad versus lluvia. La humedad en el suelo presenta diferentes papeles en la expresión de la pudrición texana, uno de ellos, se relaciona con la incidencia de la enfermedad. En algodónero, las epidemias de pudrición texana registradas durante 17 años fueron más pronunciadas conforme la lluvia se incrementó (Jeger y Lyda, 1984); nuestros resultados en nogales muertos versus lluvia, tuvieron un comportamiento similar al del algodónero, al incrementar la tasa de muerte de los nogales en la época de lluvia. El efecto de la lluvia también fue consignado por Rush *et al.* (1984 a) quienes registraron 17 y 80% de incidencia de pudrición texana en algodónero en años consecutivos con una precipitación inapreciable y de 138 mm, respectivamente. Aunque, al mantener el suelo a capacidad de campo o más húmedo de manera constante, no favoreció que el micelio, cordón micelial y esclerocios de *P. omnivora* crecieran, sobrevivieran o germinaran (Stapper *et al.*, 1984; Wheeler e Hine, 1972).

Por otra parte, en nogales adultos la incidencia de síntomas del ataque de *P. omnivora* fue menos evidente con seis o más riegos, y más evidente con menos de seis riegos (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2001). Además de la humedad en el suelo, la textura puede estar relacionada con la

died in plots established in 2012 and 179 trees died in the 14 plots established in 2010 (Table 4); there was significant difference in tree mortality between desiccated and non-desiccated soil, according to the chi-square test ($\chi^2 = 21.04$, 2 freedom degrees and $P < 0.001$).

DISCUSSION

Disease dynamics versus rainfall. The soil moisture has different roles in the expression of the cotton root rot disease, one of them is related to its incidence. In cotton, the epidemics documented during 17 years were more evident as the rain increased (Jeger and Lyda, 1984); the results of this study regarding dead pecan versus rainfall, showed a similar behavior to cotton, in pecan tree death rate increases in the rainy season. The rainfall effect was also reported by Rush *et al.* (1984 a) who obtained a 17 and 80% incidence of cotton root rot in cotton in consecutive years with negligible precipitation and 138 mm, respectively. Although, the soil was kept at field capacity or steadily wetter, the mycelium, mycelial cord or *P. omnivora* sclerotia growth, survival or germination were not favored (Stapper *et al.*, 1984; Wheeler and Hine, 1972).

On the other hand, in adult pecan trees, the incidence of *P. omnivora* attack symptoms was less evident

podrición texana, de tal manera que, en algodónero establecido bajo condiciones de temporal, la incidencia de pudrición texana fue menos evidente en suelos que tienen buena capacidad de retención de humedad (Smith y Hallmark, 1987).

Modelos epidemiológicos. El hecho de que el modelo monomolecular predominó en este trabajo, sugiere que durante el mismo año, el inóculo no se incrementó lo suficiente en las plantas muertas para infectar nuevas plantas. En otros trabajos, el modelo logístico predominó en epidemias de pudrición texana, como en el algodónero establecido a 20 cm (Koch *et al.*, 1987). En este trabajo, la distancia inicial entre plántulas de nogal fue de 25 cm, pero al morir los nogales desde el 2010 hasta el 2013 la distancia entre nogales se incrementó; lo que probablemente disminuyó el contagio entre árboles y se reflejó por el predominio de modelo monomolecular. De acuerdo al estudio de Koch *et al.* (1987), el contagio de la pudrición texana entre plantas de algodónero establecidas a 1 m de distancia no se presenta, lo cual coincide con lo observado en nogal.

En este trabajo, se logró detectar síntomas de pudrición texana en los nogales, excepto una repentina marchitez foliar, es decir, el hongo manifiesta un ataque fulminante que se traduce en muerte de los árboles. Consecuentemente, algunos nogales en el vivero, podrían estar infectados por el hongo, pero no se pudieron detectar, lo que podría sub-evaluar la enfermedad.

En cultivos agrícolas anuales o perenes, la pudrición texana a través de los años, se expande de manera radial, cada área devastada por la enfermedad se le denomina manchón (Jeger *et al.*, 1987; Streets y Bloss, 1973). Cuando la distancia de las plantas entre filas no favorece el contagio entre plantas, la incidencia de la enfermedad estará en función del número de puntos (focos o manchones) de infección, multiplicado por la media de plantas enfermas en cada punto (Jeger *et al.*, 1987).

Con la información obtenida en este trabajo, no se puede determinar si los nogales muertos adquirieron la enfermedad a partir de un foco o inóculo en el suelo o se debe al contagio entre árboles. El inóculo del suelo estaría representado por los esclerocios que germinan en cordones, pueden crecer en el suelo por metros e invadir a plantas conforme encuentra sus raíces; mientras que el contagio entre plantas enfermas a sanas, se haría a través del contacto de raíces con cordones del hongo sobre aquéllas que aún no los tienen (Streets y Bloss, 1973).

Incidencia de la enfermedad versus población y tamaño de árboles. No obstante que, en este trabajo, de las 14 parcelas evaluadas tuvieron inicialmente de 36 a 247 árboles, el incremento de árboles por parcela versus árboles muertos indica que el hongo se encuentra ampliamente distribuido en el área de estudio, y que conforme hubo más árboles por parcela, también hubo más nogales muertos por la enfermedad. Este resultado concuerda por lo descrito por Koch *et al.* (1987) que señalan que a mayor número de plantas mayor incidencia de pudrición texana en el cultivo de algodónero.

Dentro de las 14 parcelas, ningún nogal adulto murió

six or more irrigations, and more evident with less than six (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2001). Besides the moisture, the soil texture might be related to the cotton root rot disease, so that, in cotton established under rainfed conditions, disease incidence was less evident in soils with good moisture retention capacity (Smith and Hallmark, 1987).

Epidemiological models. The fact that the monomolecular model predominated in this study, it suggests that during the same year, the inoculum did not increased enough in dead plants to infect new ones. In other studies, the logistic model predominated in cotton root rot epidemics, such as in the cotton established at 20 cm (Koch *et al.*, 1987). In this work, the initial distance between pecan seedlings was 25 cm, but when pecan trees died from 2010 through 2013, the distance between trees increased; which probably decreased the spread between trees and it was reflected by the dominance of the monomolecular model. According to Koch *et al.* (1987), the spread of cotton root rot among cotton plants established at 1 m distance is not present, which is consistent with that observed in pecan.

In this work, it was not possible to detect cotton root rot in pecan trees, except a sudden leaf wilting, ie, the fungus exhibits a massive stroke resulting in tree death. Consequently, some pecan trees in the nursery might be infected by the fungus, but we had no way of detecting them, which could sub^f evaluate the disease.

In annual or perennial crops, disease expands radially through the years, and each devastated area by the disease is called a patch (Jeger *et al.*, 1987; Streets and Bloss, 1973). When the plant distance between rows does not favor the spread between plants, disease incidence will depend on the number of points (patches) of infection multiplied by the average of diseased plants at each point (Jeger *et al.*, 1987).

With the information obtained in this work, it is not possible to affirm if dead pecan trees acquired the disease from a patch or inoculum in soil or due to the contamination among trees. The inoculum in soil would be represented by the sclerotia that germinate in cords, and that can grow in the soil several meters and invade the plants as it finds their roots; while the spread between diseased to healthy plants, would be through contact between roots with fungal cords (Streets and Bloss, 1973).

Disease incidence versus population and tree size. Despite that in this study the 14 plot evaluated were initially with only 36-247 trees, the increase of trees per plot versus dead trees indicated that the fungus was widely distributed in the area of study, and as the number of trees per plot increased, there were also more pecan trees killed by the disease. These results are in agreement with those described by Koch *et al.* (1987), who indicated that the higher the number of plants, the higher the cotton root rot incidence in cotton cultivation.

Among the 14 plots, no adult pecan died or showed cotton root rot symptoms, which shows the difference in susceptibility between developing pecan trees (179 dead) and adults. As for tree size, no differences in susceptibility (death) were detected, so, the incidence of tree death was based on the number of tree that formed the

o manifestó síntomas de pudrición texana, lo que pone de manifiesto la diferencia de susceptibilidad entre nogales en desarrollo (179 muertos) y adultos. Por tamaño del árbol, no detectamos diferencia en susceptibilidad (muerte) de tal forma que, la incidencia de muerte de los árboles estuvo en función del número de árboles que conformaron la categoría por tamaño, es decir, la incidencia de nogales muertos aumentó conforme lo hizo el número de árboles por categoría de tamaño. Estos resultados nos indican que no hay tolerancia de los nogales en función del tamaño y que el inóculo en el suelo es lo suficiente para matar nogales hasta de 3 m que fueron incluidos en la categoría árboles > 89 cm.

Relación entre el diámetro de tallo versus largo de brote en nogales muertos por fecha. Los nogales que murieron por pudrición texana durante el segundo y tercer recuentos (días 150 y 162), seguramente fueron invadidos días antes por el hongo, lo que probablemente no permitió más su crecimiento de brote.

Los nogales con crecimiento de tallos menores a 1 cm, no sobrepasaron crecimiento de brotes mayores a 80 cm. A partir del tercer recuento de los nogales muertos por la enfermedad, se empezó a registrar árboles con tamaño de brote de 100 cm o más. Los nogales con mayores diámetros y tamaño de brotes fueron los que empezaron a morir a partir de la tercera fecha de muestreo (218 d). Estos resultados sugieren que los nogales con más vigor (diámetro de tallo y largo de brote) son los que mueren en fechas más tardías.

En todas las fechas de recuento de nogales muertos por la enfermedad, hubo árboles con diámetro de tallo similar pero, con un rango amplio de tamaño de brote que osciló de 50 a más del 300%, por ejemplo, en el día 267 se encontraron nogales con 5 y 34 cm de crecimiento de brote ambos con 0.7 cm de diámetro de tallo (Figura 4). Nogales con tamaño de brote muy pequeño con respecto al diámetro de tallo, sugiere que han sido atacados por *P. omnivora* en años previos al 2013, o bien, que su tamaño de brote ha estado fuertemente restringido por algún otro factor del suelo. Por lo tanto, la relación tamaño de brote versus diámetro de tallo, podría ser un indicador de factores limitantes o favorables para los nogales en desarrollo, aunque habría que determinar en campo dichos factores y su contribución.

Un factor que reduce el crecimiento de los nogales (tallos y brotes) es la salinidad del suelo (Miyamoto *et al.*, 1986).

Sanidad de nogales en suelo no desecado versus desecado. La desecación de los esclerocios de *P. omnivora* induce su muerte (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010), en contraste a lo que ocurre con otros hongos fitopatógenos que producen esclerocios como *Macrophomina phaseolina* Tassi (Pratt, 2006); *Rhizoctonia solani* Kühn (Sneh *et al.*, 1999); *Sclerotium cepivorum* Vera (Harper *et al.*, 2002); *Sclerotium rolfsii* Sac (Maiti y Sen, 1988) y *Verticillium dahliae* Kleb (Hawke y Lazarovits, 1994).

En este trabajo, los esclerocios murieron en su totalidad al colocarlos en suelo desecado durante ocho horas. Ambos, esclerocios desecados y expuestos a suelo desecado indican que la desecación podría disminuir el inóculo de *P. omnivora* en el suelo. Rush *et al.*

size category, that is, the incidence of trees death increased as the number of trees by size category. These results show that there is no tolerance of walnut trees depending on their size and that the inoculum in soil is enough to kill up to 3 m pecan tree that were included in the trees category > 89 cm.

Relationship between stem diameter versus shoot length in dead pecan trees in different dates. Pecan trees killed by cotton root rot during the second and third counts (150 and 162nd days), probably were invaded by the fungus days before, which probably prevented shoot growth.

Pecan trees with stems smaller than 1 cm, did not exceeded 80 cm of shoot length. From the third count of dead pecan trees killed by the disease, there were trees with bud size of 100 cm or more. Trees with larger diameters and shoot size were those that started to die from the third sampling date (218 days). These results suggest that the more vigorous trees (stem diameter and shoot length) die at later dates.

In all dates recording pecan trees killed by the disease, there were some with similar stem diameter, but with a wide range of shoot length that varied between 50 to over 300%, for example, on the 267th day there were trees with 5 to 34 cm shoot length and both with 0.7 cm stem diameter (Figure 4). Pecan trees with very small bud size relative to their stem diameter, suggest that they have been attacked by *P. omnivora* in years prior to 2013, or that the shoot size has been heavily restricted by another soil factor. Therefore, the shoot length versus stem diameter ratio could be an indicator of limiting or favorable factors for developing walnuts, although it would be necessary to determine in the field which are those and the importance of their contribution. One factor that reduces reduces growth of pecan trees (stems and buds) is soil salinity (Miyamoto *et al.*, 1986).

Health of pecan in non- desiccated versus desiccated soil. The drying of *P. omnivora* sclerotia induce their death (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010) in contrast to other pathogenic fungi that produce sclerotia such as *Macrophomina phaseolina* Tassi (Pratt, 2006); *Rhizoctonia solani* Kühn (Sneh *et al.*, 1999); *Sclerotium cepivorum* Vera (Harper *et al.*, 2002); *Sclerotium rolfsii* Sac (Maiti and Sen, 1988) and *Verticillium dahliae* Kleb (Hawke and Lazarovits, 1994).

In this work, it was found that all sclerotia died when placed in desiccated soil for eight hours. Both, dried sclerotia and exposed to desiccated soil indicate that drying could reduce *P. omnivora* inoculum in soil. Rush *et al.* (1984 a) found that deep chiseling of soil decreased the incidence of cotton plants with cotton root rot symptoms and increased the fiber production, which they attributed to decreased fungal inoculum by the desiccation effect.

The expression of cotton root rot symptoms in agricultural crops also depends on root maturity, such as in cotton (Rush *et al.*, 1984 b); on the distance between the fungus with respect to the root and soil temperature (Rush, 1984); and on the inoculum density and its distribution in the soil (Lyda and Burnett, 1970). However, under field conditions, in adult pecan trees, a severe symptom of cotton root rot such as wilt of the entire tree is sometimes reversed,

(1984 a) encontraron que el cincelado profundo del suelo disminuyó la incidencia de plantas de algodón con síntomas de pudrición texana e incrementó la producción de fibra, lo que atribuyeron a una disminución del inóculo del hongo por efecto de su desecación.

La expresión de síntomas de pudrición texana en los cultivos agrícolas también depende de la madurez de la raíz, como es el caso del algodón (Rush *et al.*, 1984 b); de la distancia del hongo con respecto a la raíz y la temperatura del suelo (Rush, 1984); la densidad de inóculo y su distribución en el suelo (Lyda y Burnett, 1970). Sin embargo, bajo condiciones de campo, un síntoma severo como la marchitez completa del árbol, algunas veces revierte en nogales adultos, de tal manera que paulatinamente recobran su follaje y parecen recobrar su sanidad (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2003). Tanto en pistacho como algodón, la incidencia de la enfermedad fue menor con las dosis más altas de esclerocios inoculados en las raíces que cuando se utilizaron dosis intermedias (Lyda y Burnett, 1970; Tarango-Rivero y Herrera Pérez, 1977); e incluso, en árboles de manzano inoculados con esclerocios mostraron síntomas de la enfermedad, pero los cordones no tuvieron movimiento hacia árboles adyacentes y ningún árbol infectado murió después de 22 meses (Todd-Watson *et al.*, 2007). Todo ello, pone de manifiesto la complejidad de factores que determinan la expresión de síntomas de pudrición texana en los cultivos agrícolas.

Observaciones adicionales que se realizaron en este trabajo, sugieren la interacción de factores biológicos con la expresión de síntomas de pudrición texana en el nogal. Así, se observó la presencia de masas de esporas de *P. omnivora* justo debajo de los nogales adultos en la huerta, sin que estos árboles murieran o mostraran síntomas de la enfermedad, al mismo tiempo, también se detectó que las masas de esporas fueron invadidas por especies de *Trichoderma*, hongo que podría ser parte de un control biológico natural de la pudrición texana. Después del mes de septiembre, se observó que un nogal rebrotó, el cual se había contabilizado como uno de los 179 muertos; lo que sugiere que hay una expresión de una microbiota que restringe que *P. omnivora* mate todas las raíces de los nogales.

Durante el 2013, se encontró variación en la temperatura de folíolos sanos y de aquéllos en proceso o marchitez declarada (datos no mostrados), lo que pudieran indicar nogales asintomáticos con pudrición texana; de acuerdo a Watson *et al.* (2000), en manzanos invadidos en sus raíces por *P. omnivora* pero que son asintomáticos, la temperatura de su follaje muestra una diferencia superior de 1 a 2 °C con respecto a manzanos no invadidos por el hongo.

En suma, la complejidad suelo-hongo-nogal en el campo, se traduce en la expresión de síntomas y muerte de los árboles de múltiples maneras: nogales que podrían estar enfermos pero que no se logran detectar, nogales que pudiesen rebrotar, aquéllos que no son invadidos aún creciendo encima de masas de esporas, niveles de inóculo que no se conocen, entre otros. Prácticas para disminuir la pudrición texana en nogales en desarrollo, podrían ser: cincelado profundo del suelo en la época de secas, restringir los riegos en los períodos de lluvia e incrementar la distancia

so that the pecan gradually regain their leaves and seem to regain their health over the years (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2003). Both in pistachio and cotton crops, disease incidence was lower with higher doses of sclerotia inoculated in the roots than when intermediate doses were used (Lyda and Burnett, 1970; Tarango-Rivero and Pérez Herrera, 1977); and even apple trees inoculated with sclerotia showed symptoms of the disease, but the fungal cords did not move to adjacent trees and none of the infected tree died after 22 months (Todd-Watson *et al.*, 2007). All this highlights the complexity of factors that determine the expression of cotton root rot symptoms in agricultural crops.

Additional observations from this study suggest the interaction of biological factors with the cotton root rot symptoms expression on pecan trees. Thus, the presence of masses of *P. omnivora* spores just below adult pecan trees in the orchard were observed, and trees didn't die or showed any disease symptoms. Also, it was observed that the masses of spores were invaded by *Trichoderma* species, a fungus that could be part of a natural biological control of the cotton root rot disease. After September, it was observed that one pecan tree which was counted as one of the 179 dead trees, showed new growth; this fact suggests that there is an expression of microbiota that restricts *P. omnivora* to kill all the roots of pecan trees.

During 2013, it was observed temperature variation in healthy leaflets and those in the process or with declared wilt (data not shown), which could indicate asymptomatic trees with cotton root rot disease; according to Watson *et al.* (2000), in apple trees with root invasion by *P. omnivora* but asymptomatic, foliage temperature showed a difference of 1-2 °C, above the temperature shown by non-invaded trees.

In short, the complexity of soil-fungus-pecan tree in the field, results in symptom expression and tree death in multiple ways: pecan trees that might be sick but they are not detected, pecan trees that could sprout again, those that are not invaded even growing up over masses of spores, inoculum levels that are unknown, among others. Practices to reduce the cotton root rot disease in developing pecan trees could be: deep soil chiseled during the dry season, restrict watering during rainy periods, and increase the distance between plants.

CONCLUSIONS

Increasing rainfall favored pecan tree mortality by cotton root rot disease. The monomolecular model of the cotton root rot epidemics, suggests that the inoculum does not increase in dead plants in sufficient quantity to attack new trees. Pecan mortality increased as the number of pecan trees per plot increased, as well as in the case of the tree size, when more pecan trees died among the categories with the highest number of trees.

The stem diameter *versus* shoot growth showed a wide variation in the trend line for each count date of dead trees; such variation could be explained by asymptomatic pecan trees invaded by *P. omnivora*, as well as other soil factors that were not detected.

Sclerotia died after 8 h of incubation in dried soil, and no dead pecan trees or with cotton root rot symptoms were

entre plantas.

CONCLUSIONES

El incremento de la lluvia favoreció la mortandad de nogales por pudrición texana. El modelo monomolecular de las epidemias de pudrición texana, sugiere que el inóculo no se incrementa en plantas muertas en cantidad suficiente para ataca nuevos árboles. La mortandad de nogales se incrementó conforme se aumentó el número de nogales por parcela. Por categoría de tamaño de árbol, murieron más nogales en las categorías con mayor número de árboles.

El diámetro de tallo *versus* crecimiento de brote mostraron una amplia variación dentro de la línea de tendencia para cada fecha de recuento de árboles muertos, dicha variación podría explicarse por nogales invadidos por *P. omnivora* asintomáticos, así como otros factores de suelo que no se detectaron.

Los esclerocios mueren a las 8 h de incubarse en suelo desecado. No se detectaron nogales muertos o con síntomas de pudrición texana en parcelas o bolsas donde el suelo se desecó previamente. La mortandad entre árboles establecidos en suelo desecado *versus* no desecado fue significativa. ($\chi^2 = 21.04$, 2 grados de libertad y $P < 0.001$).

Agradecimientos. Los autores, agradecen al Fondo SAGARPA-CONACYT por el financiamiento de la investigación y publicación de este trabajo, el que se realizó a través del proyecto clave 2011-13-175247. Nuestro agradecimientos a la Ing. Laura Gómez Saavedra por el apoyo en los trabajos de campo en la huerta Hormiguero, así como al Ing. Arturo Esparza, administrador de la huerta.

LITERATURA CITADA

- Campbell, C. L., and Madden, L. D. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Son. 532 p.
- Harper, G. E., Frampton, C. M., and Stewart, A. 2002. Factors influencing survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30: 29-35.
- Hawke, M. A., and Lazarovits, G. 1994. Production and manipulation of individual microesclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. Phytopathology 84: 883-890.
- Herrera-Pérez, T. y Samaniego-Gaxiola, J. A. 2002. Enfermedades del nogal. pp. 177-206. En: Arreola-Ávila, A. y Reyes-Juárez, I. (eds.). Tecnología de Producción del Nogal Pecanero. Campo Experimental La Laguna. INIFAP. Matamoros, Coahuila, México.
- Jeger, M. J., Kenerley, C. M., Gerik, T. J., and Koch, D. O. 1987. Spatial dynamics of *Phymatotrichum* root in row crops in the Black region of north central Texas. Phytopathology 77: 1647-1656.
- Jeger, M. J., and Lyda, S. D. 1984. Comparisons of annual *Phymatotrichum* root rot epidemics in cotton for the years 1965-1982. Phytopathology 74:839. (Abstract).
- Koch, D. O., Jeger, M. J., Gerik, T. J., and Kenerley, C. M. 1987. Effects of plant density on progress of *Phymatotrichum* root rot in cotton. Phytopathology 77: 1657-1662.
- Lyda, S. D., and Burnett, E. 1970. Sclerotial inoculum density of *Phymatotrichum omnivorum* and development of *Phymatotrichum* root rot. Phytopathology 60:729-731.
- Maiti, S., and Sen, C. 1988. Effect of moisture and temperature on the survival of sclerotia of *Sclerotium rolfii* in soil 121: 175-180.
- Miyamoto, S., Riley, T., Gobran, G., and Petticrew, J. 1986. Effects of saline water irrigation on soil salinity, pecan tree growth and nut production. Irrigation Science 7: 83-95.
- Pratt, G. R. 2006. A direct observation technique for evaluating sclerotium germination by *Macrophomina phaseolina* and effects of biocontrol materials on survival of sclerotia in soil. Mycopathologia 162: 121-131.
- Rush, C. M. 1984. Evaluation of deep-chiseled anhydrous ammonia as a control for *Phymatotrichum* root rot of cotton. Plant Disease 74: 291-293.
- Rush, C. M., Gerik, T. J., and Lyda, S. D. 1984 a. Factors affecting symptom appearance and development of *Phymatotrichum* root rot of cotton. Phytopathology 74:1466-1469.
- Rush, C. M., Lyda, S. D., and Gerik, T. J. 1984 b. The relationship between time of cortical senescence and foliar symptom development of *Phymatotrichum* root rot of cotton. Phytopathology 74: 1464-1466.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura. Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, 1980-2012. México, DF. www.siamsagarpa.gob.mx.
- Samaniego-Gaxiola, J. A. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. Revista Mexicana de Fitopatología 26: 32-39.
- Samaniego-Gaxiola, J. A., Herrera-Pérez, T., Pedroza-Sandoval, A., Jiménez-Díaz, F. y Chew-Madinaveitia, Y. 2003. Fluctuación de la severidad de pudrición texana *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert en nogal pecanero (*Carya illinoensis* K.) bajo las condiciones de la Comarca Lagunera, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 143-151.
- Samaniego-Gaxiola, J. A., Herrera-Pérez, T. Pedroza-Sandoval, A. y Santamaría-Cesar, J. 2001. Relación entre las condiciones de suelo y manejo de las huertas de nogal pecanero con la dinámica de la pudrición texana. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 10-18.

- Samaniego-Gaxiola, J. A., Ordóñez-Meléndez, H. J., Pedroza-Sandoval, A. y Cueto-Wong, C. 2010. Relationship between the drying of the sclerotia of *Phymatotrichopsis omnivora* and its survival. *Revista Mexicana de Micología* 32: 49-58.
- SAS Institute. 2003. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Smith, R. B., and Hallmark, C. T. 1987. Selected chemical and physical properties of soil manifesting cotton root rot. *Agronomy Journal* 79:155-159.
- Sneh, B., Burpee, L y Ogoshi, A. 1999. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society Press, Minnesota USA. 135 pp.
- Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1999. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society Press, Minnesota USA. 135 pp.
- Stapper, M. F., Lyda, S. D., and Jordan, W. R. 1984. Temperature x water potential interactions on growth and sclerotial germination of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology* 74: 509-513.
- Streets, R. B., and Bloss, H. E. 1973. *Phymatotrichum* Root Rot. *Phytopathological Monograph* 8, American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. 38 p.
- Tarango-Rivero, S. H. y Herrera-Pérez, T. 1997. Efecto de la cantidad de inóculo y tiempo de incubación de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dugg. en el daño radical de pistachero *Pistacia atlantica* (Def.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 15:48-51.
- Todd-Watson, W., Nye-Appel, D., Aloysius-Arnold, M., Miller-Kenerley, C., Lester-Starr, J., y Martínez-Trinidad, T. 2007. Inoculación, síntomas, y colonización en árboles de manzano en contenedor por *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. *Agrociencia* 41: 459-468.
- Watson, T. W., Kenerley, C. M., and Appel, D. N. 2000. Visual and infrared assessment of root colonization of apple trees by *Phymatotrichopsis omnivora*. *Plant Disease* 84: 539-543.
- Wheeler, J. E., and Hine, R. B. 1972. Influence of soil temperature and moisture on survival and growth of strands of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology* 62: 828-832.

DetECCIÓN DE VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN CHIHUAHUA, MÉXICO

DETECTION OF VIRUS AFFECTING CHILLI PEPPER CROP (*Capsicum annuum* L.) IN CHIHUAHUA, MEXICO

Ana Cecilia González Franco, Emma Monserrath Gill Langarica, Loreto Robles Hernández, Abelardo Núñez Barrios, Ramona Pérez Leal, Ofelia Adriana Hernández Rodríguez, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Ciudad Universitaria s/n Campus 1, Chihuahua, Chihuahua, CP 31310, México; Luis Pérez Moreno, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Apartado Postal 311, Irapuato, Gto., CP 36500, México. Correspondencia: lrobles@uach.mx

(Recibido: Julio 29, 2014 Aceptado: Septiembre 26, 2014)

González Franco AC, Gil Langarica EM, Robles Hernández L, Núñez Barrios A, Pérez Leal R, Hernández Rodríguez O A y Pérez Moreno L. 2014. Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 38-51.

Resumen. El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de 12 virus presentes en las dos regiones productoras de chile en el estado de Chihuahua. Se colectaron 203 muestras foliares sintomáticas en 10 localidades de las regiones centro-sur y norte del Estado y se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA, utilizando anticuerpos policlonales específicos. La incidencia y severidad de infecciones de tipo viral fueron superiores en la zona norte. CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY y PepMV se detectaron en la región centro-sur, mientras que en la región norte se identificaron TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV y ToRSV. Cinco de los virus detectados fueron comunes en las dos regiones. CMV y TMV fueron predominantes en la región centro-sur, y TRSV y TBSV lo fueron en la región norte. El 44% de las muestras positivas para la región centro-sur fueron infecciones mixtas, mientras que para la norte fueron el 78%. Este es el primer estudio que reporta la presencia de 12 especies de virus e infecciones múltiples en el cultivo de chile del estado de Chihuahua y el primero en reportar al TBSV en el cultivo de chile en México.

Palabras clave adicionales: DAS-ELISA, CMV, TMV, AMV, TRSV, TBSV, INSV.

México ocupa el primer lugar en producción de chile verde (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial con una superficie sembrada de 138,188.21 ha y una producción de 2,379,735.80 t (SAGARPA, 2012). Este cultivo es uno de los más importantes en México por su rentabilidad y alta

Abstract. The objective of the present work was to determine the incidence of 12 viruses present in the two pepper-producing regions of the State of Chihuahua. A total of 203 symptomatic leaf samples were collected in 10 sites of the South-Central and North regions and tested by DAS-ELISA, using virus-specific polyclonal antibodies. The incidence and severity of the viral infections were higher in the North region. CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY and PepMV were detected in the South-Central region, while in the North region TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV and ToRSV were detected. Five of the detected viruses were common in both regions. CMV and TMV were predominant in the South-Central region, while TRSV and TBSV were the most frequent in the North region. Over 44% and 78% of the positive samples in the South-Central and the North regions respectively consisted of mixed infections. This is the first study that reports 12 viruses and multiple infections in pepper of Chihuahua State and the first in reporting TBSV in pepper in Mexico.

Additional keywords: DAS-ELISA, CMV, TMV, AMV, TRSV, TBSV, INSV.

México ranks first in green pepper (*Capsicum annuum* L.) worldwide production with a planted area of 138,188.21 hectares and a production of 2,379,735.80 t (SAGARPA, 2012). This crop is one of the most important in Mexico because of its cost effectiveness and high demand for labor (Perez and Rico, 2004). Nationally, Chihuahua state ranks first in production with 562,166.53 t and third in value of production with a contribution of almost two billion pesos. In Chihuahua state, chili pepper is mainly produced in the south-central and northern regions. In 2012 in the northern region of the state, 13,098.36 ha were seeded and producing 195,988.7 t worth of production above 817 million pesos, equivalent to 41.7% of the total state contribution. The main

demanda de mano de obra (Pérez y Rico, 2004). A nivel nacional, Chihuahua ocupa el primer lugar en producción con 562,166.53 t y el tercer lugar en valor de la producción con una aportación de casi dos billones de pesos. En Chihuahua la producción de chile se centra en las regiones centro-sur y norte. En la zona norte se sembraron 13,098.36 ha en el 2012, con una producción de 195,988.7 t y un valor de producción por arriba de 817 millones de pesos, equivalente a un 41.7% del total de la aportación estatal. Los principales municipios que conforman esta zona son Ascensión, Buenaventura, Galeana, Janos, Constitución y Nuevo Casas Grandes. En la región centro-sur se sembraron 9,588.52 ha, con una producción de 371,521.41 t y un valor de producción superior a un billón de pesos, equivalente a un 57.5% del total de la aportación en el Estado, en el 2012. Esta zona está constituida principalmente por los municipios de Allende, Camargo, Delicias, Jiménez, Julimes, Meoqui y Rosales (SAGARPA, 2012). En el cultivo de chile, las enfermedades representan uno de los factores de riesgo para su rentabilidad por lo que resulta necesario protegerlo del ataque de los diferentes patógenos. En los últimos años las enfermedades causadas por virus han ocasionado pérdidas económicas importantes debido a la reducción en la producción de diferentes cultivos hortícolas en México (Astier *et al.*, 2007). Estas pérdidas varían cada año, y han estado en función del manejo del cultivo y las condiciones climáticas, alcanzando en algunos casos pérdidas hasta de un 100% (Vidales y Alcantar, 1989). Las plantas infectadas por virus tienen un ciclo vegetativo más corto y los síntomas más comunes son ampollamiento, enanismo, mosaicos, moteados, necrosis, clorosis y deformaciones (Murphy y Warren, 2003; Agrios, 2005; Astier *et al.*, 2007). Estas enfermedades se han incrementado en casi todas las regiones de México, convirtiéndose en uno de los problemas de mayor importancia en los cultivos hortícolas (Pérez y Rico, 2004). Para realizar un control eficiente de una enfermedad es importante identificar el agente causal, ya que una buena identificación de éste garantiza el éxito en las medidas de su control (González y Delgadillo, 1989). En el caso específico de las enfermedades de tipo viral, no es suficiente el reconocimiento de los síntomas, ya que los síntomas causados por los diferentes virus a veces son similares (Pérez-Moreno *et al.*, 2004), o se confunden con daños por herbicidas o por desbalances nutricionales. Además, las plantas pueden estar infectadas simultáneamente por más de un virus, por lo que es importante utilizar técnicas de diagnóstico especializadas que permitan la identificación plena de los agentes virales (Harris, 1994). Entre estas técnicas, la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) ha sido una de las más utilizadas en detección de virus en plantas (Cruz y Frías, 1997). A nivel nacional se han reportado hasta 13 especies de virus con genomas de ARN asociados con enfermedades en el cultivo de chile (Núñez *et al.*, 1996; Pérez y Rico, 2004; Robles *et al.*, 2010); sin embargo, ninguna de estas especies se ha descrito en el estado de Chihuahua. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de las especies virales presentes

municipalities of this area are Ascension, Buenaventura, Galeana, Janos, Constitution and Nuevo Casas Grandes. In 2012 in the south-central region, 9,588.52 ha were planted and produced 371,521.41 t worth over one billion pesos, equivalent to 57.5% of the total state contribution. This area is mainly constituted by Allende, Camargo, Delicias, Jimenez Julimes, Meoqui and Rosales municipalities (SAGARPA, 2012). Among the chili pepper crops, several diseases represent the main risk factors for profitability, therefore, it is necessary to protect them from various pathogens attack. In recent years, diseases caused by viruses have considerably increased the economic losses due to reduced production of different vegetable crops in Mexico (Astier *et al.*, 2007). These losses vary every year and they have been based on crop management and climatic conditions, reaching in some cases up to 100% losses (Vidales and Alcantar, 1989). The virus infected plants have a shorter growing season and the most common symptoms are blistering, stunting, mosaics, mottling, necrosis, chlorosis and deformation (Murphy and Warren, 2003; Agrios, 2005; Astier *et al.*, 2007). These diseases have increased in almost all regions of Mexico, becoming one of the most important problems in horticultural crops (Perez and Rico, 2004). For an efficient disease control, it is important to identify the causal agent, since a good identification guarantees success in their control measures (Gonzalez and Delgadillo, 1989). In the specific case of virus-like diseases, it is not enough the symptom's identification because the symptoms caused by different viruses are sometimes similar (Perez-Moreno *et al.*, 2004), or they can be misdiagnosed as herbicide's damage or nutritional imbalances. In addition, plants may be infected simultaneously by more than one virus, so it is important to use specialized diagnostic techniques that allow full identification of the viral agents (Harris, 1994). Among these techniques, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test has been one of the most widely used tool in detection of viruses in plants (Cruz and Frías, 1997). Nationally, there have been reports of as many as 13 species of virus with RNA genomes related to diseases in the chili pepper crops (Núñez *et al.*, 1996; Pérez and Rico, 2004; Robles *et al.*, 2010); however, none of these species has been described in Chihuahua State. Therefore, the aim of this study was to determine the incidence of viral species present in chili pepper crops of the two main producing regions in Chihuahua. In both chili producing regions, the incidence and severity of the viral diseases in field, the detection of viral species, the ratio of virus detected by location and the analysis of multiple infections were determined.

MATERIALS AND METHODS

Determination of the incidence and severity. Field trips were made during the crop development and fruiting season in order to determine the incidence and severity on chili plants with characteristic symptoms of a probable viral disease. These field trips were made to four sites of the south-central region and to six sites in the northern Chihuahua state (Figure 1). At each site, three plots were selected for evaluation. In order to estimate the incidence,

en el cultivo de chile de las dos principales regiones productoras de este cultivo en el estado de Chihuahua. En ambas regiones productoras de chile se determinaron las variables incidencia y severidad de la virosis en campo, detección de especies virales, proporción de virus detectados por localidad y análisis de infecciones múltiples.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la incidencia y severidad. Se realizaron recorridos de campo en la etapa de desarrollo y fructificación del cultivo para determinar la incidencia y severidad en plantas de chile que presentaban síntomas característicos de una probable enfermedad de tipo viral en cuatro localidades de la región centro-sur y en seis localidades de la región norte del estado de Chihuahua (Figura 1). En cada localidad se seleccionaron tres predios para su evaluación. Para medir la incidencia se seleccionó el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. Se hizo el conteo de plantas aparentemente sanas y plantas que presentaban síntomas característicos de enfermedades virales, tales como mosaicos, moteado, deformación de hojas, clorosis, ampollamiento y enanismo.

10% of the total grooves distributed throughout each plot was selected. Apparently healthy plants and plants showing typical symptoms of viral diseases, such as mosaics, mottling, leaf distortion, chlorosis, blistering and stunting disease were counted. Incidence was calculated considering the proportion of symptomatic plants to total plants sampled at each site. The severity was determined at each plot using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plant, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage. The severity index was estimated using the following formula:

$$IS = (\sum n.v / 5N) * 100$$

Where IS = severity index, n = number of plants per category, v = numerical value of each category and N = total number of plants per site (Escalona, 2002).

Plant material collection in the field. The collection of leaf samples with symptoms characteristic of viral diseases in chili pepper was done according to Hernandez *et al.* (1998) methodology, during June, July and August 2008 in the south-central region and during July and

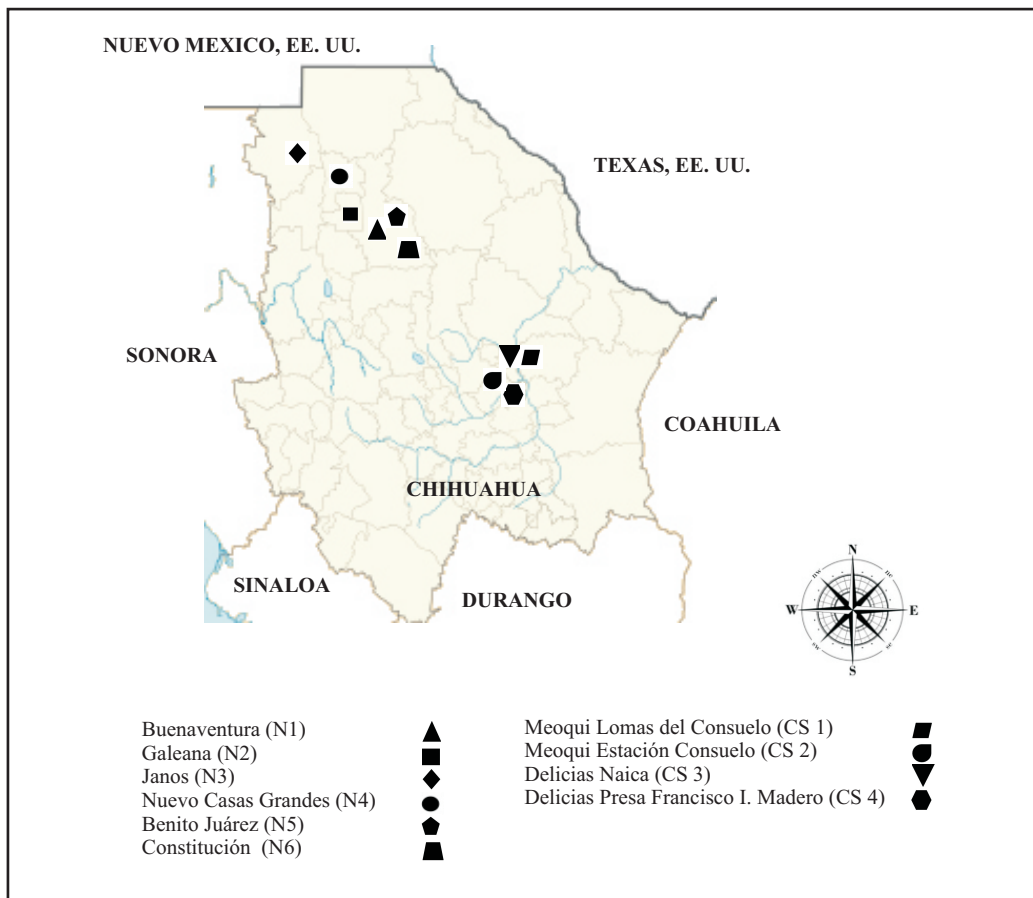


Figura 1. Distribución de las localidades muestreadas para la determinación de incidencia, severidad, índice de severidad de posibles enfermedades de tipo viral, y detección de virus en el cultivo de chile en las regiones centro-sur y norte del estado de Chihuahua.

Figure 1. Distribution of sampled sites to determine incidence, severity, severity index of potential virus-like diseases, and detection of virus in the culture of chile in south-central and northern state of Chihuahua regions.

La incidencia se calculó con base en la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en cada sitio muestreado. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0 = plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño. El índice de severidad se estimó por medio de la siguiente fórmula:

$$IS = (n.v/5N) * 100$$

Donde IS = Índice de Severidad, n = número de plantas por cada categoría, v = valor numérico de cada categoría y N = Número total de plantas por localidad (Escalona, 2002).

Colecta de muestras en campo. La colecta de muestras foliares con sintomatología característica de enfermedades virales en Chile se realizó de acuerdo a la metodología de Hernández *et al.* (1998) durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur y en julio y agosto de 2009 en la región norte. En la primera región se obtuvieron 129 muestras distribuidas por cada localidad (CS1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23) y en la región norte 74 muestras (N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8). Las muestras se colectaron en bolsas de plástico y se colocaron en una hielera acondicionada a 4°C para su transporte al laboratorio, en donde se almacenaron temporalmente a -20°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Fitopatología de la División de Ciencias de la Vida (DICIVA-CIS-UG) y en el laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, UACH. Para la detección de los virus se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática en fase sólida tipo sándwich (DAS-ELISA) según las recomendaciones del fabricante (Agdia Inc., 2008 y 2009), la cual se realiza en dos días (Clark y Adams, 1977; Cruz y Frías, 1997). En los ensayos se utilizaron los anticuerpos policlonales específicos para la detección de los virus TEV (*Tobacco etch virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), PMMoV (*Pepper mild mottle virus*), PepMV (*Pepper mottle virus*), AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TRSV (*Tobacco ring spot virus*), TBSV (*Tomato bushy stunt virus*), ToRSV (*Tomato ring spot virus*), INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) y TSWV (*Tomato spotted wilt virus*).

Origen de los antisueros. Los anticuerpos se obtuvieron de la compañía Agdia Inc., USA en 2008 y 2009, los cuales se preservaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante hasta el momento de realizar los bioensayos.

Obtención de lecturas. Las lecturas de absorbancia se obtuvieron utilizando un lector de microplacas marca BioRad, modelo 3550-UV a una longitud de onda de 405 nm, ya que en el sistema de detección de los virus estudiados se utilizó la enzima fosfatasa alcalina.

Determinación del límite de detección. El límite de detección se determinó considerando como positivas todas las muestras que tuvieron un valor de absorbancia dos veces mayor al promedio del valor de la absorbancia del control

August 2009 in the northern region. In the first region, 129 samples distributed per each site were obtained (CS1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23), and at the northern region, 74 samples were obtained (N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8). The samples were collected in plastic bags and immediately placed in a cooler (4°C), when in the laboratory, the samples were stored at -20°C until processing.

Sample processing. The samples were processed at the Plant Pathology Laboratory of the Life Sciences Division (DICIVA-CIS-UG) and at the Applied Microbiology, Plant Pathology and Postharvest Physiology Laboratory of the Agrotechnological Sciences Faculty, UACH. As for virus detection, the Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) technique was used according to the manufacturer's recommendations (Agdia Inc., 2008 and 2009), which is performed in two days (Clark and Adams, 1977; Cruz and Frías, 1997). During the assays, specific polyclonal antibodies were used for detection of the following virus: TEV (*Tobacco etch virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), PMMoV (*Pepper mild mottle virus*), PepMV (*Pepper mottle virus*), AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TRSV (*Tobacco ring spot virus*), TBSV (*Tomato bushy stunt virus*), ToRSV (*Tomato ring spot virus*), INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) y TSWV (*Tomato spotted wilt virus*).

Origin of the antisera. Antibodies were obtained from Agdia Inc. Company, USA, during 2008 and 2009, which were preserved according to the manufacturer's recommendations until the bioassays.

Obtaining the readings. Absorbance readings were obtained by using a BioRad microplate reader, model 3550-UV at a 405 nm wavelength because in the detection system, the alkaline phosphatase enzyme was used.

Determination of the limit of detection. The detection limit was determined considering as positive all samples that showed an absorbance value twice the average value of the absorbance of the negative control; therefore, all absorbance values above this limit, were considered positive.

RESULTS

Incidence and severity of viral diseases. The incidence and severity was determined in chili pepper plants exhibiting characteristic symptoms of viral-type infections. In the south-central region, higher incidence and severity index were observed at the CS4 site with 15.9% and 5.4%, respectively, being category 1 the highest on the severity scale. This shows that although having fewer plants in category 4, the disease progression is very important, which could increase the spread of viral diseases, the loss of plants and significantly reduce the production of chili pepper. On the other hand, CS1, CS2 and CS3 sites were similar on incidence (3.9%, 3.7% and 4.3, respectively) and severity index (1.3%, 1.7% and 1.7%, respectively) (Figure 2). In the northern region, the N1 and N3 sites showed the highest incidence of plants with symptoms of viral type with values of 23 and 25%, respectively; while the lowest values of this

negativo; por lo que todo valor de absorbancia obtenido de las muestras que estuviera por arriba de este límite, se consideró positivo.

RESULTADOS

Incidencia y severidad de la virosis. La incidencia y severidad se determinó en plantas de chile que presentaban síntomas característicos de infecciones de tipo viral. En la región centro-sur, se observó una mayor incidencia e índice de severidad en la localidad CS4 con valores de 15.9% y 5.4%, respectivamente, siendo mayor la categoría 1 en la escala de severidad. Lo anterior muestra que aunque se tienen menor cantidad de plantas en la categoría 4, el avance de la enfermedad es muy importante, lo cual podría incrementar la diseminación de las enfermedades virales, causar la pérdida de plantas y reducir de manera importante la producción de chile. Por otro lado, las localidades CS1, CS2 y CS3 fueron similares en las variables de incidencia (3.9%, 3.7% y 4.3%, respectivamente) e índice de severidad (1.3%, 1.7% y 1.7%, respectivamente) (Figura 2). En la región norte, las localidades N1 y N3 presentaron la mayor incidencia de plantas con síntomas de tipo viral con valores

variable occurred in the N6 site; however, this latter site had the highest severity index with 47.7%, predominating category 4 on the severity scale (Figure 3).

Virus detection. Eight viruses were detected in the south- central region and nine viruses in the northern region, with five viruses in common in both regions: TMV, CMV, TBSV, TEV and PVY. From the 129 leaf samples with viral type symptoms from the south-central region, only 89 were positive for at least one type of virus. In this region the CMV, TMV, AMV, TBSV, PMMoV, TEV, PVY and PepMV viruses were detected; the first two had the highest frequency values 36% and 20%, respectively. The less frequent viruses were PVY (5%) and PepMV (1%). Furthermore, 42 out of the 74 leaf samples from the northern region were positive for at least one of the following viruses: TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV and ToRSV; the TRSV (53%) and TBSV (42%) viruses were the most frequent, while TSWV (3%), PVY (3%) and ToRSV (1%) were less frequent (Figure 4).

Out of the 10 sites under study, three of the south-central region (CS1, CS2 and CS3) and one from the

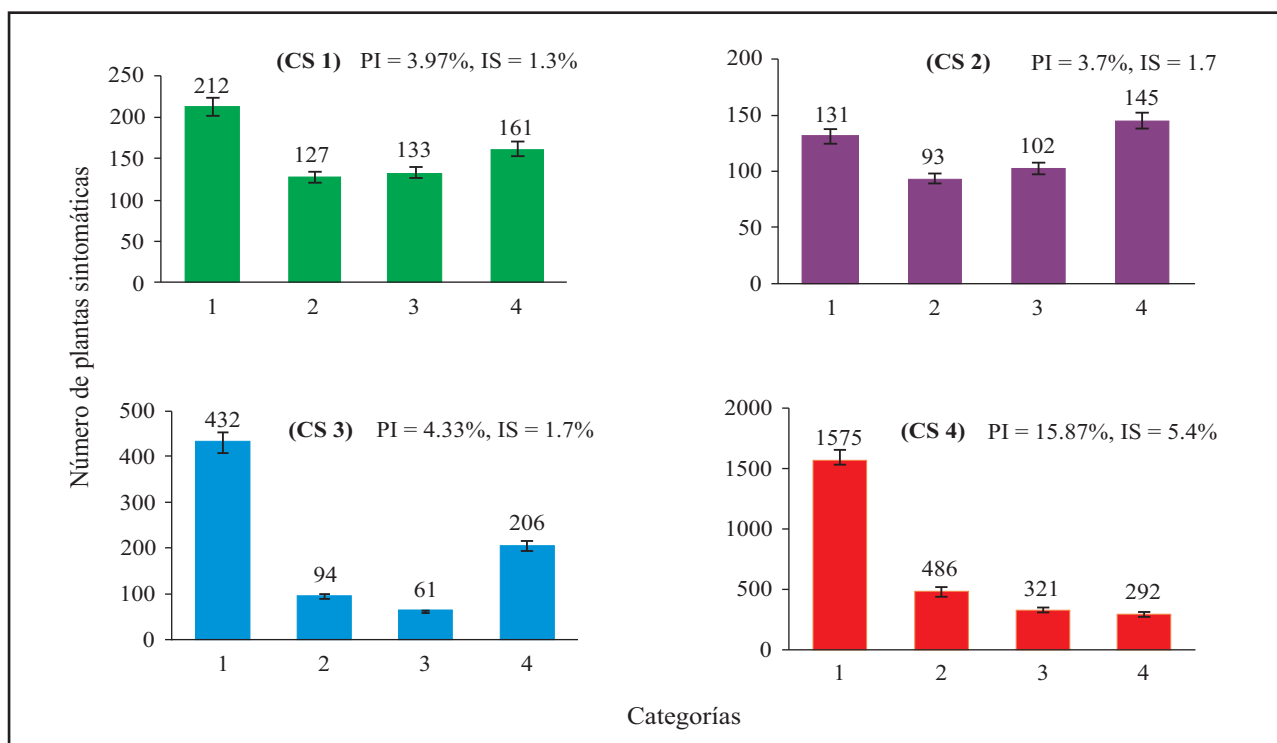


Figura 2. Incidencia (PI), severidad e índice de severidad (IS) de plantas con sintomatología característica de tipo viral en el cultivo de chile en cuatro localidades de la región centro-sur del estado de Chihuahua. La incidencia se calculó tomando en cuenta la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0= plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño, y el índice de severidad se calculó de acuerdo a la metodología de Escalona (2002).

Figure 2. Impact (IP), severity and severity index (SI) plant with characteristic symptoms of viral type in the cultivation of pepper in four towns in the south-central region of the state of Chihuahua. The incidence was calculated taking into account the proportion of symptomatic plants to total plant at 10% of grooves distributed throughout each property. The severity was determined at each site using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plants, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage and the severity index was calculated according to the methodology of Escalona (2002).

de 23 y 25%, respectivamente, mientras que los valores más bajos de ésta variable se presentaron en la localidad N6; sin embargo, esta última localidad presentó el índice de severidad más alto con un 47.7%, predominando la categoría 4 en la escala de severidad (Figura 3).

northern region (N4), tested positive for seven and eight viruses, respectively. In the south-central region, the TMV, AMV, CMV and PVY viruses were detected at all four sites, where the first three were observed in major proportions in at least 2 sites, and PVY was detected at all four sites, but in

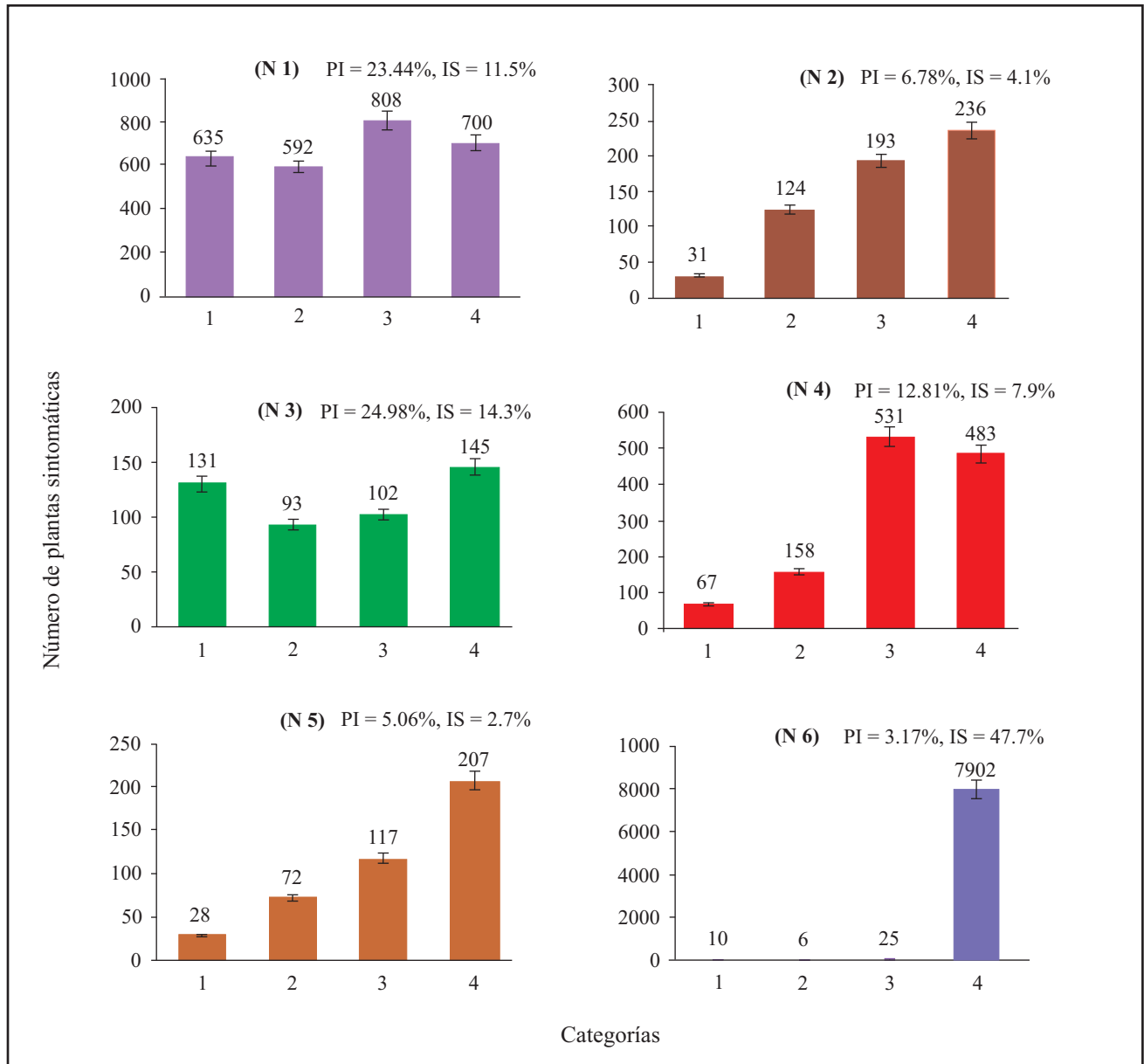


Figura 3. Incidencia (PI), severidad e índice de severidad (IS) de plantas con sintomatología característica de tipo viral en el cultivo de chile en seis localidades de la región norte del estado de Chihuahua. La incidencia se calculó tomando en cuenta la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0 = plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño, y el índice de severidad se calculó de acuerdo a la metodología de Escalona (2002).

Figure 3. Impact (IP), severity and severity index (SI) plant with characteristic symptoms of viral type in growing chile in six villages in the northern region of the state of Chihuahua. The incidence was calculated taking into account the proportion of symptomatic plants to total plant at 10% of grooves distributed throughout each property. The severity was determined at each site using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plants, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage and the severity index was calculated according to the methodology of Escalona (2002).

Detección de virus. De las regiones evaluadas, se detectaron ocho virus en la centro-sur y nueve virus en la norte; obteniéndose cinco virus en común: TMV, CMV, TBSV, TEV y PVY. De 129 muestras foliares con sintomatología de tipo viral procedentes de la región centro-sur, 89 fueron positivas para al menos un tipo de virus. En esta región se detectaron los virus CMV, TMV, AMV, TBSV, PMMoV, TEV, PVY y PepMV; los dos primeros presentaron la mayor frecuencia con valores de 36% y 20% respectivamente. Los virus menos frecuentes fueron PVY (5%) y PepMV (1%). Por otro lado, 42 de 74 muestras foliares procedentes de la región norte resultaron positivas para al menos alguno de los siguientes virus: TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV y ToRSV; los virus TRSV (53%) y TBSV (42%) fueron los más frecuentes mientras que TSWV (3%), PVY (3%) y ToRSV (1%) se presentaron con la menor frecuencia (Figura 4).

lower ratio. The PMMoV and TBSV virus were found in three of the four sites, showing the highest proportion in the CS2 site (Table 1). On the other hand, in the northern region, TRSV was observed in high proportions in five out of the six sites (Table 2). The TBSV virus was detected in higher proportions in the N4, N5 and N6 sites. Lastly, INSV was only present in the N4 site, but in a high proportion (0.6) (Table 2).

Multiple infections. The samples that tested positive by DAS-ELISA from the south-central region, were 55% for a single virus, 29% for two virus types and 9% for samples infected with three types of virus; samples infected with four, five or six viruses were also detected in a lower percentage. The TMV and CMV virus occurred in almost all combinations (Table 3). In the northern region, 21.4% of samples were positive for one virus; combinations of two, three, four and five viruses were also detected, the first two

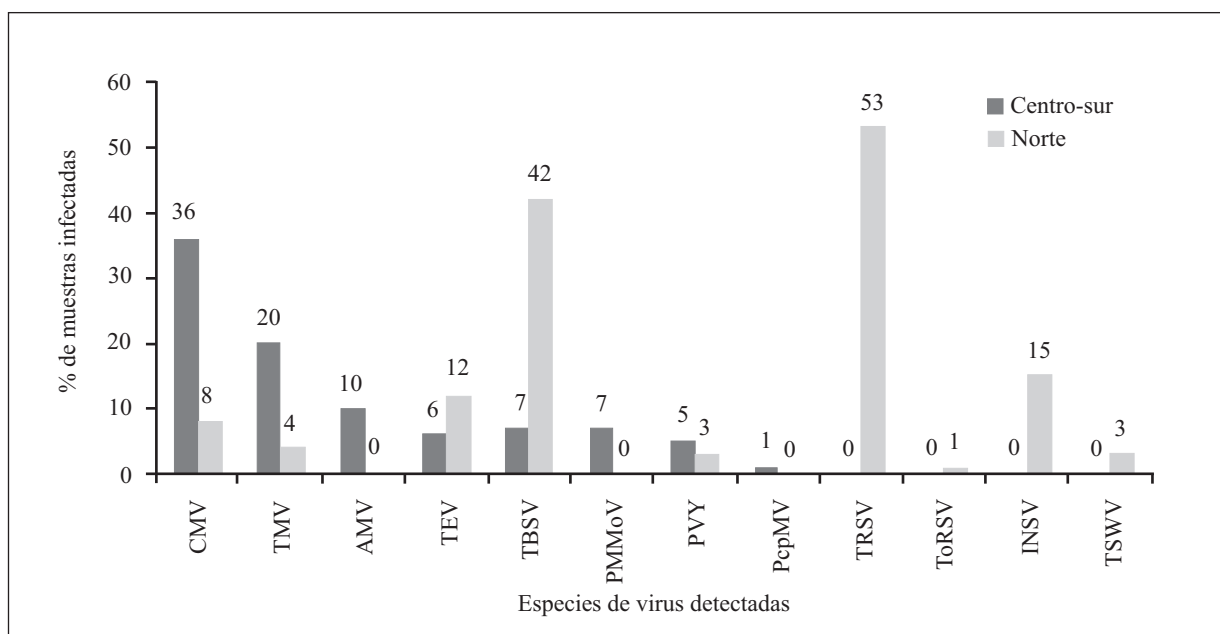


Figura 4. Frecuencia de virus en el cultivo de chile detectados por medio de la técnica DAS-ELISA en base a 129 muestras foliares provenientes de la región centro-sur, y 74 muestras foliares de la región norte del estado de Chihuahua, México. Las muestras con sintomatología característica de enfermedades virales en Chile se colectaron durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur y en julio y agosto de 2009 en la región norte.

Figure 4. Frequency of virus in the culture of chile detected by the DAS-ELISA based on 129 leaf samples from the south-central region, and 74 leaf samples from the northern region of the state of Chihuahua, Mexico. Samples with characteristic symptoms of viral diseases in Chile were collected during the months of June, July and August 2008 in the south central region and in July and August 2009 in the northern region.

De las 10 localidades de este estudio, tres de la región centro-sur (CS1, CS2 y CS3) y una de la norte (N4) sobresalieron por presentar siete y ocho de los virus evaluados respectivamente. En la región centro-sur, los virus TMV, AMV, CMV y PVY se detectaron en las cuatro localidades, presentándose los tres primeros en proporciones importantes en al menos dos de ellas, mientras que PVY fue detectado en las cuatro localidades, pero en una baja proporción. Los virus PMMoV y TBSV se encontraron en tres de las cuatro localidades, detectándose en alta

being the most common with values of 40.5% and 19%, respectively (Table 4). The TRSV virus appeared in all combinations, whereas TBSV was present in almost all. The INSV, TEV, TMV virus occurred only in the combinations from three to five viruses (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, the incidence and severity of chili pepper plants with characteristic symptoms of viral type in south-central and northern regions of Chihuahua

proporción en la localidad CS2 (Cuadro 1). Por otro lado, en la región norte, el TRSV se presentó en altas proporciones en cinco de las seis localidades (Cuadro 2). El virus TBSV se detectó en altas proporciones en las localidades N4, N5 y N6. Finalmente, el INSV sólo se presentó en la localidad N4, pero con una proporción alta (0.6) (Cuadro 2).

State were evaluated. Additionally, the presence of 12 species of virus were detected in leaf samples and thus their frequency and viral complexity were determined.

In the northern region, the highest incidence and severity index values were obtained. This difference could be related to crop management because the production

Cuadro 1. Proporción de muestras positivas por virus detectados con base en la técnica DAS-ELISA en 129 muestras foliares recolectadas durante junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur del estado de Chihuahua.

Table 1. Proportion positive samples detected viruses based on DAS-ELISA technique in 129 leaf samples collected during June, July and August 2008, in the south-central region of Chihuahua state.

Localidad	Virus							
	PMMoV	PVY	TMV	AMV	CMV	PepMV	TBSV	TEV
CS 1	0.09 ^a	0.02	0.35	0.16	0.49	0.00	0.05	0.09
CS 2	0.33	0.11	0.33	0.44	0.11	0.11	0.22	0.00
CS 3	0.04	0.06	0.07	0.02	0.31	0.00	0.09	0.07
CS 4	0.00	0.04	0.17	0.04	0.35	0.00	0.00	0.00

^aLos datos presentados son proporciones del número de muestras positivas para cada virus entre el total de muestras procesadas en cada localidad. Cs1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23.

Cuadro 2. Proporción de muestras positivas poro virus detectados con base en la técnica DAS-ELISA en 74 muestras foliares recolectadas durante julio y agosto de 2009 en la zona norte del estado de Chihuahua.

Table 2. Proportion positive samples detected viruses based on DAS-ELISA technique in 74 leaf samples collected during July and August 2009, in the northern region of Chihuahua state.

Localidad	Virus								
	TRSV	CMV	TEV	INSV	TSWV	PVY	ToRSV	TBSV	TMV
N1	0.00 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
N2	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N3	0.43	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N4	0.94	0.00	0.33	0.61	0.11	0.06	0.05	1.00	0.06
N5	0.58	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00
N6	1.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.25

^aLos datos presentados son proporciones del número de muestras positivas para cada virus entre el total de muestras procesadas en cada localidad. N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8.

Infecciones múltiples. De las muestras positivas analizadas por DAS-ELISA en la región centro-sur, el 55% de ellas fueron positivas para un solo virus, el 29% para dos tipos virus y 9% para muestras infectadas con tres tipos de virus; también se detectaron muestras infectadas con cuatro, cinco y seis virus en un menor porcentaje. Los virus TMV y CMV se presentaron en casi todas las combinaciones (Cuadro 3). En la región norte, el 21.4% de las muestras fueron positivas para un solo virus; también se detectaron combinaciones de dos, tres, cuatro y cinco virus, siendo las dos primeras las más comunes con valores de 40.5% y 19%, respectivamente (Cuadro 4). El virus TRSV se presentó en todas las combinaciones, mientras que TBSV estuvo presente en casi todas. Los virus INSV, TEV, TMV solo se presentaron en las combinaciones de tres a cinco virus (Cuadro 4).

systems in the region are less technically advanced than in the south- central region. Sepulveda *et al.* (2005) obtained a low percentage of infection and development of viruses as low as 8.2% incidence by installing padding and iron applications, whereas without padding but with the iron application the incidence was 24.4%. Moreover, Guigón-López and González-González (1999) found that combinations chili - sorghum and chili - corn decreased the incidence of viral infections by up to 39% and they delayed the development of virus-like symptoms in 60%. Additionally, weather conditions may play an important role in the development of viral diseases. Guigón-López and González-González (1999) reported that the April planting was better than May planting, showing a reduction of the incidence, the rate of apparent infection and the development of symptoms of viral type.

Cuadro 3. Complejidad de infecciones virales detectadas por la técnica DAS-ELISA en base al número total de muestras positivas para al menos un virus colectadas en la región centro-sur del estado de Chihuahua durante junio, julio y agosto de 2008.

Table 3. Complexity of viral infections detected by DAS-ELISA technique based on the total number of samples that tested positive for at least one virus. Samples collected in the south-central region of Chihuahua state during June, July and August 2008.

Número de virus en muestras de chile infectadas					
Uno	Dos	Tres	Cuatro	Cinco	Seis
CMV	CMV-TEV	TMV-CMV-TEV	TMMoV-AMV-PepMV-TBSV	PMMoV PVY-TMV-AMV-TBSV	PMMoV-TMV-AMV-CMV-PepMV-TEV
TMV	TMV-CMV	TMV-AMV-PMMoV	TMV-AMV-PMMoV-PVY		
AMV	TMV-PMMoV	AMV-CMV-PMMoV	TMV-CMV-TBSV-PVY		
TEV PVY PMMoV	TMV-TBSV	TMV-AMV-CMV			
55.6% ^a	29.3%	9.0%	3.0%	2.0%	1%

^aPorcentaje del total de muestras de chile que fueron positivas por DAS-ELISA.

Cuadro 4. Complejidad de infecciones virales detectadas por la técnica DAS-ELISA en base al número total de muestras positivas para al menos un virus colectadas en la región norte del estado de Chihuahua durante julio y agosto de 2009.

Table 4. Complexity of viral infections detected by DAS-ELISA technique based on the total number of samples that tested positive for at least one virus. Samples collected in the northern region of Chihuahua state during July and August 2009.

Número de virus en muestras de chile infectadas				
Uno	Dos	Tres	Cuatro	Cinco
TRSV PVY TBSV ToRSV	TRSV-CMV TRSV-TBSV	TRSV-TBSV-TMV TRSV-TBSV-TEV	TRSV-TBSV-TEV-TMV TRSV-TBSV-TEV-INSV	TRSV-TBSV-TEV-INSV-TSWV
		TRSV-TBSV-INSV	TRSV-TBSV-PVY-INSV TRSV-TBSV-TMV-INSV	
21.4% ^a	40.45%	19.04%	14.28%	4.76%

^aPorcentaje del total de muestras de chile que fueron positivas por DAS-ELISA.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la incidencia y severidad de plantas de chile con sintomatología característica de tipo viral en las regiones centro-sur y norte del estado de Chihuahua. Asimismo, se detectó la presencia de 12 especies de virus en muestras foliares y con ello se determinó su frecuencia y complejidad viral.

En la región norte se presentaron los valores más altos de incidencia e índice de severidad. Esta diferencia podría estar relacionada con el manejo del cultivo, ya que los sistemas de producción en dicha región son menos

Tun-Azul *et al.* (2004) reported an 87% virus incidence in chili crops and a 3% severity index. In the present study, the incidence was lower but the severity index was similar for some sites of the south-central region; however, the average severity index of the northern region was higher than that reported by these authors.

From the two evaluated regions, eight viruses were detected in the south-central region and nine in the northern region, with five viruses in common; however, the most abundant viruses were different between regions. In the south-central region, the most frequent viruses detected

tecnificados que en la centro-sur. Sepúlveda *et al.* (2005) mediante la instalación de acolchado y aplicaciones de hierro, obtuvieron un bajo porcentaje de infección y desarrollo de la virosis hasta en un 8.2% de incidencia, mientras que sin acolchado pero con la aplicaciones de hierro tuvieron una incidencia de un 24.4%. Por otra parte, Guigón-López y González-González (1999) encontraron que las combinaciones chile-sorgo y chile-maíz disminuyeron la incidencia de la virosis hasta en un 39% y retrasaron el desarrollo de sintomatología de tipo viral en un 60%. Asimismo, las condiciones climáticas podrían jugar un papel importante en el desarrollo de las enfermedades virales. Guigón-López y González-González (1999) reportaron que la siembra de abril era mejor que la de mayo, reflejándose en la reducción de la incidencia, la tasa de infección aparente y el desarrollo de la sintomatología de tipo viral.

Tun-Azul *et al.* (2004) reportaron una incidencia de la virosis en el cultivo de chile del 87% y un índice de severidad del 3%. En nuestro estudio, la incidencia fue menor pero el índice de severidad fue similar para algunas localidades de la región centro-sur; sin embargo, el índice de severidad promedio de la región norte fue superior al reportado por dichos autores.

De las dos regiones evaluadas, se detectaron ocho virus en la región centro-sur y nueve en la norte, de los cuales cinco fueron en común; sin embargo, los virus más abundantes fueron diferentes entre regiones. En la región centro-sur, los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron CMV, TMV y AMV, los cuales están distribuidos en todo el mundo (Alonso-Prados *et al.*, 1998; Hull, 2002; Himmel, 2003). El CMV es uno de los virus de mayor importancia debido a su impacto económico (Alonso-Prados *et al.*, 1998), a su extensivo rango de hospederos (Hull, 2002) y a su eficiente transmisión de manera no persistente por más de 75 especies de áfidos, así como por su transmisión mecánica y por semilla (Murphy, 2003; Astier *et al.*, 2007); lo anterior, se puede considerar para tomar acciones preventivas en nuestra región mediante un manejo integrado de plagas, así como usar semilla certificada y evitar en lo posible la manipulación de plantas. El TMV se ha caracterizado por infectar cultivares del género *Capsicum*, en donde ocasiona pérdidas en la producción de hasta un 70% en cultivares susceptibles. La frecuencia de este virus se incrementa en el cultivo de chile por la manipulación de plántulas durante el trasplante o durante el desarrollo de las plantas, ya que este virus se transmite mayormente por contacto y mecánicamente (Himmel, 2003). Además, con frecuencia los trabajadores fuman durante los horarios de trabajo, lo cual es un riesgo de contaminación para iniciar las infecciones con este virus debido a que el TMV mantiene su estructura y actividad en la ceniza del cigarro cuando el tabaco proviene de un campo infectado con el virus (Hull, 2002). El AMV infecta una amplia gama de cultivos agrícolas de importancia económica; es causa de importantes pérdidas en los cultivos de chile en países como Bulgaria, Hungría, Yugoslavia, México y Estados Unidos de Norteamérica. La frecuencia de este virus se incrementa cuando el cultivo de chile se

were CMV, TMV and AMV, which are worldwide distributed (Alonso-Prados *et al.*, 1998; Hull, 2002; Himmel, 2003). The CMV is one of the most important viruses because of its economic impact (Alonso-Prados *et al.*, 1998), because of its extensive host range (Hull, 2002) and because of its efficient transmission in a non-persistent manner by more than 75 aphids species, as well as its mechanical transmission and by seed (Murphy, 2003; Astier *et al.*, 2007); all of the above, may be considered to take preventive actions in our region through an integrated pest management, as well as with the use of certified seeds and, whenever possible, avoid the plants manipulation. The TMV has infected crops of the genus *Capsicum*, where it causes yield losses of up to 70% in susceptible crops. The frequency of this virus is increased in the chili pepper crops because of the seedlings manipulation during transplant or during plant development, because this virus is transmitted primarily by contact and mechanically (Himmel, 2003). In addition, workers often smoke during working hours, which is a risk of contamination to initiate infection with this virus because the TMV structure and activity remains in the ash of the cigar when the tobacco comes from a virus infected area (Hull, 2002). AMV infects a wide range of economically important agricultural crops; it causes major chili crop losses in countries such as Bulgaria, Hungary, Yugoslavia, Mexico and the United States. The frequency of this virus increases when the chili crop is close to alfalfa fields and it can cause losses in crop yield by up to 65% (Hull, 2002). This virus may be an important risk in this region, which usually also produces alfalfa and it is very common to find this crop near to chili fields, favoring the flow of insect vectors between crops and thus the spread of virus. The AMV is transmitted in a non-persistent manner by at least 14 species of aphids, including the green peach aphid, pea aphid, and blue alfalfa aphid (Hull, 2002; Creamer, 2003; Astier *et al.*, 2007).

On the other hand, the PVY virus was found in the four sites of the south-central region, so it is important to understand its biology and distribution in order to establish preventive control actions. The PVY virus has also been reported in Puebla, Toluca, Coahuila and Nuevo Leon and it is considered one of the most damaging viruses in chili pepper, tomato and tobacco plants, as it causes significant economic losses in these crops (Luis-Arteaga and Ponz, 2003). It is possible to distinguish several PVY groups, according to the severity of symptoms caused in chili peppers. Fanigliulo *et al.* (2005), reported a PVY recombinant strain ((PVY^{NP})) which induces veinal necrosis in chili peppers; Also, Llave *et al.* (1999) reported the pathotypes PVY 0, PVY 1 and PVY 1-2 in chili pepper crops. This virus is transmitted by seed and by aphids in a nonpersistent manner; *Myzus persicae* aphid is the most efficient species in many regions (Hull, 2002; Luis-Arteaga and Ponz, 2003), which should be monitored in this region in order to take control actions before it poses a risk to chili crops. Although the INSV, TRSV, ToRSV and TSWV viruses have been reported in Mexico affecting chili crops, it was not possible to detect in any of the locations studied in this region. This suggests that the south-central region could

encuentra cerca de las plantaciones de alfalfa y puede causar pérdidas en el rendimiento del cultivo hasta en un 65% (Hull, 2002). Este virus podría ser un riesgo importante en esta región, ya que por lo general también se produce alfalfa y es frecuente encontrar plantaciones de este cultivo cercanas a los campos de chile, favoreciendo el flujo de insectos vectores entre los cultivos y con ello la diseminación del virus. El AMV es transmitido de manera no persistente por al menos 14 especies de áfidos, incluyendo el áfido verde del durazno, el áfido del chícharo y el áfido azul de la alfalfa (Hull, 2002; Creamer, 2003; Astier *et al.*, 2007).

Por otro lado, el virus PVY se encontró en las cuatro localidades de la región centro-sur, por lo que es importante conocer su biología y su distribución para tomar acciones preventivas de control. El PVY también se ha reportado en Puebla, Toluca, Coahuila y Nuevo León y es considerado uno de los virus más dañinos en plantas de chile, tomate y tabaco, ya que causa pérdidas económicas importantes en estos cultivos (Luis-Arteaga y Ponz, 2003). Pueden distinguirse muchos grupos de razas de PVY de acuerdo a la severidad de síntomas que causa en chile. Fanigliulo *et al.* (2005) reportaron una cepa recombinante de PVY (PVY^{NP}) que induce necrosis venal en chile; asimismo, Llave *et al.* (1999) reportaron los patotipos de PVY 0, PVY 1 y PVY 1-2 en el cultivo de chile. Este virus se transmite por semilla y por áfidos en forma no persistente; el áfido *Myzus persicae* es la especie más eficiente en muchas regiones (Hull, 2002; Luis-Arteaga y Ponz, 2003), el cual debería de monitorearse en esta región para tomar acciones de control antes de que éste represente un riesgo para el cultivo de chile. Aunque los virus INSV, TRSV, ToRSV y TSWV se han reportado en México afectando el cultivo de chile, no fue posible su detección en ninguna de las localidades estudiadas en esta región. Lo anterior sugiere que la región centro-sur podría estar libre de estos virus y por lo tanto se deberían tomar acciones para prevenir su entrada, ya que estos virus en general son de fácil transmisión si no se tiene cuidado al momento de seleccionar la semilla o manipular las plántulas tanto en invernadero como en campo.

En la región norte, los virus con mayor frecuencia fueron TRSV, TBSV e INSV. Rodríguez *et al.* (2004) en un estudio de detección de enfermedades virales en Venezuela, reportaron que el virus TRSV presentó una incidencia del 59%, la cual fue similar a los resultados obtenidos para este virus en la región norte. Este virus se transmite mecánicamente, por semilla y por nematodos (Hull, 2002; Atier *et al.*, 2007). La diseminación por nematodos sería poco eficiente debido a la baja movilidad de éstos a grandes distancias dentro de las plantaciones (Hull, 2002). Su importancia está en que podrían ser diseminadores de virus a partir de inóculo primario, básicamente a plantas vecinas o a corta distancia cuando se utiliza riego por surcos y eventualmente pueden ser movidos a grandes distancias con restos de suelo en implementos mecanizados (Rodríguez *et al.*, 2004).

El virus TBSV particularmente infecta tomate en invernaderos y árboles frutales en varias regiones del mundo (Astier *et al.*, 2007). Este virus no es común en el cultivo de

be free of these viruses and, therefore, preventive actions should be taken, as these viruses are generally easily transmitted if not careful when selecting the seed or by manipulate the seedlings, in both greenhouse and field.

In the northern region, the most frequent viruses were TRSV, TBSV and INSV. Rodríguez *et al.* (2004) in a study of detection of viral diseases in Venezuela, reported that the TRSV virus had a 59% incidence, which was similar to the results obtained for this virus in the northern region. This virus is mechanically transmitted, by seed or by nematodes (Hull, 2002; Atier *et al.*, 2007). The spread by nematodes would be inefficient due to the low mobility of these in long distances within plantations (Hull, 2002). Their main significance is that they could be disseminators of viruses from primary inoculum, basically to neighbor plants or to those located at short distances when furrow irrigation is used and may eventually be moved over long distances with traces of soil in mechanical tools (Rodríguez *et al.*, 2004).

The TBSV virus particularly infects greenhouse tomatoes and orchards in several regions of the world (Astier *et al.*, 2007). This virus is not common in chili crops and few studies mention the natural infection of chili pepper plants with TBSV (Fischer and Lockhart, 1977); however, in this study, the TBSV was present in the northern region and was one of the most abundant, so this might be the first report of this virus in Mexican chili pepper crops. The TBSV is transmitted mechanically, by seed, by contact, by vegetative propagation or sometimes by the *Olpidium* spp. fungus (Astier *et al.*, 2007). This lays the foundation for further studies on the complete characterization of this virus and its management in Chihuahua State.

The INSV virus is currently worldwide distributed (Kuo *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2009). This virus is devastating for ornamentals and it was first detected in New Zealand, where there is an ongoing research about the virus distribution in different hosts (Elliott *et al.*, 2009); its global spread is mainly attributed to its vector, the *Frankliniella occidentalis* thrips. Although the INSV is rare in outdoors crops, Kuo *et al.* (2014) reported its presence in lettuce crops in California, USA, with devastating results; Gonzalez-Pacheco and Silva-Rosales (2013) reported this virus for the first time in tomatillo and chili pepper plants in Mexico after an assessment in Guanajuato and Queretaro States. In this study, the INSV was detected for first time in the northern region of Chihuahua State, with a very high frequency.

The highest virus diversity and incidence was registered in the CS2 site with seven viruses, where AMV, TMV and PMMoV where outstanding for their incidence; the N4 site had eight viruses, with TBSV, TRSV and INSV standing out for their incidence (Tables 1 and 2). These facts make the sites a source of dispersion of the detected viruses.

Multiple infections. From the two chili pepper producing regions in Chihuahua state, 44% of the positive samples from the south-central region showed mixed viral infections in combinations from two to six viruses (Table 3); in the northern region, from the total positive samples, 78% relates to mixed infections with combinations from two to five viruses (Table 4). Garzón-Tiznado *et al.* (2005) found a

chile y escasos estudios mencionan la infección natural de plantas de Chile con TBSV (Fischer y Lockhart, 1977); sin embargo, en este estudio el TBSV se presentó en la región norte y fue uno de los más abundantes, por lo que este podría ser el primer reporte de este virus en el cultivo de Chile en México. El TBSV se transmite en forma mecánica, por semilla, por contacto, por propagación vegetativa y en ocasiones por el hongo *Oplidium* spp. (Astier *et al.*, 2007). Lo anterior establece las bases para un estudio posterior sobre la caracterización completa de este virus y su manejo en el estado de Chihuahua.

El virus INSV se encuentra distribuido a nivel mundial (Kuo *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2009). Este virus es devastador de plantas ornamentales, detectado por primera vez en Nueva Zelanda, y donde se siguen realizando estudios de distribución del virus en diversos hospederos (Elliott *et al.*, 2009); su dispersión mundial se le atribuye principalmente a su vector, el trips *Frankliniella occidentalis*. Aunque el INSV no es muy frecuente en cultivos a cielo abierto, Kuo *et al.* (2014) reportaron su presencia en cultivos de lechuga en California, EUA con resultados devastadores; González-Pacheco y Silva-Rosales (2013) lo reportaron por primera vez en plantas de tomatillo y de Chile en México a través de una evaluación en los estados de Guanajuato y Querétaro. En el presente estudio, se detectó el INSV por primera vez en la región norte del estado de Chihuahua, con una frecuencia alta.

La mayor diversidad e incidencia de virus se registró en las localidades CS2 con siete virus, donde destacan por su incidencia AMV, TMV y PMMoV y N4 con ocho virus, destacando por su incidencia TBSV, TRSV e INSV (Cuadros 1 y 2). Lo anterior convierte a estas localidades en una fuente de dispersión de los virus detectados.

Infecciones múltiples. De las dos regiones productoras de Chile en el estado de Chihuahua, el 44% de las muestras positivas de la región centro-sur mostraron infecciones virales mixtas en combinaciones de dos a seis virus (Cuadro 3); en la región norte, del total de muestras positivas, el 78% se relaciona con infecciones mixtas con combinaciones de dos a cinco virus (Cuadro 4). Garzón-Tiznado *et al.* (2005) encontraron un 49% de infecciones mixtas en Chile en la región centro-norte del Pacífico mexicano, coincidiendo a lo reportado en este estudio para la región centro-sur; pero con un valor inferior al de la región norte. Asimismo, estos autores reportaron la combinación TEV-CMV como la más frecuente, similar a lo detectado en la región centro-sur de este estudio. Afouda *et al.* (2013) obtuvieron infecciones mixtas de dos y tres virus, coincidiendo solamente con la mezcla de CMV-TMV de la región centro-sur, que fue una de las más abundantes. Las combinaciones CMV-TMV y CMV-TRSV fueron detectadas en un trabajo previo en el cultivo de Chile en Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2004), las cuales coinciden con las combinaciones más abundantes para la región centro-sur y norte, respectivamente de este estudio. Green (2003) reportó infecciones virales múltiples de PMMoV-TMV y PMMoV-ToMV en cultivos de Chile a campo abierto, coincidiendo la primera combinación con este estudio para la región centro-sur, pero no fue de las más frecuentes. Otros

49% of mixed infections in chili pepper in the central northern region of the Mexican Pacific, this fact coincides with this study for the south-central region; but with a lower value in the northern region. Also, these authors reported the TEV-CMV combination as the most frequent combination, similar to that detected in the south-central region of this study. Afouda *et al.* (2013) obtained mixed infections of two and three viruses, only coinciding with the mixture CMV-TMV in the south-central region, which was one of the most abundant mixtures. The CMV-TMV and CMV-TRSV combinations were detected in a previous study on the chili pepper crops in Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2004), which coincide with the most abundant combinations for the south-central and northern regions, respectively, in this study. Green (2003) reported multiple viral infections of PMMoV-TMV and PMMoV-ToMV in open air chili crops, coinciding the first combination with this study for the south-central region, but it was not the most frequent. Other authors have reported that the PMMoV-PVY-TEV mixture occurs frequently in chili pepper crops (Hull, 2002; Murphy and Zitter, 2003), but it did not appear on any combination of three viruses in the two evaluated Chihuahua regions. The INSV has been found in mixed infections with TSWV (Elliott *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2014); but in this study, it was detected in triple infections always associated to TRSV and TBSV and only in five virus infections, the INSV was detected with TSWV.

CONCLUSIONS

The incidence and severity index of plants with virus-like symptoms on chili pepper crops were higher in the northern region. In the south-central region the CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY and PepMV viruses were detected; and in the northern region TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV and ToRSV viruses were detected. The CMV, TMV and AMV viruses predominated in the south-central region and TRSV, TBSV and INSV viruses predominated in the northern region. About half of the positive samples in the south-central and most of the northern region, were mixed viral infections. In the south-central region, infections of up to six viruses occurred, while in the northern only up to five; mixed infections of two viruses were the most abundant in both regions. The TMV was present in almost all mixed infections in the south-central region, while in the northern region, the TRSV-TBSV association was in almost every combination. This is the first study reporting the presence of 12 species of viruses and the first to show mixed infections in Chihuahua state. Also, the TBSV is reported for the first time in Mexican chili pepper crops. With all of the above, it is necessary to raise awareness among chili growers to carry out a good crop management at all stages of the production system in order to prevent viral infections. This study might start a new research area related to the characterization of detected viral species.

Acknowledgments. The authors wish to thank to Fundación Produce-Chihuahua and to the Consejo Estatal de Productores de Chile del estado de Chihuahua for

autores reportan que la mezcla PMMoV-PVY-TEV ocurre frecuentemente en campos cultivados con chile (Hull, 2002; Murphy y Zitter, 2003), pero ésta no se presentó en ninguna combinación de tres virus en las dos regiones evaluadas en Chihuahua. El INSV se ha encontrado en infecciones mixtas con el TSWV (Elliott *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2014); pero en este estudio, se detectó en infecciones triples asociado siempre a TRSV y TBSV y sólo en infecciones de cinco virus, el INSV se detectó con el TSWV.

CONCLUSIONES

La incidencia y el índice de severidad de plantas con síntomas de tipo viral en el cultivo de chile fueron mayores en la región norte. En la región centro-sur se detectaron los virus CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY y PepMV, y en la región norte fueron TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV y ToRSV. Los virus CMV, TMV y AMV predominaron en la región centro-sur y TRSV, TBSV e INSV en la región norte. Cerca de la mitad de las muestras positivas en la región centro-sur y la mayoría de las de la norte fueron infecciones virales mixtas. En la región centro-sur se presentaron infecciones de hasta de seis virus, mientras que en la norte hasta de cinco; las infecciones mixtas de dos virus fueron las más abundantes en ambas regiones. El TMV se presentó en casi todas las infecciones mixtas en la región centro-sur, mientras que en la norte, la asociación TRSV-TBSV estuvo en casi todas las combinaciones. Este es el primer estudio que reporta la presencia de 12 especies de virus y el primero en mostrar las infecciones mixtas en el estado de Chihuahua. Asimismo, el TBSV se reporta por primera vez en el cultivo de chile en México. Con lo anterior, es necesario concientizar a los productores de chile para que lleven a cabo un buen manejo del cultivo en todas las etapas del sistema de producción para prevenir infecciones virales. Con este estudio se podrían iniciar nuevos trabajos de investigación relacionados con la caracterización de las especies virales detectadas.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Fundación Produce-Chihuahua y al Consejo Estatal de Productores de Chile del estado de Chihuahua por financiar esta investigación, Clave: 08-2007-004.

LITERATURA CITADA

- Afouda LAC, Kotchofa R, Sare R, Zinsou V and Winter S. 2013. Occurrence and distribution of viruses infecting tomato and pepper in Alibori in northern Benin. *Phytoparasitica* 41:271-276.
- Agrios GN. 2005. Plant pathology. Fifth edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Alonso-Prados JL, Aranda MA, Malpica JM, García-Arenal F and Fraile A. 1998. Satellite RNA of Cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology* 88:520-524.
- Astier S, Albouy J, Maury Y, Robaglia C and Lecoq H. 2007. Principles of plant virology. Science Publishers. Enfield, NH, USA. 472 p.
- Clark MF and Adams AN. 1977. Characteristics of the funding this research, Code: 08-2007-004.
- microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
- Creamer R. 2003. *Alfalfa mosaic virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 24-26.
- Cruz FM y Frías TGA. 1997. Guía ilustrada de la prueba de Inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. México, D.F. 23 p.
- Elliott DR, Lebas BSM, Ochoa-Corona FM, Tang J and Alexander BJR. 2009. Investigation of *Impatiens necrotic spot virus* outbreaks in New Zealand. *Australian Plant Pathology* 38:490-495.
- Escalona AMA. 2002. Interacción de plantas de café fertilizadas con fósforo e inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares y *Phoma costarricense* Echandi. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima, México. 106 p.
- Fanigliulo A, Comes S, Pacella R, Harrach B, Martin DP and Crescenzi A. 2005. Characterisation of *Potato virus Y* nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. *Archives of Virology* 150:709-720.
- Fischer HU and Lockhart BEL. 1977. Identification and comparison of two isolates of *Tomato bushy stunt virus* from pepper and tomato in Morocco. *Phytopathology* 67:1352-1355.
- Garzón-Tiznado A, Celis-Aramburo TJ, Velarde-Félix S, Ceballos-Ruiz J, Barbosa-Jasso P, Reyes-Moreno C, Martínez-Carrillo JL, Sánchez-Peña P y Hernández-Verdugo S. 2005. Detección de virus fitopatógenos en la región centro-norte del pacífico mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:238-245.
- González LR y Delgadillo SF. 1989. Inclusiones producidas por algunos virus fitopatógenos. Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, México. Resumen, p. 89.
- González-Pacheco BE and Silva-Rosales L. 2013. First report of *Impatiens necrotic spot virus* in Mexico in tomatillo and pepper plants. *Plant Disease* 97: 1124.
- Green SK. 2003. *Pepper mild mottle virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 32-33.
- Guigón-López C y González-González PA. 1999. Manejo integrado de la virosis del chile (*Capsicum annum* L.) en el sur de Chihuahua. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:8-16.
- Harris M. 1994. Enfermedades virales de la calabacita. pp. 42-43. En: Katie O' Keeffe-Swank, Ana Reho, and Luis Bringas (eds.). Productores de Hortalizas. Willoughby, Ohio, EUA. 70 p.
- Hernández S, Fernández C y Baptista P. 1998. Metodología de la Investigación. Segunda Edición. Editorial Mc Graw

- Hill. México. 501 p.
- Himmel PT. 2003. Tobacco mosaic virus. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 38-39.
- Hull R. 2002. Mathews' Plant Virology. Fourth edition. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1001 p.
- Kuo YW, Gilbertson RL, Turini T, Brennan EB, Smith RF and Koike ST. 2014. Characterization and Epidemiology of Outbreaks of *Impatiens necrotic spot virus* on Lettuce in Coastal California. Plant Disease 98:1050-1059.
- Llave C, Martínez B, Díaz-Ruiz JR and López-Abella D. 1999. Serological analysis and coat protein sequence determination of *Potato virus Y* (PVY) pepper pathotypes and differentiation from other PVY strains. European Journal of Plant Pathology 105:847-857.
- Luis-Arteaga M and Ponz F. 2003. *Potato virus Y*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 35-36.
- Murphy JF and Zitter TA. 2003. Pepper mottle virus. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 33-34.
- Murphy JF and Warren CE. 2003. Diseases caused by viruses. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 23-24.
- Murphy JF. 2003. *Cucumber mosaic virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 29-31.
- Núñez F, Ortega GR y Costa J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Editorial Mundi Prensa. España. 607 p.
- Pérez ML y Rico JE. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. Primera edición. Universidad de Guanajuato. 143 p.
- Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Pelé JR, Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R, Rivera-Bustamante RF. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:187-197.
- Robles-Hernández L, González-Franco AC, Gill-Langarica EM, Pérez-Moreno L y López-Díaz JC. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. Tecnociencia Chihuahua 4:72-86.
- Rodríguez Y, Rangel E, Centeno F, Mendoza O y Parra A. 2004. Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. Revista de la Facultad de Agronomía, Caracas Venezuela 21:1-8.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx (consulta, junio 2014).
- Sepúlveda RP, Larrain SP, Quiroz EC, Rebufel A y Graña SF. 2005. Identificación e incidencia de virus en pimiento en la zona centro norte de Chile y su asociación con vectores. Agricultura Técnica 65:235-245.
- Tun-Azul JC, Santamaría BF y Avilés BWI. 2004. Efecto del sombreado sobre el comportamiento de Chile (*Capsicum annum* L.) en suelos pedregosos de Yucatán. Primera convención Mundial del Chile. Yucatán, México. p. 211-217.
- Vidales FJA y Alcantar RJJ. 1989. Ataque de la virosis durante la floración y su efecto sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.). Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, México. Resumen, p 67.

Caracterización Molecular y de Ensayos de Patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal de la Antracnosis del Limón en Texas

Molecular Characterization and Pathogenicity Assays of *Colletotrichum acutatum*, Causal Agent for Lime Anthracnose in Texas

Amy Ruiz, South Texas College, 400 N. Border, Weslaco, Texas 78596; Cynthia C. Parra, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA; John V. da Graça, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA; Bacilio Salas, USDAAPHIS-PPQ-CPHST, 22675 N Moorefield Rd, Edinburg, TX 78541; Nasir S. A. Malik, USDA-ARS, ERRC, 600 E Mermaid Lane, Wyndmoor, PA 19038; Madhurababu Kunta, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA. Correspondence: madhura.kunta@tamuk.edu

(Recibido: Junio 12, 2014 Aceptado: Noviembre 05, 2014)

Ruiz A, Parra CC, da Graça JV, Salas B, Malik NSA y Kunta M. 2014. Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 52-61.

Resumen. Varias muestras de fruto, hojas y ramas de limón mexicano [*Citrus aurantiifolia* (Christm). Swingle] afectadas con síntomas típicos de antracnosis del limón fueron recolectadas de tres árboles en zonas residenciales de Brownsville, Texas. El hongo causante de la antracnosis, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds fue aislado de las muestras de hoja y de fruto. La amplificación de la región de repetición del ADN ribosomal del núcleo usando primers ITS1 y ITS4 y intron 2 del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa usando GDF y GDR del ADN del hongo resultó en amplicones de aproximadamente 520 pb y 260 pb, respectivamente. La búsqueda de similitud entre las secuencias de nucleótidos obtenidos de los fragmentos de 520 pb y 260 pb con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mostró un grado de identidad del 99% con *C. acutatum* y del 100% con varias especies de *Colletotrichum*, respectivamente. Los aislamientos del hongo fueron confirmados como de *C. acutatum* por amplificación selectiva de un fragmento de PCR de unas 490 bp usando el primer especie específico *CaInt2* en combinación con el primer ITS4. El árbol filogenético que fue construido usando los datos de la secuencia del nucleótido ITS separó los aislados de postbloom fruit drop (PFD) y los colocó en el grupo de aislados de key lime anthracnose (KLA). Los ensayos de patogenicidad por inoculación de muestras de hojas, flor, y fruto mostraron que tanto el limón mexicano sin espinas como el limón mexicano común mostraron síntomas típicos

Abstract. Several distorted Mexican lime [*Citrus aurantiifolia* (Christm). Swingle] fruit, leaf, and twig samples with lime anthracnose symptoms were collected from three trees in residential areas of Brownsville, Texas. The causal fungal organism, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds was isolated from leaves and fruit. Amplification of nuclear ribosomal DNA repeat region using ITS1 and ITS4 primers and intron 2 of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene using GDF and GDR from fungal DNA resulted in approximately 520 bp and 260 bp amplicons, respectively. Similarity search for the nucleotide sequences obtained from 520 bp and 260 bp fragments at Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) program showed 99% identity to *C. acutatum* and 100% identity to several *Colletotrichum* species, respectively. The fungal isolates were further confirmed as *C. acutatum* by selective amplification of about 490 bp PCR fragment using species specific primer *CaInt2* in combination with primer ITS4. Phylogenetic tree constructed using ITS nucleotide sequence data separated the isolate from the postbloom fruit drop (PFD) isolates and placed it in the group of key lime anthracnose (KLA) isolates. Pathogenicity assays by inoculation of detached leaves, flowers, and fruit showed that thornless Mexican lime and common Mexican lime showed typical symptoms of KLA while inoculated detached leaves of Rio Red grapefruit, Valencia sweet orange, Bearss lime, pink Eureka lemon, Eustis limequat, Ponderosa lemon, kaffir lime, seedless Lisbon lemon, and Meyer lemon did not develop any lesions.

Additional keywords. Key lime, anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, citrus.

Mexican, West Indian, or Key lime [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] is an important crop primarily used for its flavor in food and beverages. It is native to the Indo-

de key lime anthracnose (KLA), mientras que hojas inoculadas del toronjo Rio Red, el Naranja dulce Valencia, el limón Bearss, el limón pink Eureka, el limequat Eustis, el limón Ponderosa, la lima kaffir, el limón sin semilla Lisbon, y el limón Meyer no desarrollaron ninguna lesión.

Palabras clave adicionales. Lima, antracnosis, *Colletotrichum acutatum*, cítricos.

El limón mexicano, de las Indias Occidentales o limón [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] es un cultivo importante que se utiliza principalmente por su sabor en bebidas y alimentos. Es nativo de la región Indomalaya (Morton, 1987) y las principales regiones productoras de este cultivo incluyen México, la India, las Indias Occidentales y los Cayos de Florida (2). En los EE.UU. el consumo de limones (persas, Tahití, Bearrs y mexicano) ha ido aumentando de manera constante y valor de las importaciones fue de alrededor de \$183 millones en 2012, en gran parte proveniente de México (Boriss y Huntrods, 2013).

La antracnosis del limón (KLA) causada por el hongo patógeno *Colletotrichum acutatum* Simmonds JH (*Gloeosporium limetticum* Clausen) (Teleomorfo: *Glomerella acutata* Guerber y JC Correll), es un problema devastador en el limón mexicano. Esta enfermedad se reportó por primera vez en California en 1912 (Clausen, 1912) y más tarde se encontró en Florida y las Indias occidentales (Antillas y Bahamas) (Fawcett, 1936; Knorr *et al.*, 1957). Knorr *et al.* (1957) descubrieron que la enfermedad sólo afecta al limón mexicano y al dominicano sin espinas y no afecta a otras variedades de limones como la Tahití (= Bearrs y persas). Además, de que para la patogénesis del *C. acutatum* en cítricos, es necesario un gen que codifique al regulador de la transcripción del pH putativo (You *et al.*, 2007).

El hongo es conocido por atacar a las hojas jóvenes, ramillas, frutos inmaduros y los botones (Burnett, 1972). Los botones florales infectados se tornan marrones y caen antes de abrir, los frutos jóvenes inmaduros infectados desarrollan lesiones que conducen a frutos deformes y caen antes de tiempo. Los frutos infectados en etapa tardía presentan lesiones grandes y hundidas además de reducción del tamaño del fruto (Knorr *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 2005). Esta enfermedad es un problema serio para la producción de limón mexicano en México, Florida y el área del Caribe (Fawcett, 1936). En Texas, la enfermedad se reportó en el verano de 1976 en arboles de limón mexicano que crecían en el Citrus Center de la Universidad de Texas A & I [ahora conocido como el Kingsville Citrus Center de la Universidad de Texas A&M (TAMU-KCC)] en Weslaco, causando graves destrozos en los nuevos brotes así como la caída prematura de flores y frutos jóvenes (Timmer, 1978).

La caída prematura de frutos post-floración (PFD) se reportó por primera vez en Belice en 1979 (Denham, 1979). Ahora se sabe que el *C. acutatum* JH Simmonds también causa la enfermedad PFD en naranjas dulces, limas y limones, con algunos brotes graves en Florida y Brasil. Sin embargo, es importante señalar que los aislamientos PFD

Maialayan region (Morton, 1987) and major producing regions of this crop include Mexico, India, West Indies and Florida Keys (2). In the US, consumption of limes (Persian, Tahiti, Bearrs, and Mexican) has been steadily increasing and import value was around \$183 million in 2012, largely from Mexico (Boriss and Huntrods, 2013).

Key lime anthracnose (KLA) caused by the fungal pathogen, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (*Gloeosporium limetticum* Clausen) (Teleomorph: *Glomerella acutata* Guerber & J.C. Correll), is a devastating problem in Mexican lime. The disease was first reported from California in 1912 (Clausen, 1912) and later it was found in Florida and West Indies (Fawcett, 1936; Knorr *et al.*, 1957). Knorr *et al.* (1957) found that the disease affects only Mexican limes and Dominican thornless lime and does not affect other limes such as Tahiti lime (=Bearrs and Persian). Additionally, gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is essential for *C. acutatum* pathogenesis on citrus (You *et al.*, 2007).

The fungus is known to attack young leaves, twigs, immature fruits, and blooms (Burnett, 1972). Infected flower buds turn brown and fall before opening, infected young immature fruit will develop lesions leading to misshapen fruits and drop prematurely. Late infected fruit show large and sunken canker lesions with fruit size reduction (Knorr *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 2005). This disease is a serious problem for Mexican lime production in Mexico, Florida, and the Caribbean area (Fawcett, 1936). In Texas, the disease was reported in summer 1976 on Mexican lime trees growing at Texas A&I University Citrus Center [now Texas A&M University Kingsville Citrus Center (TAMU-KCC)] in Weslaco, causing severe blight of new flush, premature dropping of flowers and young fruit (Timmer, 1978).

Postbloom fruit drop (PFD) was first reported in Belize in 1979 (Denham, 1979). *C. acutatum* J. H. Simmonds is also known to cause PFD disease in sweet oranges, limes, and lemons, with some severe outbreaks in Florida and Brazil. However, it is important to note that PFD isolates from affected citrus did not cause KLA while KLA isolates caused less PFD compared to PFD isolates from affected sweet orange (Agostini *et al.*, 1992). It was reported that PFD and KLA strains might have independently dispersed throughout Americas in association with each host (Peres *et al.*, 2008).

The disease is serious only when new flushes coincide with extended periods of rainfall. Frequent copper fungicide application during flushes can effectively control the disease (Timmer, 1978). Also, Benomyl (Benlate 50WP), was shown to be effective in controlling both KLA and PFD (Peres *et al.*, 2004) and benomyl and captafol to control PFD (Denham, 1979).

Mexican lime is grown only for ornamental purposes and for home use, but, at least at present time, it is not grown commercially in the Lower Rio Grande Valley (LRGV), thus KLA is not a direct threat to commercial citrus in LRGV. However, it is important to study the disease, identify and characterize the fungal pathogen as the trees infected by KLA can become source of pathogen spread to

de los cítricos afectados no causaron KLA, mientras que los aislamientos KLA causaron menos PFD en comparación con los aislamientos PFD de naranja dulce afectada (Agostini *et al.*, 1992). Se planteó que las cepas de PFD y del KLA podrían haberse dispersado de forma independiente a lo largo de América en asociación con cada hospedero (Peres *et al.*, 2008).

La enfermedad es grave únicamente cuando los nuevos brotes coinciden con períodos prolongados de lluvias. La aplicación frecuente de fungicidas de cobre durante la etapa de brotación puede controlar eficazmente la enfermedad (Timmer, 1978). Además, el benomilo (Benlate 50WP) ha demostrado ser eficaz en el control tanto de KLA como de PFD (Peres *et al.*, 2004) y el benomilo y captafol para controlar PFD (Denham, 1979).

El limón mexicano sólo se cultiva con fines ornamentales y de uso en el hogar, pero, al menos en la actualidad, no se cultiva comercialmente en el Valle Bajo del Río Grande (LRGV), así que el KLA no es una amenaza directa para los cítricos comerciales en LRGV. Sin embargo, es importante para estudiar la enfermedad, identificar y caracterizar el patógeno fúngico ya que los árboles infectados por KLA pueden convertirse en una fuente de propagación del patógeno hacia futuras nuevas áreas de producción de limón comercial.

Los principales objetivos de este estudio fueron identificar al *C. acutatum* causante del KLA en el limón mexicano de Texas, utilizando herramientas moleculares así como determinar la patogenicidad de los aislados *C. acutatum* en diferentes plantaciones de cítricos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Material vegetal y Aislamiento fúngico. Las hojas sintomáticas de KLA, ramillas y frutos fueron recolectados durante la última semana de septiembre de 2012 por personal del USDA APHIS y del TAMUKCC de tres árboles diferentes de limón mexicano en un área residencial de Brownsville- TX. Los tejidos afectados de hojas jóvenes y frutos inmaduros se limpiaron en agua corriente durante 10 min, se esterilizó la superficie con etanol al 70% durante 30 s, hipoclorito de sodio al 0.05% durante 1 min, y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (SDW). Pequeños trozos de tejido se colocaron en placas de agar de agua, y se incubaron a 26°C durante 48 h. Los bordes de crecimiento de hifas fúngicas emergentes a partir de piezas de tejido se transfirieron asépticamente a agar de papa dextrosa (PDA), se cultivaron a 26°C, y los cultivos de hongos fueron identificados por sus características y la morfología de sus conidios (Sutton, 1980).

Aislamiento del ADN y PCR. Se aisló el ADN total utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de cualquier tejido lesionado de las hojas o el fruto o directamente del micelio del hongo crecido durante tres días en Difco™ Papa Dextrosa Agar (PDA) a 26°C. El tejido fue colocado en un tubo de 2 ml con el lisado de la matriz A (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) con tampón de extracción y se pulverizó durante 3 min usando un Mini-BeadBeater-96 (Biospec Products Inc, Bartlesville, OK). El extracto de ADN total se eluyó en 100 µL de agua libre de nucleasa. Un

future new commercial lime production areas.

The main objectives of this study are to identify *C. acutatum* causing KLA in Texas Mexican lime using molecular tools and determine pathogenicity for the isolated *C. acutatum* on different citrus cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Fungal Isolation. KLA symptomatic leaves, twigs, and fruit were collected during last week of September, 2012 by USDA APHIS and TAMUKCC personnel from three different Mexican lime trees in the residential locations in Brownsville-TX. The affected tissues from young leaves and immature fruit were cleaned in running tap water for 10 min, surface sterilized in 70% ethanol for 30 s, 0.05% sodium hypochlorite for 1 min, and rinsed 3 times in sterile distilled water (SDW). Small tissue pieces were placed on water agar plates, and incubated at 26°C for 48 h. The growing edges of fungal hyphae emerging from tissue pieces were aseptically transferred to potato dextrose agar (PDA), grown at 26°C, and fungal cultures were identified by cultural characteristics and conidial morphology (Sutton, 1980).

DNA Isolation and PCR. Total DNA was isolated using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) from either lesion tissue on the leaves and fruit or directly from the fungal mycelium grown for three days on Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA) at 26°C. The tissue was placed in a 2 mL lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) with extraction buffer and pulverized for 3 min using a Mini-Beadbeater-96 (Biospec Products Inc, Bartlesville, OK). The extract of total DNA was eluted in 100 µL nuclease-free water. A total of 6 DNA extracts including 3 from infected tissue and 3 from fungal isolates were used in PCR and obtaining nucleotide sequence information. The nuclear ribosomal DNA repeat region and genes encoding portions of small and large subunit rRNA was amplified using ITS1 and ITS4 primers (White *et al.*, 1990). Intron 2 of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3PD*) gene was amplified using GDF and GDR primers (Guerber *et al.*, 2003). Species identification of *C. acutatum* was performed by selective amplification of part of ITS-5.8S rDNA region using specific primer *CaInt2* in combination with primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). The PCR amplification products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, ethidium-bromide stained, visualized under UV light, and photographed using Biospectrum imaging system (UVP, Upland, CA). Thin slices of agarose gel containing the amplicon DNA were cut; DNA was purified using Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and sequenced at MCLAB (MCLAB, San Francisco, CA). The nucleotide sequences were analyzed for similarities at National Center for Biotechnology Information's (NCBI) database using Blastn program and deposited into GenBank. The ITS nucleotide sequence together with published sequences in the GenBank were aligned with ClustalW using MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). The evolutionary history was inferred using Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980) and

total de 6 extractos de ADN, incluyendo 3 de tejido infectado y 3 de aislados fúngicos, se analizaron por PCR y se obtuvo la información de la secuencia de nucleótidos. La región de repetición del ADN ribosomal nuclear y los genes que codificaban porciones de la subunidad pequeña y grande del rRNA se amplificaron utilizando los primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). El intrón 2 del gen de la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (G3PD) se amplificó usando GDF y los primers GDR (Guerber *et al.*, 2003). La identificación de especies de *C. acutatum* se realizó mediante amplificación selectiva de una parte de la región del rDNA ITS-5.8S utilizando el primer específico *CaInt2* en combinación con el primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Los productos de amplificación de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, se visualizaron bajo luz UV y se fotografiaron usando el sistema de imágenes BioSpectrum (UVP, Upland, CA). Se cortaron rebanadas finas de gel de agarosa que contenían el amplicon de ADN; el ADN se purificó usando el Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), y se secuenció en MCLAB (MCLAB, San Francisco, CA). Se analizaron las secuencias de nucleótidos para encontrar similitudes en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI), utilizando el software Blastn y se depositaron en el GenBank. La secuencia de nucleótidos ITS junto con las secuencias publicadas en el GenBank fueron alineadas con ClustalW utilizando MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de "Neighbor-Joining" (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2-parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y el árbol filogenético se construyó usando el MEGA6. El árbol filogenético se evaluó con 1000 repeticiones de arranque para poner a prueba la estabilidad del clado.

Ensayos de patogenicidad. Se obtuvieron un total de 14 hojas inmaduras jóvenes por cada plantío de limón mexicano [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], toronja Río Red (*C. paradisi* Macfad.), naranja dulce Valencia (*C. sinensis* L. Osbeck), limón Bearss (*C. latifolia* Tanaka), limón rosa Eureka (*C. limon* L. Burm.f.), limequat Eustis [*C. floridana* (J. Ingram & H. Moore) Mabb.], limón Ponderosa (*C. limon* L. Burm.f.), lima kaffir (*C. hystrix*), limón Lisboa sin semillas (*C. limon* L. Burm.f.) y limón Meyer (*C. limon* L. Burm.f.). Se tuvo cuidado de reducir al mínimo los posibles daños físicos a las hojas mientras se realizaba la recolección. Los conidios de cultivos de hongos de 7-10 d de edad en placas de PDA se lavaron en 2 mL de SDW, se pasaron a través de tela de malla de queso, se diluyeron en SDW y la suspensión de esporas se ajustó a 10^6 conidios por mL. Se inocularon las hojas en papel filtro húmedo en cajas Petri mediante la colocación de 6 gotas de 20 μ L de suspensión de esporas con 3 gotas en cada lado de la nervadura de la hoja, y se incubaron a 26°C. Adicionalmente, se inocularon flores desprendidas de limonero mexicano sin espinas así como flores y fruto desprendidas de limonero mexicano común, usando 20 μ L de suspensión de esporas y se incubaron a 26°C. Las hojas, flores y frutos se observaron para buscar cualquier lesión

the phylogenetic tree was constructed using MEGA6. The phylogenetic tree was evaluated with 1000 bootstrap replicates to test the clade stability.

Pathogenicity Assays. A total of 14 young immature leaves per cultivar were collected from Mexican lime [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], Rio Red grapefruit (*C. paradisi* Macfad.), Valencia sweet orange (*C. sinensis* L. Osbeck), Bearss lime (*C. latifolia* Tanaka), pink Eureka lemon (*C. limon* L. Burm.f.), [*C. floridana* to (Limequat X Citrofortunella floridiana) (J. Ingram&H. Moore) Mabb.], Ponderosa lemon (*C. limon* L. Burm.f.), kaffir lime (*C. hystrix*), seedless Lisbon lemon (*C. limon* L. Burm.f.), and Meyer lemon ©. *X limon* L. Burm.f.). Care was taken to minimize physical damage to the leaves while collection. Conidia were washed into 2 mL SDW from 7-10 d old fungal cultures on PDA plates, passed through cheese cloth, diluted in SDW, and the spore suspension was adjusted to 10^6 conidia per mL. Leaves on moist filter paper in Petri dishes were inoculated by placing 6 droplets of 20 μ L spore suspension with 3 droplets on each side of the leaf midrib, and incubated at 26°C. Additionally, detached flowers of thornless Mexican lime and detached flowers and fruit of common Mexican lime were inoculated using 20 μ L spore suspension and incubated at 26°C. Leaves, flowers, and fruit were observed for any necrotic lesions 6 d post inoculations.

RESULTS

Typical KLA symptoms on Mexican lime. All three Mexican lime trees that were affected by KLA showed typical leaf symptoms of circular to oval brown spots, shot hole appearance in mature leaves where center of leaf spot fell out and twigs with severe blight, wilt, and die back (Figure 1 A-C). The flower buds were brown and often fall before opening leaving persistent calyxes (Figure 1 D-E) and fruit showed shallow necrotic lesions to large brown depressed cankers (Figure 1 F-G). Several infected immature fruits developed brown lesions, misshapen, and dropped prematurely.

PCR and DNA sequencing. PCR using GDF/GDR and ITS1/ITS4 primers on DNA extracts from either lesion tissue from KLA affected leaves and fruit or from the fungal mycelia resulted in amplification of approximately 260 bp and 520 bp fragments, respectively (Figure 2). Nucleotide sequences were obtained for the PCR fragments produced from amplification of fungal culture DNA extracts. Similarity searches for amplicons at Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) program showed 100% identity (E value $2e-132$) to several *Colletotrichum* species [*Colletotrichum* sp. NBL-2013 culture collection CMM:4093 (Accession: KC517164), CMM:4094 (KC517155), CMM:4096 (KC517190), CMM:4097 (KC517189)] and 99% identity (E value 0.0) to *C. acutatum*, respectively. For example, homology search for ITS based nucleotide sequence of 520 bp showed 99% homology to *Glomerella acutata* strain UCA1121 (GeneBank Accession: EF622192), *G. acutata* strain UCA1109 (Accession: EF622187), and *G. acutata* (Accession: FN566877, EU008878). Alignment of this sequence with nucleotide sequence available for *C. acutatum* (Type strain IMI117617,

necrótica 6 d después de las inoculaciones.

RESULTADOS

Síntomas típicos del KLA en limón mexicano. Los tres arboles de limón mexicano que fueron afectados por KLA, mostraron los síntomas foliares típicos como son las manchas marrones de circulares a ovaladas, apariencia de un agujero de disparo en las hojas maduras y ramillas con plaga severa, marchitamiento, y muerte (Figura 1 A-C). Los botones de las flores eran marrones y a menudo cayeron antes de abrir dejando cálices persistentes (Figura 1 D-E) y los frutos mostraron lesiones necróticas superficiales hasta grandes fisuras marrones (Figura 1 F-G). Varios frutos inmaduros infectados desarrollaron lesiones marrones, deformes, y cayeron prematuramente.

Accession: AF411700) (Hyde et al., 2009) using BLASTn Align sequences showed 99% identities. Nucleotide sequences were deposited in NCBI's GenBank database (accession numbers: KJ872586 and KJ872587). PCR amplification using *C. acutatum* species specific primer *CaInt2* and primer ITS4 resulted in amplification product of size 490 bp (Figure 3). The PFD isolates and KLA isolates formed distinct clades in the phylogenetic tree (Figure 4) and Texas KLA isolate occurred on the same clade with other KLA isolates that were used in the analysis. The KLA, PFD, and the isolate from blueberry (EU168904) grouped into three distinct clades while the isolate from *Rhododendron* spp. (AF411700) formed into a separate clade from the group of PFD isolates.

Fungal Isolates and Pathogenicity Studies. A total

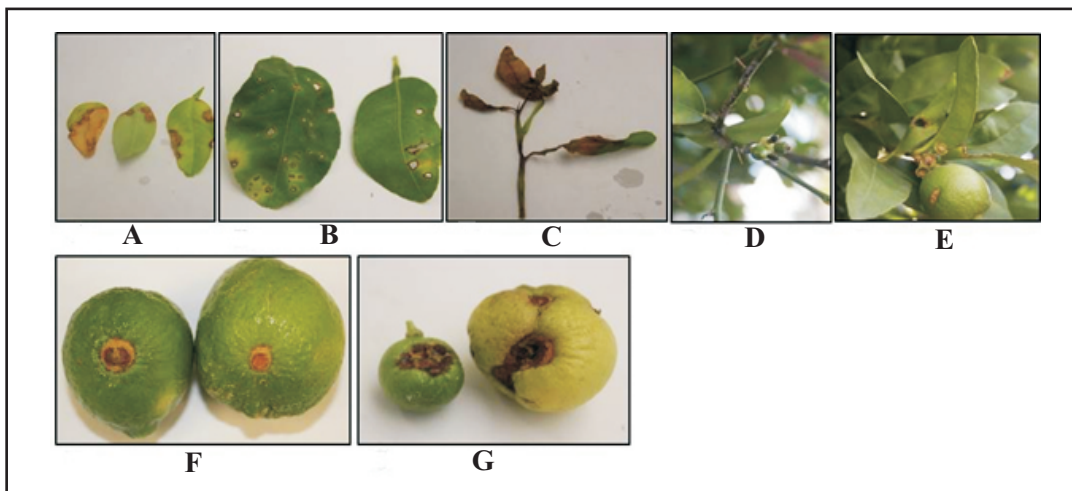


Figura 1. Síntomas de la enfermedad de la antracnosis del limón (KLA) en Texas. Hoja de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] que muestra necrosis (A), orificios en la hoja madura (B), tizón en las ramillas y muerte progresiva (C), capullos marrones (D), caída prematura de la fruta y cálices persistentes (E) y frutos que presentan lesiones necróticas superficiales (F), fruta deforme con grandes canales necróticos profundos y deprimidos (G).

Figure 1. Lime anthracnose (KLA) disease symptoms in Texas. Mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] leaf showing necrosis (A), shot holes on mature leaf (B), twig blight and dieback (C), brown flowerbuds (D), premature fruit drop and persistent calyxes (E), and fruit showing shallow necrotic spot lesions (F), misshapen fruit with large deep and depressed necrotic cankers (G).

PCR y secuenciación del ADN. Los estudios realizados por PCR usando los primers GDF/GDR y ITS1/ITS4 en extractos de ADN de cualquier tejido lesionado de hojas y frutos afectados por el KLA, o de los micelios fúngicos dieron como resultado la amplificación de fragmentos de aproximadamente 260 pb y 520 pb, respectivamente (Figura 2). Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron para los fragmentos de PCR producidos a partir de la amplificación de extractos de ADN del cultivo de hongos. Las búsquedas de similitudes para los amplicones con el software Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) mostro un 100% de identidad (valor de $E= 2e^{-132}$) con varias especies de *Colletotrichum* [*Colletotrichum* sp. NBL-2013 colección de cultivos CMM: 4093 (Acceso: KC517164), CMM: 4094 (KC517155), CMM: 4096 (KC517190), CMM: 4097 (KC517189)] y el 99% de identidad (valor de $E= 0.0$) a *C. acutatum*, respectivamente.

of 18 fungal isolates were obtained including 9 from each of tissue of KLA affected leaf and fruit samples. The fungal colonies were slow growing and conidia were ellipsoid and fusiform at one end. All the isolates were highly pathogenic only to thornless Mexican lime and common Mexican lime leaves, immature fruits, and flowers. Severe necrotic lesions were present at 6 d post inoculation (Figure 5 A-E). Inoculation of detached leaves of Rio Red grapefruit, Valencia sweet orange, Bearss lime, pink Eureka lemon, Eustis limequat, Ponderosa lemon, kaffir lime, seedless Lisbon lemon, and Meyer lemon did not show any necrotic lesions (Figure 5 F-N).

DISCUSSION

KLA disease in Texas caused by *Gloeosporium limeticolum* Clausen (Clausen, 1912) in Mexican lime was reported by Timmer (1978). The pathogen name was revised

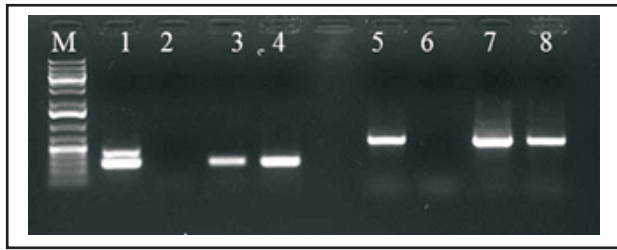


Figura 2. Gel de agarosa que muestra fragmentos de PCR producidos por la amplificación de aislado de KLA de los extractos de ADN de hongos utilizando los primers GDF/GDR (1, 3, 4) y ITS1/ITS4 (5, 7, 8). Control no templado (2 y 6). M = 1 kb más marcadores moleculares (Fermentas).

Figure 2. Agarose gel showing PCR fragments produced by amplification on KLA isolate fungal DNA extracts using GDF/GDR primers (1, 3, 4) and ITS1/ITS4 primers (5, 7, 8). Non-template control (2 and 6). M= 1 kb plus Molecular marker (Fermentas).

Por ejemplo, la búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos ITS de 520 pb mostró un 99% de homología con la *G. acutata* cepa UCA1109 (Acceso: EF622187), y *G. acutata* (Acceso: FN566877, EU008878). La alineación de esta secuencia con la secuencia de nucleótidos disponibles para *C. acutatum* (Tipo de cepa IMI117617, Acceso: AF411700) (Hyde *et al.*, 2009) utilizando secuencias BLASTn Align mostraron un 99% de identidad. Las secuencias de nucleótidos fueron depositados en la base de datos del GenBank NCBI (números de acceso: KJ872586 y KJ872587). La amplificación por PCR utilizando especies de *C. acutatum* con el primer específico *CaInt2* y el primer ITS4 dio como resultado un producto de amplificación de 490 pb (Figura 3). Los aislamientos del PFD y del KLA formaron clados distintos en el árbol filogenético (Figura 4) y el aislamiento del KLA de Texas apareció en el mismo clado con otros aislados de KLA que fueron utilizados en el análisis. El KLA, PFD, y el aislado de arándano (EU168904) se agruparon en tres clados diferentes mientras que el aislado de *Rhododendron* spp. (AF411700) se formó en un clado separado del grupo de aislamientos del PFD.

Aislados fúngicos y Estudios de patogenicidad. Se obtuvieron un total de 18 aislados fúngicos incluyendo 9 de cada uno de los tejidos de muestras afectadas por KLA tanto de hojas como de frutos. Las colonias de hongos fueron de lento crecimiento y los conidios fueron elipsoidales y fusiforme en un extremo. Todos los aislamientos fueron altamente patógenos únicamente en las hojas, frutos inmaduros y flores del limonero mexicano sin espinas y del limonero mexicano común. Las lesiones necróticas graves se presentaron 6 días después de la inoculación (Figura 5 A-E). La inoculación de hojas desprendidas de toronja Río Red, naranja dulce Valencia, limón Bearss, limón rosa Eureka, limequat Eustis, limón Ponderosa, lima kaffir, sin semillas Lisboa limón y limón Meyer no mostró lesiones necróticas (Figura 5 F-N).

DISCUSIÓN

La enfermedad KLA en Texas causada por

as *C. gleosporioides* and later as *C. acutatum* based on molecular characterization of ITS region (Brown *et al.*, 1996). Our study confirms that *C. acutatum* is the causal agent of KLA in Mexican lime trees. Conclusion was based on rDNA repeat region (including internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2 and the gene encoding 5.8S rRNA) and *G3PD* gene nucleotide sequence, species specific amplification product of 490 bp using primers *CaInt2* and ITS4, and pathogenicity assays on different citrus cultivars including Mexican lime. Using ITS region of rDNA sequence information, species of *Colletotrichum* isolates from strawberry and citrus were determined (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996). This region of sequences and *G3PD* sequence data was also used to differentiate KLA and PDF isolates and to confirm that KLA and PDF diseases are caused by *C. acutatum* KLA and PDF strains that have distinct phylogenetic lineage (Peres *et al.*, 2008). Although it is difficult to differentiate PFD and KLA isolates based on morphological characters, they are genetically distinct (Brown *et al.*, 1996). Species identification of *C. acutatum* can be performed by selective amplification of part of ITS-5.8S rDNA region using specific primer *CaTnt2* in combination with primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). However, it is important to note that in recent years, the taxonomy of *C. acutatum* has been extensively revised due to sequencing studies of different genes that has allowed the description of new species in the collection of isolates that were formerly identified as *C. acutatum* (Shivas and Tan, 2009).

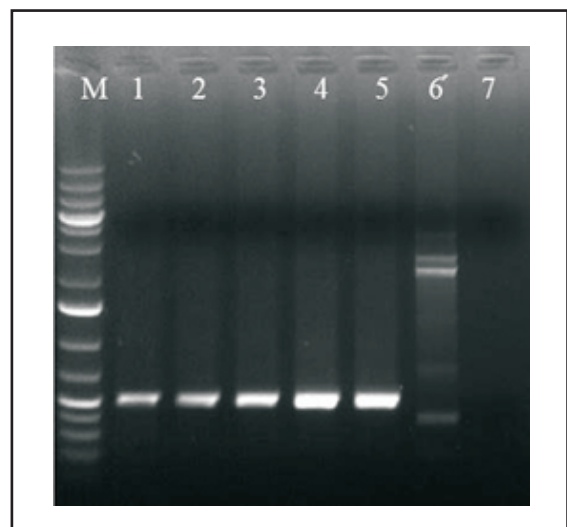


Figura 3. Identificación de aislados de KLA de Texas utilizando primers específicos *CaInt2* y ITS4 para *Colletotrichum acutatum*. Las bandas 1-5 son los aislados de KLA, la banda 6 de ADN de *Fusarium solani*, banda 7 de control no platilla y M = 1 kb más marcadores moleculares (Fermentas).

Figure 3. Identification of KLA isolates from Texas using species specific primers *CaInt2* and ITS4 for *Colletotrichum acutatum*. Lanes 1-5 KLA isolates, lane 6 *Fusarium solani*, lane 7 non template control DNA and M= 1kb plus Molecular marker (Fermentas).

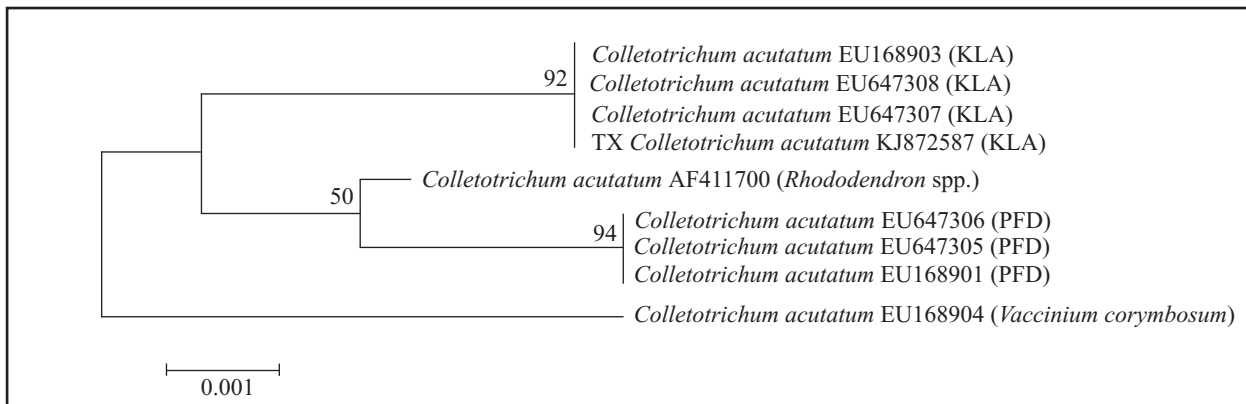


Figura 4. Árbol filogenético (método de agrupamiento- de- vecinos) derivado de las secuencias de ITS1, 5.8S rRNA, y del ITS2 de aislado de antracnosis del limón (KLA) proveniente de Texas (número de acceso: KJ872587) y secuencias publicadas en el GenBank. Porcentaje de árboles replicados en el que los taxones se agruparon todos juntos en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura y el árbol filogenético fue construido usando MEGA6. Los aislamientos de KLA y de la caída prematura de los frutos (PFD) son de cítricos y de *Colletotrichum acutatum* Acceso: EU168904, AF411700 y fueron aislados de arándano y *Rhododendron* spp, respectivamente.

Figure 4. The phylogenetic tree (Neighbor-Joining method) derived from the ITS1, 5.8S rRNA, and ITS2 sequences of Texas key lime anthracnose (KLA) isolate (Accession number: KJ872587) and published sequences in the GenBank. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and the phylogenetic tree was constructed using MEGA6. KLA and postbloom fruit drop (PFD) isolates are from citrus and *Colletotrichum acutatum* Accession: EU168904, AF411700 are isolates from blueberry and *Rhododendron* spp., respectively.

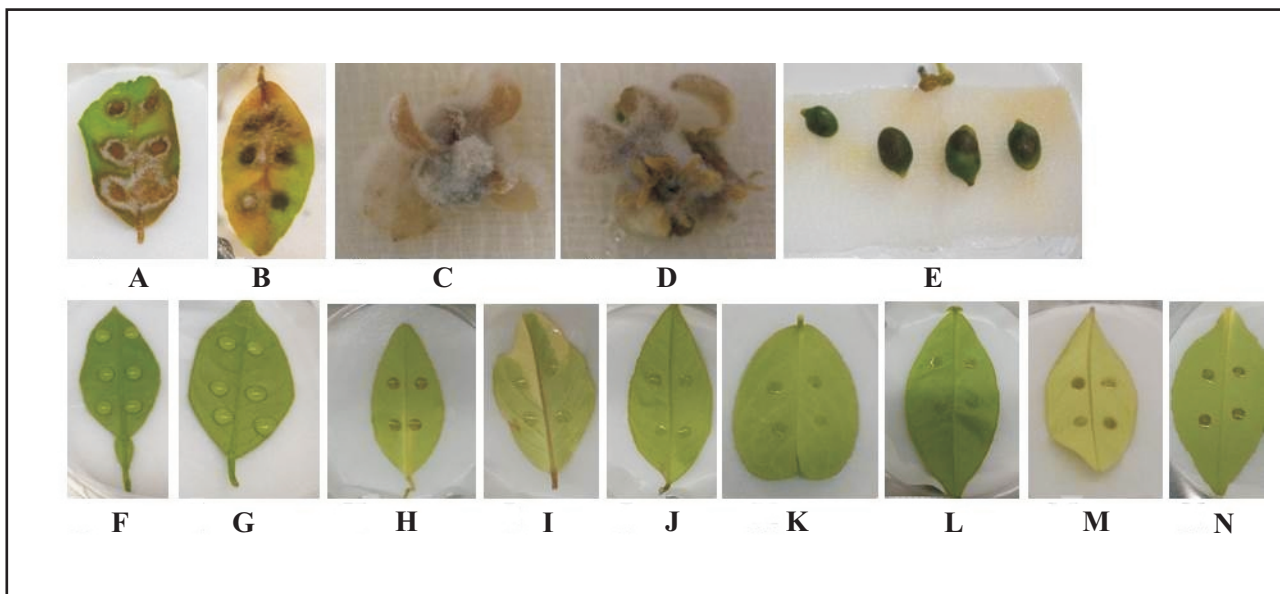


Figura 5. Pruebas de patogenicidad en diferentes cultivos de cítricos. Las hojas caídas, flor y frutos fueron inoculados con aislado de *Colletotrichum acutatum* el cual fue obtenido de tejido afectado por antracnosis de la keylime y fotografiados 6 d después de la inoculación. Hoja del limón mexicano sin espina (A) y la flor (C), hoja de limón mexicano común (B), flor (D) y frutos inmaduros (E) y hojas de toronja Río Red (F), naranja dulce Valencia (G), limón Bearss (H), limón rosa Eureka (I), limequat Eustis (J), limón Ponderosa (K), limón kaffir (L), limón sin semillas Lisboa (M), y limón Meyer (N).

Figure 5. Pathogenicity tests on different citrus cultivars. Detached leaf, flower, and fruit were inoculated with *Colletotrichum acutatum* isolate obtained from Key lime anthracnose affected tissue and photographed 6 d after inoculation. Thornless Mexican lime leaf (A) and flower (C), Common Mexican lime leaf (B), flower (D), and immature fruit (E) and leaves of Rio Red grapefruit (F), Valencia sweet orange (G), Bearss lime (H), pink Eureka lemon (I), Eustis limequat (J), Ponderosa lemon (K), kaffir lime (L), seedless Lisbon lemon (M), and Meyer lemon (N).

Gloeosporium limetticum Clausen (Clausen, 1912) en limón mexicano fue reportada por Timmer (1978). El nombre del patógeno fue modificado a *C. gleosporioides* y más tarde como *C. acutatum* basados en la caracterización molecular de la región ITS (Brown *et al.*, 1996). Nuestro estudio confirma que el *C. acutatum* es el agente causal del KLA en arboles de limón mexicano. Esta conclusión fue basada en la repetición de la región del rDNA (incluyendo espaciadores internos transcritos (ITS) 1 y 2 y el gen que codifica 5.8S rRNA) y de la secuencia de nucleótidos del gen *G3PD*, el producto de amplificación específica de especies de 490 pb utilizando primers *CaInt2* e ITS4, y los ensayos de patogenicidad en diferentes cítricos incluyendo el limón mexicano. Utilizando la región ITS de la secuencia del ADNr, se determinaron las especies de *Colletotrichum* aislados de fresa y cítricos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996). Esta región de secuencias y los datos de la secuencia *G3PD* también se utilizaron para diferenciar los aislados de KLA y PFD y para confirmar que las enfermedades KLA y PFD son causados por *C. acutatum*, así como las cepas de KLA y PFD que tienen linaje filogenético distinto (Peres *et al.*, 2008). Aunque es difícil de diferenciar los aislados de PFD y KLA basándose únicamente en caracteres morfológicos, ellos son genéticamente muy distintos (Brown *et al.*, 1996). La identificación de especies de *C. acutatum* se puede realizar por amplificación selectiva de una parte de la región ITS-5.8S del ADNr utilizando *CaTnt2* como primer específico en combinación con el primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante recalcar que en los últimos años, la taxonomía del *C. acutatum* ha sido extensamente revisada debido a estudios de secuenciación de diferentes genes que han permitido la descripción de nuevas especies en la colección de aislados que anteriormente fueron identificados como *C. acutatum* (Shiva and Tan, 2009).

Las pruebas de patogenicidad en hojas, frutas y flores revelaron que los hongos aislados obtenidos en este estudio fueron sólo patógenos para el limón mexicano con espinas y el limón mexicano común, mientras que ninguno de los inoculados de *C. acutatum* tiro las hojas de otras variedades pero desarrollaron lesiones necróticas. Esto confirmó los resultados de los reportes anteriores de que únicamente los aislamientos de KLA causan la enfermedad KLA en el follaje de los limoneros mexicanos (Brown *et al.*, 1996). Se encuentra reportado también que los aislados de KLA causaron necrosis a aproximadamente 30 al 60% del área foliar de las hojas inoculadas de lima mientras que los aislamientos de PFD no formaron lesiones necróticas en las hojas inoculadas de lima (Peres *et al.*, 2008). Por otra parte, las flores de naranjo dulce inoculadas con aislamientos de KLA, presentaron síntomas de PFD (Agostini *et al.*, 1992; Timmer *et al.*, 1994). Un estudio reciente utilizando aislamientos de *C. acutatum* de antracnosa reporta haber afectado a la fresa, al helecho y al limón mexicano; mientras que “ripe-rot” afecto al arándano y el PFD afecto a la naranja dulce demostrando que es poco probable que una cepa patógena de un host se traslade a otro host y provoque una epidemia (MacKenzie *et al.*, 2009).

Pathogenicity tests on leaves, fruit, and flowers revealed that the fungal isolates obtained in this study were pathogenic only to thornless Mexican lime and common Mexican lime while none of *C. acutatum* inoculated detached leaves of other cultivars developed necrotic lesions. It confirms the results of previous reports that only KLA isolates cause KLA disease on Mexican lime foliage (Brown *et al.*, 1996). It was reported that KLA isolates caused necrosis of about 30 to 60% leaf area of Key lime leaves inoculated while PFD isolates produced no necrotic lesions on inoculated Key lime leaves (Peres *et al.*, 2008). Moreover, sweet orange flowers inoculated with KLA isolates produced PFD symptoms (Agostini *et al.*, 1992; Timmer *et al.*, 1994). A recent study using *C. acutatum* isolates from anthracnose affected strawberry, leatherleaf fern, and Mexican lime; ripe-rot affected blueberry, and PFD affected sweet orange showed that it is unlikely that a pathogenic strain from one host would move to another host and result in an epidemic (MacKenzie *et al.*, 2009).

Our pathogenicity tests confirmed earlier reports by Knorr *et al.* (1957) that Bearss lime is resistant to KLA. These results are very important for Mexican lime producers as they largely export Bearss lime and Mexican lime fresh fruit and lime oil to the US market. Recent drop in lime production in Mexico due to severe weather and devastating diseases such as Huanglongbing resulted in lime crisis and drastic price increase in the US. This is the first study that report nucleotide sequence data for *C. acutatum* causing KLA in Mexican lime in Texas and pathogenicity tests for isolated *C. acutatum* on different citrus cultivars to confirm the identity of pathotype.

CONCLUSIONS

The causal agent for KLA disease in Texas was confirmed to be *C. acutatum* based on fungal morphology, nucleotide sequence data, and pathogenicity tests. This fungus was earlier reported as *Gloeosporium limetticum* Clausen (Timmer, 1978). Pathogenicity tests on different citrus cultivars showed that *C. acutatum* is only pathogenic to thornless Mexican lime and common Mexican limes while other citrus cultivars are resistant to this pathogen. Different plant parts of thornless Mexican lime and common Mexican lime including flowers, fruit, and leaves were highly susceptible to *C. acutatum* infection.

Acknowledgements. The authors sincerely thank Dr. Juan C. Melgar, Ms. Beatriz Contreras, and Mrs. Hilda S. del Rio for translation of abstract text from English to Spanish.

LITERATURA CITADA

- Agostini JP, Timmer LW, and Michell DJ. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gleosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1377-1382.
- Boriss H and Huntrods D. 2013. Citrus profile. Agricultural marketing resource center. http://www.agmrc.org/commodities_products/fruits/citrus/citrus-profile/ (consulted, May 2014).

Las pruebas de patogenicidad confirmaron los reportes anteriores de Knorr *et al.* (1957), quienes mencionan que el limón Bearss es resistente a KLA. Estos resultados son muy importantes para los productores de limón mexicano, ya que ellos son los que exportan en gran parte el limón Bearss, limón mexicano y aceite de limón para el mercado estadounidense. La reciente caída en la producción de limón en México debido a condiciones meteorológicas adversas y enfermedades devastadoras como el Huanglongbing, dieron como resultado una fuerte crisis de limón y un drástico aumento del precio en los EE.UU. Este es el primer estudio que reporta datos de la secuencia de nucleótidos de *C. acutatum* causante del KLA en limón mexicano en Texas así como pruebas de patogenicidad para aislados de *C. acutatum* en diferentes cultivos de cítricos para confirmar la identidad del patotipo.

CONCLUSIONES

El agente causal de la enfermedad de KLA en Texas se confirmó ser el *C. acutatum* de acuerdo a la morfología de los hongos, datos de la secuencia de nucleótidos y pruebas de patogenicidad. Este hongo se había reportado anteriormente como *Gloeosporium limetticolum* Clausen (Timmer, 1978). Las pruebas de patogenicidad en diferentes cultivos de cítricos mostraron que el *C. acutatum* únicamente es patógeno para el limón mexicano sin espinas y el limonero mexicano común, mientras que otros cultivos de cítricos son resistentes a este patógeno. Diferentes partes de la planta del limón mexicano sin espinas y del limón mexicano común, incluidas las flores, frutos y las hojas fueron muy susceptibles a la infección por *C. acutatum*.

Agradecimientos. Los autores agradecen sinceramente al Dr. Juan C. Melgar, Sra. Beatriz Contreras y a la Sra. Hilda S. del Río por la traducción del resumen del Inglés al Español.

- Brown AE, Sreenivasaprasad S, and Timmer LW. 1996. Molecular characterization of slow-growing range and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.
- Burnett HC. 1972. Lime anthracnose. Fla. dept. of agr. and cons. Serv. Plant Pathology. Circular no. 116.
- Chen HQ, Dekkers KL, Rollins JA, Ko NJ, Timmer LW, and Chung KR. 2005. A gene with domains related to transcription regulation is required for pathogenicity in *Colletotrichum acutatum* causing key lime anthracnose. *Mol. Plant Pathology*. 6:513-525.
- Clausen RE. 1912. A new fungus concerned in withertip of varieties of *Citrus medica*. *Phytopathology* 2:217-236.
- Denham TG. 1979. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. *PANS* 25:30-36.
- Fawcett HS. 1936. Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Book.co., New York. 656p.
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymon M, and Shabi E. 2000. Molecular analysis of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608-614.
- Guerber JC, Liu B, and Correl JC. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mt DNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872-895.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PE, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liw ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, and Zang JZ. 2009. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Knorr LC, Suit RF, and Ducharme EP. 1957. Handbook of citrus diseases in Florida. Univ. Fla. Agr. Exp. Sta. Bull. 587:77-79.
- MacKenzie SJ, Peres NA, Barquero MP, Arauz LF, and Timmer LW. 2009. Host range relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. *Phytopathology* 99:620-631.
- Morton JF. 1987. Fruits of warm climates. Creative Resource Systems, Inc. Winterville, N.C., USA. 168-172p.
- Peres NAR, Souza NL, Peever TL, and Timmer LW. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gleosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88:125-130.
- Peres NA, MacKenzie SJ, Peever TL, and Timmer LW. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98:345-352.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Shivas RG, Tan YP. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondii* sp. Nov. *Fungal Diversity* 39:111-122.
- Sreenivasaprasad S, Mills PR, and Brown AE. 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer I enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.* 98:186-188.
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE, and Mills PR. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*. 45:650-655.
- Sutton, BC. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 695pp.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Timmer LW. 1978. Identification of lime anthracnose in Texas. *J. Rio Grande Hort. Soc.* 32:35-38.
- Timmer LW, Roberts PD, Chung KR, and Bhatia A. 1994. Postbloom fruit drop. Document SP 165. Fla. Coop. exten. Ser., University of Fla.

White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A.

You B-J, Choquer M, and Chung K-R. 2007. The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus. Mol. Plant Microbe Interactions 20:1149-1160.

Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de *Fusarium*

Colonization of *Trichoderma* and *Bacillus* in Seedlings of *Agave tequilana* Weber, var. Azul and the Effect on the Plant Physiology and *Fusarium* Density

Bertha Tlapal Bolaños, Héctor González Hernández, Emma Zavaleta Mejía, Prometeo Sánchez García, Gustavo Mora Aguilera, Cristian Nava Díaz, Postgrado Fitopatología, Entomología y Nutrición Vegetal. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. De México, CP 56230, México; José Ignacio Del Real Laborde, Ramón Rubio Cortes, Área de Investigación de Tequila Sauza S.A. de C.V., “Rancho El Indio”, Tequila, Jalisco, México. Correspondencia: cnav@colpos.mx, navadias57@prodigy.net.mx

(Recibido: Agosto 16, 2013 Aceptado: Diciembre 11, 2014)

Tlapal Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI y Rubio Cortes R. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 62-74.

Resumen. Un problema fitosanitario en agave (*Agave tequilana* var. Azul) es la marchitez, provocado por varios organismos en plantaciones de dos años de edad después de trasplante. Entre los patógenos se reportan varias especies de *Fusarium* spp. y *Thielaviopsis paradoxa*. Se planteó el presente trabajo con el objetivo de introducir organismos benéficos en plantas de micropropagación como manejo preventivo en vivero. Los tratamientos fueron T1 *Trichoderma harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *Bacillus subtilis* (Bs), T5 Tv + Bs, T6 Ta + Bs, T7 testigo absoluto (Tabs) y T8 testigo regional (Treg). Se estableció un diseño en bloques al azar con dos repeticiones, la unidad experimental (UE) consistió de 122 plántulas; el tamaño mínimo de muestra comprendió 26. Las variables evaluadas fueron altura de planta, unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y raíz, determinación de clorofila, y área bajo la curva (ABC); los muestreos fueron seis con intervalo de 30 días de octubre 2008 a mayo 2009. Los resultados indican que los tratamientos T1, T3, T4 y T6, son los que presentaron mayor capacidad de establecimiento, generando un ambiente de equilibrio con densidades de *Fusarium* spp. en sustrato y raíz que oscilaron de 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹); el ANAVA para ABC de *Fusarium* spp. no reportó diferencias estadísticas, sin embargo fue menor que la de los antagonistas en suelo T8 Treg con nivel de 120 y T7 Tabs 75.75, el resto osciló por debajo de 50;

Abstract. One of the most important phytosanitary problems in two-year plantations of *Agave tequilana* var. Azul is agave wilt, that is caused by several organisms, among those pathogens are reported several species of *Fusarium* and *Thielaviopsis paradoxa*. The main goal of this research was to introduce beneficial organisms in micropropagation plants as control measure. Inoculated treatments were T1 *Trichoderma harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *Bacillus subtilis* (Bs), T5 Tv + B, Ta + B T6, T7 absolute control (Tabs) and T8 regional control (Treg). Treatments were established in a randomized block design with two replications, the experimental unit (EU) consisted of 122 plants; the minimum sample size was 26 plants. Evaluated variables were colony forming units (CFU) of *Trichoderma*, *Fusarium* spp. and *Bacillus* from roots and substrate and plant height, chlorophyll from plants. Variables were evaluated every 30 days from October 2008 to May 2009. Area under curve (AUC) was calculated for each variable. Our results show that microorganism in the treatments T1, T3, T4 and T6 colonized agave roots and maintain high levels, creating a balance to *Fusarium* spp. in soil and roots. Under these conditions *Fusarium* density ranged from 2 to 2.5 log (CFU/mL⁻¹). Analysis of variance did not detect any significant difference among treatments. However, *Fusarium* spp. density on soil (AUC) was higher in treatments T8 Treg (120) and T7 Tabs (75.75) compared with the rest of treatments (50 or less). *Fusarium* density on roots was higher on treatments T6 Ta + B (375) and T7 Treg (262.5) compared to T3 Ta (105), T5 Tv + B (187.5), and T1 T4 Th B (210). No significant differences were found on chlorophylls and plant heights.

Keywords: balance, density, *Trichoderma*, *Fusarium*,

en raíces el nivel alto fue T6 Ta+Bs 375, T7 Treg 262.5 y los valores menores se encontraron en T3 Ta 105, T5 Tv+Bs 187.5, T4 Bs 187.5 y T1 Th 210. No se observaron diferencias estadísticas en clorofilas y alturas.

Palabras clave: equilibrio, densidad, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Bacillus*.

El tequila ha adquirido importancia por la demanda creciente nacional e internacional, siendo la actividad de campo un componente importante y decisivo para el abastecimiento de la materia prima, el agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul para la producción de tan importante bebida (Pérez y Del Real, 2007). Las plantaciones de agave tequilero dentro de la zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT) integran un inventario de 253,033,239 plantas sembradas (CRT, 2010). La industria del tequila ha crecido en forma sostenida durante los últimos años y su potencial de crecimiento es aún grande, por lo que se requiere de un abasto sostenido y predecible de materia prima para asegurar su producción (Byerly, 2007).

La Norma Oficial Mexicana para la producción de tequila NOM-006-SCFI- 2005, especifica la variedad azul de *Agave tequilana* como la única autorizada para elaborar tequila, lo que implica que los métodos de propagación deben cumplir el requisito, por lo que se desecha la reproducción sexual que traería variación genética o segregación entre las plantas hijas. La reproducción asexual se da a través de la propagación vegetativa; los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción constituyen un clon y estos clones, a excepción de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre. Para la propagación de *A. tequilana* Weber, var. Azul, existen los siguientes métodos de multiplicación asexual: bulbillos, rizomas (hijuelos) y micropropagación. Este último método tiene la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos durante todo el año. La propagación *in vitro* permite controlar la condición sanitaria de las plantas a lo largo de su producción y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola (Vicente y Del Real, 2007).

El mejoramiento de la condición sanitaria y proliferación de raíces en muchas plantas de vivero se ve fortalecida con el uso de organismos como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997) en diversos cultivos hortícolas, ornamentales y forestales; en los cuales se ha observado el desarrollado de múltiples mecanismos que reportan incremento en resistencia a enfermedades, crecimiento y productividad de las plantas, así como tolerancia al estrés provocado por diversas situaciones en los cultivos (Hartman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Lorito *et al.*, 2010). En el cultivo del agave *Agave tequilana* weber var. Azul. se reportan varios problemas fitosanitarios, uno de los cuales es la marchitez, síntoma que puede ser provocado por varios organismos y el Consejo Regulador del Tequila (CRT) le atribuye incidencias elevadas en plantaciones que superan los dos

Bacillus.

Tequila has acquired importance as a result of the growing national and international demand, with field activity being an important and decisive component for the supply of the raw material, the tequila agave *Agave tequilana* Weber var. Azul for the production of this important beverage (Pérez and Del Real, 2007). The tequila agave plantations within the zone of Denomination of Origin of Tequila (DOT) integrate an inventory of 253,033,239 sown plants (CRT, 2010). The tequila industry has grown sustainedly during recent years and its growth potential is even higher, therefore it requires a sustained and predictable supply of raw material to insure its production (Byerly, 2007).

The Official Mexican Norm for tequila production NOM-066-SCFI-2005 specifies the blue variety of *Agave tequilana* as the only one authorized for making tequila, which implies that the propagation method should comply with the requirement. Therefore, sexual reproduction is discarded, which would result in genetic variation or segregation among the daughter plants. Asexual reproduction takes place through vegetative propagation; the individuals obtained through this type of reproduction constitute a clone, and these clones, except for natural mutations, are genetically identical to the mother plant. For the propagation of *A. tequilana* Weber, var. Azul, the following methods of asexual multiplication exist: bulbs, rhizomes (offspring) and micro-propagation. The latter method has the advantage of producing large quantities of plants in relatively small spaces throughout the year. *In vitro* propagation makes it possible to control the sanitary condition of the plants throughout their production and constitute groups of plants of the same age for their agricultural management (Vicente and Del Real, 2007).

The improvement of the sanitary condition and root proliferation in many nursery plants is strengthened with the use of organisms such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997) in diverse horticultural, ornamental and forest crops. With this technique the development of multiple mechanisms has been observed, which increment resistance to diseases, growth and productivity of the plants, as well as tolerance to stress provoked by diverse situations in the crops (Hartman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Lorito *et al.*, 2010). In the crop of agave *Agave tequilana* Weber var. Azul several phytosanitary problems are reported, one of which is wilting, a symptom which can be caused by various organisms. The Tequila Regulating Council (TRC) documents high incidence of this problem in plants of more than two years after transplant (CRT, 2010). The wilting which appears in any crop is due to tissue dehydration, which occurs because of reduction, death or destruction of the root system, or from destruction or blockage of vascular bundles (CRT, 2005). Various investigators such as Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) and Fucikovsky-Zak (2001), among others, reported as agents causing this symptom *Fusarium oxysporum* and *Thielaviopsis paradoxa*. In 2007 Cuevas and Domínguez reported that the species complex of *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*,

años de edad después del trasplante (CRT, 2010).). La marchitez que se presenta en cualquier cultivo se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (CRT, 2005). Múltiples investigadores como Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovskyy-Zak (2001), entre otros reportaron como agentes causantes de este síntoma a *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa*. En 2007 Cuevas y Domínguez, reportaron que el complejo de especies *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, podría ser el causante de la marchitez del cultivo. También, el mismo síntoma puede ser ocasionado por insectos que se alimentan del agave y su acción puede provocar heridas aprovechadas por los patógenos para acceder a la planta (CRT, 2005); entre estos esta la gallina ciega, que al alimentarse de la raíz, hace que la planta tenga menos área para absorber agua y nutrientes, a la vez que provoca heridas que son una fuente de entrada potencial para patógenos de la raíz, como *Fusarium* spp. Otro insecto que puede ocasionar marchitez es el gusano blanco del maguey, ya que al barrenar la piña, afecta diversas zonas del tallo, incluyendo haces vasculares, y aunque tal vez no haya invasión de microorganismos, si puede observarse encarrujamiento de hojas, así como una detención del crecimiento. Cuando una planta esta estresada por algún otro factor (manejo, nutrición, herbicidas o enfermedad), es fácilmente atacada por el picudo, el cual además de alimentarse dentro de la planta, también puede provocar marchitez, pudrición y muerte de la misma (CRT, 2005).

Como parte de un manejo integrado del cultivo, se planteó el presente trabajo con el objetivo de adicionar organismos benéficos que se establezcan en el sustrato y raíces de plantas de micropropagación durante la etapa previa al establecimiento en campo. Lo anterior bajo la hipótesis de que los organismos antagonistas presentan beneficios fisiológicos en plántulas que reducen el estrés causado por factores abióticos y patógenos como *Fusarium* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El experimento de vivero fue establecido en el “Rancho El Indio” de la empresa Sauza S.A. de C.V. en la localidad de Tequila, Jalisco.

Plántulas. Las plántulas de micropropagación usadas en el experimento fueron de cuatro hojas y una altura de 10cm, con una edad de doce meses.

Tratamientos. Los tratamientos considerados fueron tres cepas nativas de la región productora de agave de Jalisco, las cuales fueron obtenidas de investigaciones previas realizadas por Cuevas y Domínguez (2007), y Carballo y Díaz (2008). Las especies corresponden a *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*, que fueron identificadas morfológica y molecularmente en los trabajos citados; una cepa comercial de *Bacillus subtilis* (Serenade®), las mezclas de *T. virens* + *B. subtilis*, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; y los testigos absoluto y comercial (Cuadro 1).

F. solani and *F. verticillioides* could be the cause of crop wilting. Furthermore, the same symptom can be caused by insects that feed on the agave and their action can cause lesions used by the pathogens to accede to the plant (CRT, 2005). These include white grub, which feeds on the root, thus reducing the area of the plant for absorbing water and nutrients, and provoking lesions which are a potential entrance point for root pathogens, such as *Fusarium* spp. Another insect that can cause wilting is the white maguey worm, given that as it bores into the center of the plant, affecting diverse zones of the stem, including vascular fascia. Although perhaps there is no invasion of microorganisms, leaf curling can be observed, as well as growth retardation. When the plant is stressed by some other factor (management, nutrition, herbicides or disease), it is easily attacked by the weevil, which besides feeding within the plant, can also provoke wilting, rotting and plant death (CRT, 2005).

As part of an integrated crop management, the present work was carried out with the objective of adding beneficial organisms which are established in the substrate and roots of micro-propagation plants during the stage prior to establishment in the field. The above is based on the hypothesis that the antagonistic organisms present physiological benefits in shoots that reduce stress caused by abiotic factors and pathogens such as *Fusarium* spp.

MATERIALS AND METHODS

Location. The nursery experiment was established in “Rancho del Indio” of the firm Sauza S.A. de C.V. in the locality of Tequila, Jalisco.

Shoots. The micro-propagation shoots used in the experiment were of four leaves with a height of 10 cm, and an age of twelve months.

Treatments. The treatments considered were three native strains of the agave production region of Jalisco, which were obtained from previous investigations made by Cuevas and Domínguez (2007), and Carballo and Díaz (2008). The species correspond to *Trichoderma harzianum*, *T. virens* and *T. aureoviride*, which were morphologically

Cuadro 1. Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de vivero sobre plantas de micropropagación, establecida en el “Rancho El Indio”, en Tequila Jalisco, México.

Table 1. Treatments considered within the nursery experimental phase on micro-propagation plants, established in the “Rancho El Indio”, in Tequila, Jalisco, Mexico.

Tratamientos	
T1	Sustrato enriquecido con <i>Trichoderma harzianum</i> (Th)
T2	Sustrato enriquecido con <i>T. virens</i> (Tv)
T3	Sustrato enriquecido con <i>T. aureoviride</i> (Ta)
T4	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®) (Bs)
T5	<i>T. virens</i> + <i>B. subtilis</i> (Tv + Bs)
T6	<i>T. aureoviride</i> + <i>B. subtilis</i> (Ta + Bs)
T7	Sustrato sin enriquecimiento (testigo absoluto) (Tabs)
T8	Sustrato comercial + fungicida (Testigo regional) (Treg)

Los tratamientos correspondientes a las tres especies de *Trichoderma* fueron adicionadas en medio líquido papa dextrosa (papa 200g; dextrosa 11g; agua destilada 1000mL) a una concentración de 1×10^4 UFC mL⁻¹, y 10mL por plántula al cuello de la misma. *Bacillus subtilis* cepa QST 713 se agregó en la dosis comercial de 1g L⁻¹ de agua del producto comercial Serenade® que reportó en la etiqueta una concentración de 8×10^9 UFC g⁻¹, la aplicación fue similar a *Trichoderma* spp. así como el volumen por plántula. El experimento se estableció en octubre de 2008 y se hicieron cuatro aplicaciones de los tratamientos cada 30 d. Se realizaron seis muestreos de diciembre de 2008 a mayo de 2009 a intervalos de 30 d. En los testigos regional y absoluto no se adicionó ningún organismo.

El sustrato empleado fue una mezcla de composta de bagazo de piña de agave (5%), fibra de coco (80%) y corteza de pino (15%) (Crespo *et al.*, 2013). Las macetas usadas fueron de fibra de coco con capacidad de 1kg.

Diseño experimental. El diseño establecido fue un bloques completamente al azar con dos repeticiones, constituido por dos naves comerciales, las cuales correspondían a dos áreas de condiciones similares en sombreado y riego, pero de tamaño diferente.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} es el valor de la variable respuesta; μ es la media general; T efecto que produce el tratamiento, T1, T2, ..., T_i; β_j es bloque; ϵ_{ij} error experimental.

La unidad experimental (UE) se conformó por 122 plántulas por repetición con un total de 244 por tratamiento y 1952 en el experimento; se muestrearon 26 plántulas en cada UE. Las variables evaluadas fueron altura de planta, unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y raíz, determinación de clorofila y carotenos; en ellas se determinó el área bajo la curva (ABC), de acuerdo a lo reportado por Madden *et al.* (2007).

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \frac{y_i - y_{i-1}}{2} * t_{i-1} \quad t_i$$

Donde, n es el número de mediciones, y_i es la variable evaluada, y t_i es el número de días desde el inicio del experimento a la fecha de medición.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$), con el paquete estadístico SAS.

Cuantificación de UFC en sustrato. Para *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., la cuantificación de UFC provenientes de suelo se hizo a través del procedimiento siguiente: se pesaron 10g de una muestra de sustrato y se agregaron en 90mL de agua destilada estéril en un matraz de 125mL, se hicieron diluciones hasta 10^{-3} . Se empleó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar Penetrex Estreptomycin (PDA-PS) con 0.5mL del surfactante comercial Penetrex®, 0.01g de estreptomycin y 0.0075g de clorhidrato de tetraciclina, se agitó el medio suavemente para no formar burbujas. De la dilución 10^{-3} se tomaron 10 muestras de 0.1mL, que se agregaron al medio PDA-PS. El

and molecularly identified in the works cited; a commercial strain of *Bacillus subtilis* (Serenade®), the mixtures of *T. virens* + *B. subtilis*, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; and the absolute and commercial controls (Table 1).

The treatments corresponding to the three species of *Trichoderma* were added in liquid medium of potato dextrose (potato 200g; dextrose 11g; distilled water 1000mL) at a concentration of 1×10^4 CFU mL⁻¹, and 10mL per shoot at the neck. *Bacillus subtilis* strain QST 713 was added in the commercial dose of 1 g L⁻¹ of water of the commercial product Serenade® which reported in the label a concentration of 8×10^9 CFU g⁻¹; the application was similar to *Trichoderma* spp., as well as the volume per shoot. The experiment was established in October of 2008 and four applications were made of the treatment every 30 d. Six samplings were carried out from December of 2008 to May of 2009 at 30 d intervals. In the regional and absolute control no organisms were added.

The substrate employed was a mixture of agave head bagasse compost (5%), coconut fiber (80%) and pine bark (15%) (Crespo *et al.*, 2013). The pots used were of coconut fiber with a capacity of 1 kg.

Experimental design. The design established was of completely randomized blocks with two replicates, comprised of two commercial naves, which corresponded to two areas of conditions similar in shading and irrigation, but of different size.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} is the value for the response variable; μ is the general mean; T the effect produced by the treatment, T1, T2, ..., T_i; β_j is block; ϵ_{ij} is experimental error.

The experimental unit (EU) was comprised of 122 plantlets per replicate with a total of 244 per treatment and 1952 in the experiment; 26 plantlets were sampled in each EU. The variables evaluated were plant height, colony forming units (CFU) of *Trichoderma*, *Fusarium* and *Bacillus* in substrate and root, and determination of chlorophyll; in which the area below the curve was determined (ABC), according to what was reported by Madden *et al.* (2007).

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \frac{y_i - y_{i-1}}{2} * t_{i-1} \quad t_i$$

Where n is the number of measurements, y_i is the variable evaluated, and t_i is the number of days from the start of the experiment to the date of measurement.

The data were subjected to an analysis of variance and comparison of means of minimum significant difference ($\alpha=0.05$), with the SAS statistical package.

Quantification of CFU in substrate. For *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp., the quantification of CFU from soil was made using the following procedure: 10 g of a substrate sample were weighed, and were added in 90 mL of sterile distilled water in a flask of 125mL, dilutions to 10^{-3} were made. Potato Dextrose Agar Penetrex Streptomycin (PDA-PS) was employed with 0.5mL of

material se incubó por siete días a temperatura ambiente de 22 a 24°C. La determinación de UFC de *Bacillus subtilis* se realizó con la misma técnica anterior solo que empleando la dilución 10^{-8} en medio de cultivo agar nutritivo (AN Bioxon® 38g L⁻¹) y cuantificando la densidad de población en base a la morfología de la colonia y la prueba de Gram (Schaad *et al.*, 2001).

En el sustrato empleado se cuantificaron las UFC g⁻¹ de sustrato de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *Bacillus* spp., presentes ya que fue una composta natural que se emplea por la empresa para su material de micropropagación y no pasa por esterilización.

Cuantificación sobre raíces. Se pesó un gramo de raíces a partir de 26 plántulas de agave de cada UE y se lavaron con agua común. Las muestras destinadas a determinar *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3% por tres minutos y al final se enjuagaron con agua destilada esterilizada y secaron para sembrarse en medio de cultivo PDA e incubarse en cámara de crecimiento a temperatura de 22 a 24°C. El número de colonias de *Trichoderma* y *Fusarium* se evaluaron a los siete y 10 días. Para cuantificar *B. subtilis* se siguió el procedimiento anterior solo sin la desinfección con hipoclorito de sodio. Las raíces se sembraron en medio AN incubándose a la misma temperatura indicada arriba y se evaluaron a las 24 y 48h tomando en cuenta la morfología de la colonia y la prueba de Gram (Schaad *et al.*, 2001).

Determinación de clorofila. Se tomaron 10g de hojas de agave por tratamiento y se introdujeron en 80mL de acetona al 70%, se dejaron reposar por 24h en oscuridad y posteriormente se llevaron al espectrofotómetro para su cuantificación (Porra *et al.*, 1989).

RESULTADOS

Cuantificación de flora microbiana fungosa en sustrato. El resultado de la cuantificación de flora microbiana fungosa en el sustrato empleado en las plántulas reportó la presencia de *Trichoderma* sp. en 1.2 ufc(x1000) g⁻¹, *Penicillium* sp. 21.4 ufc(x1000) g⁻¹, *Aspergillus* sp. 7.7 ufc(x1000) g⁻¹, *Mucor* sp. 12.1 ufc(x1000) g⁻¹ y *Chalaropsis* sp. 0.4 ufc(x1000) g⁻¹ (Figura 1), las cuales se identificaron a género con ayuda de las claves para hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998). Estos resultados no sorprenden ya que se trató de un sustrato natural y sentó referencia de los organismos con los cuales convivirían los organismos de los diferentes tratamientos introducidos para enriquecer el mismo.

Dinámica de UFC en sustrato y raíz. El establecimiento de las especies de *Trichoderma* spp. ocurrió desde la primera evaluación a los 30 d después de la inoculación (ddi) en todos los tratamientos como se puede apreciar en la Figura 2, y se mantuvo constante durante el tiempo (60, 90, 120, 150 y 180ddi) en valores de 3.5 a 4 log (UFC mL⁻¹) en todos los tratamientos.

Los propágulos de *Fusarium* spp. tuvieron un comportamiento diferente en sustrato y raíz. En raíz los tratamientos T1 Th, T2 Tv y T4 Bs no reportaron UFC en los primeros 30 d, sin embargo a los 60 ddi ya oscilaban entre 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹), el tratamiento T3 Ta alcanzó los mismos

commercial surfactant Penetrex®, 0.01g of streptomycin and 0.0075g of tetracycline hydrochloride; the medium was agitated gently so as not to form bubbles. From the dilution 10^{-3} , 10 samples of 0.1 mL were taken, which were added to the PDAA-PS medium. The material was incubated for seven days at room temperature of 22 to 24°C. Determination of CFU of *Bacillus subtilis* was made with the above technique, but using dilution 10^{-8} in nutritive agar culture (NA Bioxon® 38g L⁻¹) and quantifying the population density based on the morphology of the colony and the Gram test (Schaad *et al.*, 2001).

In the substrate employed the UFC g⁻¹ of substrate of *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. and *Bacillus* spp. present were quantified, given that it was a natural compost employed by the firm for its propagation material and is not sterilized.

Quantification on roots. A gram of roots was weighed from 26 agave shoots from each EU and washed with common water. The samples destined for determining *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp. were disinfested in sodium hypochlorite 3% for three minutes and then were rinsed with sterilized distilled water and dried to be sown in PDA culture medium and incubated in a growth chamber at 22 to 24°C. The number of colonies of *Trichoderma* and *Fusarium* were evaluated at seven and 10 days. To quantify *B. subtilis* the above procedure was followed, but without the disinfestations with sodium hypochlorite. The roots were sown in NA medium and incubated at the same temperature indicated above, and evaluated at 24 and 48 h, considering the morphology of the colony and the Gram test (Schaad *et al.*, 2001).

Determination of chlorophyll. 10g of agave leaves were taken for treatment and were introduced in 80mL of acetone at 70%, were left to rest for 24h in darkness and later were taken to the spectrophotometer for quantification (Porra *et al.*, 1989).

RESULTS

Quantification of fungal microbial flora in substrate. The result of the quantification of fungal microbial flora in the substrate employed in the plantlets reported the presence of *Trichoderma* sp. in 1.2 cfu(x1000) g⁻¹, *Penicillium* sp. 21.4 CFU (x1000) g⁻¹, *Aspergillus* sp. 7.7 CFU (x1000) g⁻¹, *Mucor* sp. 12.1 CFU (x1000) g⁻¹ and *Chalaropsis* sp. 0.4 CFU (x1000) g⁻¹, which were identified to genus with the aid of the imperfect fungi codes of Barnett and Hunter (1998). These results are not surprising, given that it was a natural substrate and gave a reference of the organisms with which the organisms of different treatments would coexist, introduced to enrich the substrate.

Dynamic of CFU in substrate and root. The establishment of the species of *Trichoderma* spp. occurred since the first evaluation 30 d after inoculation (dai) in all of the treatments, as can be seen in Figure 2, and was maintained constant during the time (60, 90, 120, 150 and 180 dai) at values of 3.5 to 4 log (CFU mL⁻¹) in all of the treatments.

The propagules of *Fusarium* spp. had a different behavior in substrate and root. In root the treatments T1

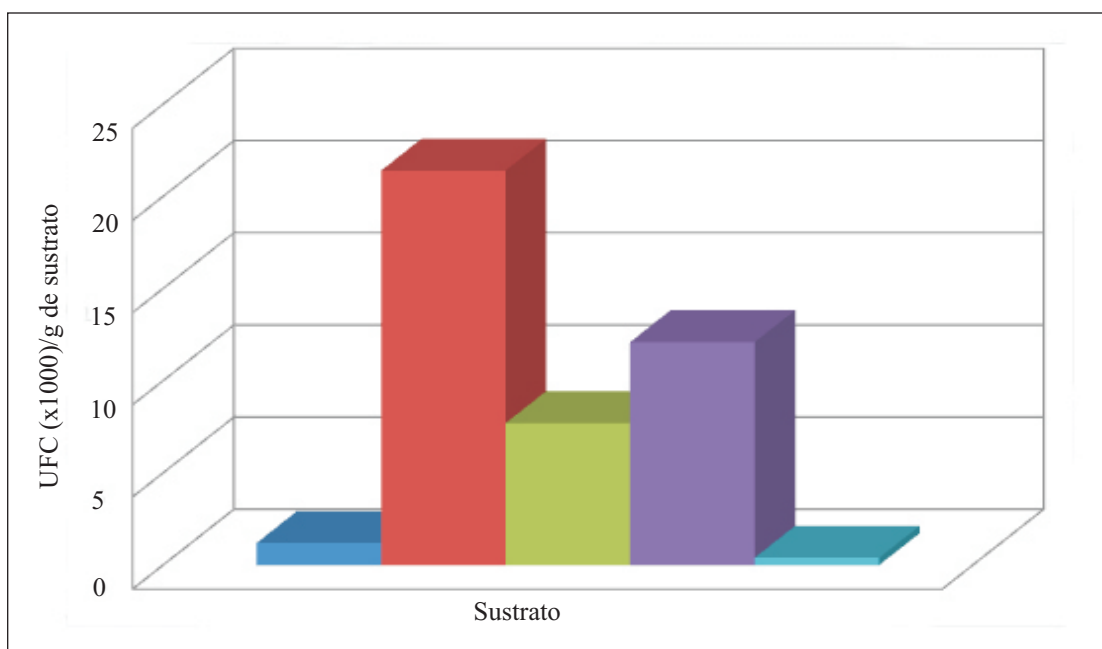


Figura 1. Resultados de UFC (x1000) por gramo de sustrato determinados en la composta empleada en la etapa de vivero con plántulas de micropropagación.

Figure 1. Results of CFU (x1000) per gram of substrate determined in the compost used in the nursery adaptation stage with micro-propagation plantlets.

niveles entre los 100 y 120 ddi; para T5 Tv + Bs se lograron a los 90 ddi; T6 Ta + Bs, T7 Tabs y T8 Treg iniciaron con los niveles desde los 30 ddi. En sustrato la colonización ocurrió desde los 30 ddi alcanzando niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹) en todos los tratamientos, sin embargo en los tratamientos T3 Ta y T7 Tabs, ocurrió un descenso de UFC a los 150 ddi y coincidió con la evaluación de marzo de 2009. El tratamiento T5 Tv + Bs reportó un descenso de UFC de *Fusarium* spp. a los 60 ddi (enero 2009), no obstante alcanzó los niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹) posteriormente.

La colonización de *B. subtilis* en los tratamientos T4 Bs, T5 Bs + Tv y T6 Bs + Ta, reportaron niveles elevados de UFC de la bacteria en raíces y su población se mantuvo entre 6.5 a 7.0 log (UFC/mL). En los tratamientos T1 Th, T2 Tv, T3 Ta, T4 Bs, T7 Tabs y T8 Treg, la bacteria descendió en sus niveles de densidad a los 180 ddi en la raíz; sin embargo, en los tratamientos T5 Tv+Bs y T6 Ta+Bs se mantuvo constante en los niveles de 6.5 a 7.0 log (UFC/mL) (Figura 2). El establecimiento de la bacteria en sustrato no ocurrió en los tratamientos T2 Tv y T8 Treg; mientras que en T1 Th, T3 Ta y T7 Tabs, su densidad se empezó a incrementar a los 150 ddi; los tratamientos que incluyeron a la bacteria desde el inicio T4 Bs, T5 Tv+Bs y T6 Ta+Bs, se establecieron en suelo desde los 30 ddi y se mantuvieron en densidades similares que los de raíz.

Análisis de varianza de área bajo la curva (ABC) y comparación de medias *Trichoderma* sp. sustrato. Los resultados del ANAVA mostraron diferencias entre tratamientos con una P=0.0003 respecto a la colonización de UFC de *Trichoderma* sp. en sustrato, donde la prueba de comparación de medias de LSD (diferencia mínima

Th, T2 Tv and T4 Bs did not report CFU in the first 30 d, however, at 60 dai they fluctuated between 2 and 2.5 log (CFU mL⁻¹), Treatment T3 Ta reached the same levels between 100 and 120 dai; for T5 Tv + Bs, they were reached at 90 dai; T6 Ta + Bs, T7 Tabs and T8 Treg initiated with these levels from 30 dai. In substrate the colonization occurred from 30 dai, reaching levels of 2 and 2.5 log (CFU mL⁻¹) in all of the treatments, however, in treatments T3 Ta and T7 Tabs, a decrease of CFU occurred at 150 dai and coincided with the evaluation of March 2009. Treatment T5 Tv + Bs reported a decrease of CFU of *Fusarium* spp. at 60 dai (January 2009), although it reached the levels of 2 and 2.5 log (CFU mL⁻¹) later.

The colonization of *B. subtilis* in treatments T4 Bs, T5 Bs + Tv and T6 Bs + Ta, reported high levels of CFU of the bacteria in roots and its population remained between 6.5 and 7.0 log (CFU/mL⁻¹). In treatments T1 Th, T2 Tv, T3 Ta, T4 Bs, T7 Tabs and T8 Treg, the bacteria descended in density levels at 180 dai in the root. However, in treatments T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, it remained constant at levels of 6.5 to 7.0 log (CFU/mL⁻¹) (see Fig. 2). The establishment of the bacteria in substrate did not occur in treatments T2 Tv and T8 Treg; while in T1 Th, T3 Ta and T7 Tabs, its density began to increase at 150 dai; the treatments that included the bacteria from the start T4 Bs, T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, were established in soil from 30 dai and remained in densities similar to those of root.

Analysis of variance of area below the curve (ABC) and comparison of means *Trichoderma* sp. substrate. The results of ANAVA showed differences among treatments with a P=0.0003 with respect to the

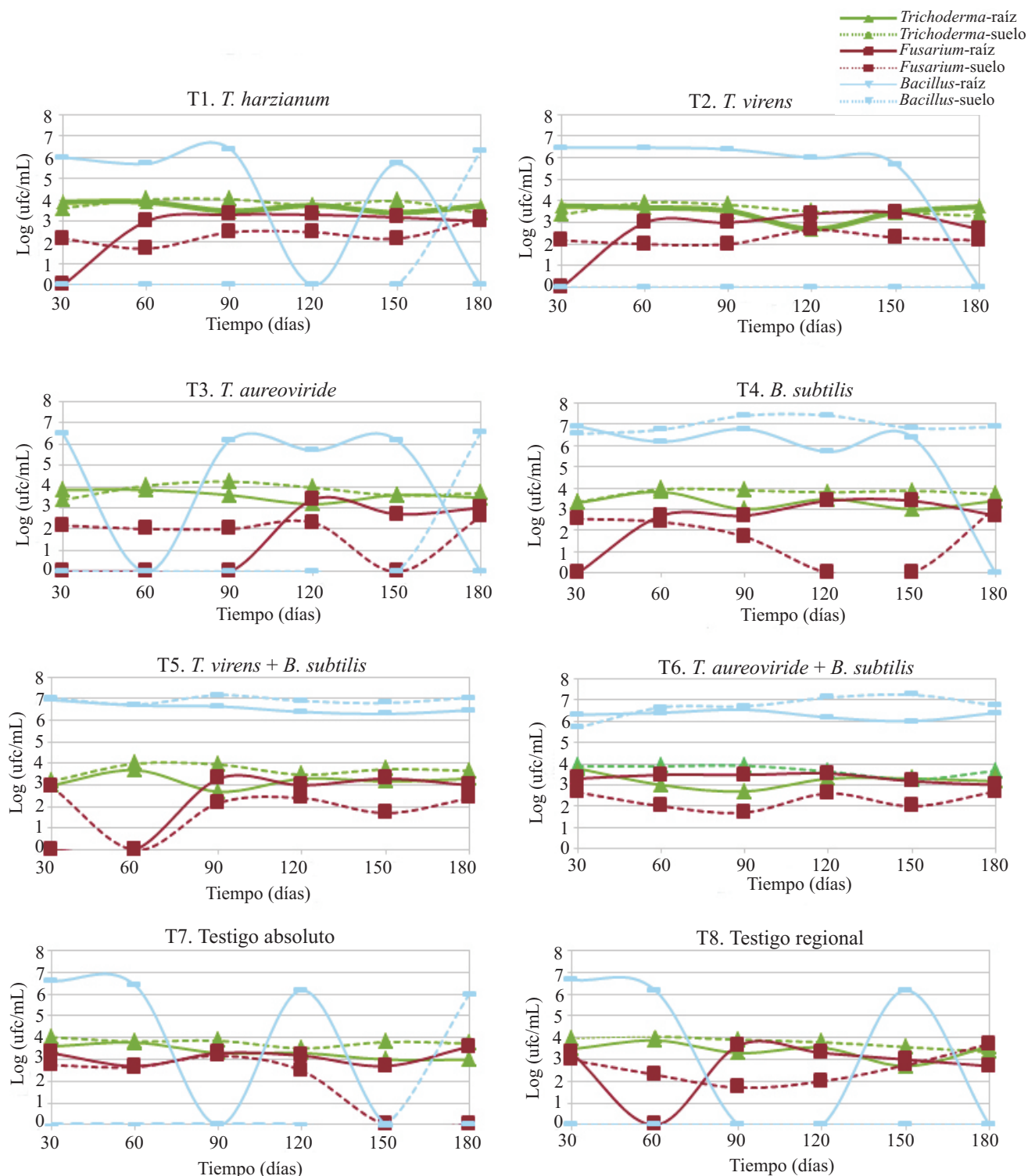


Figura 2 Comportamiento de los tratamientos T1 *T. harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *B. subtilis* (Bs), T5 *T. virens* + *B. subtilis* (Tv + Bs), T6 *T. aureoviride* + *B. subtilis* (Ta + Bs), T7 Testigo absoluto (Tabs) y T8 Testigo regional (Treg), durante seis meses de diciembre 2008 a mayo de 2009, inoculados al sustrato durante la etapa de adaptación de vivero del agave (*Agave tequilana* weber var. Azul) en el “Rancho el Indio”, Tequila, Jalisco.

Figure 2. Behavior of treatments T1 *T. harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *B. subtilis* (Bs), T5 *T. virens* + *B. subtilis* (Tv + Bs), T6 *T. aureoviride* + *B. subtilis* (Ta + Bs), T7 Absolute control (Tabs) and T8 (Regional control), during six months from December of 2008 to May of 2009, inoculated to the substrate during the nursery adaptation stage of the agave (*Agave tequilana* weber var. Azul) in “Rancho el Indio”, Tequila, Jalisco.

significativa $\alpha=0.05$) reportó al T3 Ta con la mayor ABC 1338.75; el T1 Th alcanzó niveles de 1160.25, le siguieron T4 Bs con 1012.50 y T8 Treg 1048.50. El resto de los tratamientos estuvieron por debajo de mil, T7 Tabs 951.00, T5 Tv + Bs 921.00, T6 Ta + Bs 836.25 y T2 Tv 703.50 (Cuadro 2).

Trichoderma sp. raíz. El ANAVA de las UFC en raíz de *Trichoderma* sp. reportó diferencias en los tratamientos con una $P=0.0325$. La prueba de comparación de medias de LSD ($\alpha=0.05$) señaló que el ABC mayor fue obtenida por T1 Th 772.5, seguido de un grupo de cinco tratamientos donde se agruparon T3 Ta 645.0, T2 Tv 532.5, T8 Treg 518 y T4 Bs 412.5, que pese a reportarse como iguales estadísticamente presentan diferencias de más de 100 puntos entre algunos de ellos. Las áreas menores las obtuvieron los tratamientos T5 Tv + Bs y T6 Ta + Bs, con 315.0 y 277.5, respectivamente (Cuadro 2).

Bacillus subtilis sustrato. El ANAVA del ABC indico diferencias entre tratamientos con una P de 0.016. La prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) resaltó a los tratamientos donde se encontró la bacteria como los de mayores niveles de ABC. El T4 Bs fue el de niveles altos con una ABC de 2055.0, seguido de aquellos tratamientos que tuvieron interacción con *Trichoderma* como el T5 Tv + Bs 1387.50 y T6 Ta + Bs 1290.0. Niveles menores se encontraron en T1 Th 30.0, T3 Ta 52.5 y T7 Tabs 15.0. Los tratamientos T2 Tv y T8 Treg no reportaron colonización en suelo de *B. subtilis* (Cuadro 3).

Bacillus subtilis raíz. Un comportamiento similar al de *B. subtilis* en sustrato se observó en raíces, donde también se mostró la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos del ANAVA del ABC con una P de 0.0135. Los

Cuadro 2. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa $\alpha=0.05$) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Trichoderma* sp. detectadas en sustrato y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 2. Comparison of means of LSD (least significant difference $\alpha=0.05$) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *Trichoderma* sp. detected in substrate and roots in the treatments established during the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	ABC de UFC <i>Trichoderma</i> sp.	
	Sustrato*	Raíces*
T1 Th	1160.25 b	772.5 a
T2 Tv	703.50 e	532.5 abc
T3 Ta	1338.75 a	645.0 ab
T4 Bs	1012.50 be	412.5 bc
T5 Tv + Bs	921.00 cd	315.0 c
T6 Ta + Bs	836.25 de	277.5 c
T7 Tabs	951.00 cd	405.0 bc
T8 Treg	1048.50 bc	518.0 bc

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 3. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa $\alpha=0.05$) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *B. subtilis* detectadas en sustrato y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 3. Comparison of means of LSD (least significant difference $\alpha=0.05$) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *B. subtilis* detected in substrate and roots in the treatments established in the nursery stage of micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	ABC de UFC de <i>Bacillus subtilis</i>	
	Sustrato	Raíces
T1 Th	30.00 b	120.0 c
T2 Tv	0.00 b	255.0 bc
T3 Ta	52.50 b	150.0 c
T4 Bs	2055.00 a	435.0 ab
T5 Tv + Bs	1387.50 a	600.0 a
T6 Ta + Bs	1290.00 a	322.5 bc
T7 Tabs	15.00 b	180.0 c
T8 Treg	0.00 b	157.5 c

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

colonization of CFU of *Trichoderma* sp. in substrate, where the comparison of means test of LSD (least significant difference $\alpha = 0.05$) reported T3 Ta with the highest ABC 1338.75; T1 Th reached levels of 1160.25, followed by T4 Bs with 1012.50 and T8 Treg 1048.50. The rest of the treatments were below one thousand, T7 Tabs 951.00, T5 Tv + Bs 921.00, T6 Ta + Bs 836.25 and T2 Tv 703.50 (Table 2).

Trichoderma sp. root. The ANAVA of the CFU in root of *Trichoderma* sp. reported differences in treatments with $P = 0.0325$. The comparison of means LSD test ($\alpha = 0.05$) indicated that the highest ABC was obtained by T1 Th 772.5, followed by a group of five treatments where T3 Ta 645.0, T2 Tv 532.5, T8 Treg 518 and T4 Bs 412.5, which despite being statistically equal present differences of more than 100 points among some of them. The lowest areas were obtained by treatments T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, with 315.0 and 277.5, respectively (Table 2).

Bacillus subtilis substrate. The ANAVA of the ABC indicated differences among treatments with a P of 0.016. The comparison of means LSD test ($\alpha = 0.05$) highlighted the treatments where the bacteria was found as those of the highest levels of ABC. The T4 Bs had high levels with an ABC of 2055.0, followed by those treatments that had interaction with *Trichoderma* such as T5 Tv + Bs 1387.50 and T6 Ta + Bs 1290.0. Lower levels were found in T1 Th 30.0, T3 Ta 52.5 and T7 Tabs 15.0. Treatments T2 Tv and T8 Treg did not report colonization in soil of *B. subtilis* (Table 3).

Bacillus subtilis root. A similar behavior to that of *B. subtilis* in substrate was observed in roots, where there was also the existence of statistical differences among treatments

resultados arrojados por la prueba de comparación de medias de LSD ($\alpha=0.05$) señalaron que *B. subtilis* reportó presencia en todos los tratamientos en sus raíces. El ABC mayor la alcanzó el T5 Tv + Bs 600.0, seguido del T4 Bs 435.0 y T6 Ta + Bs 322.5; T2 Tv reportó 255.0. T1 Th, T3 Ta, T7 Tabs y T8 Treg, obtuvieron las ABC más bajas con valores de 120.0, 150.0, 180.0 y 157.5 (Cuadro 3).

Fusarium sp. sustrato. Las UFC de *Fusarium sp.* en sustrato no reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el ANAVA, sin embargo se apreciaron niveles por debajo de 50 para la mayoría de los tratamientos, excepto para el T7 Tabs y T8 Treg, donde se reportaron ABC de 75.75 y 120 (Cuadro 4).

Fusarium sp. raíz. No hubo diferencias estadísticas de tratamientos en el ANAVA del ABC de UFC de *Fusarium sp.* en raíces. Sin embargo se tuvieron valores de más de 200 entre varios de los tratamientos (Cuadro 4). T6 Ta + Bs obtuvo niveles de ABC de 375.0, mientras que los valores de T1 Th, T2 Tv, T7 Tabs y T8 Treg, fueron de 210, 235.5, 225.0 y 262.5, respectivamente. Los valores bajos se encontraron en los tratamientos T3 Ta 105.0, T4 Bs 187.5 y T5 Tv + Bs 165.0.

Clorofila y Altura. No se reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el ANAVA de estas dos variables (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que los microorganismos como *Trichoderma spp.* y *Bacillus subtilis* son capaces de establecerse en suelo y algunos de estos tienen la capacidad de hacer a las raíces su nicho; con esto tienen la cualidad de equilibrar las densidades de población

Cuadro 4. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa $\alpha=0.05$) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Fusarium sp.* detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 4. Comparison of means of LSD (least significant difference $\alpha=0.05$) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *Fusarium sp.* detected in soil and roots in the treatments established during the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

ABC de UFC de <i>Fusarium sp.</i>		
Tratamiento	Sustrato*	Raíces*
T1 Th	48.00 a	210.0 a
T2 Tv	30.00 a	232.5 a
T3 Ta	20.25 a	105.0 a
T4 Bs	32.25 a	187.5 a
T5 Tv +Bs	30.00 a	165.0 a
T6 Ta + Bs	33.75 a	375.0 a
T7 Tabs	75.75 a	225.0 a
T8 Treg	120.00 a	262.5 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 5. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa $\alpha=0.05$) del área bajo la curva (ABC) de las variables altura y clorofilas en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 5. Comparison of means of LSD (least significant difference $\alpha=0.05$) of the area below the curve (ABC) of the variables height and chlorophylls in the treatments established in the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Área bajo la curva		
Tratamiento	Altura*	Clorofila*
T1 Th	4160.4 a	119.69 a
T2 Tv	4313.9 a	107.42 a
T3 Ta	4336.1 a	115.29 a
T4 Bs	4469.6 a	116.67 a
T5 Tv + Bs	4212.6 a	107.16 a
T6 Ta + Bs	4292.4 a	110.89 a
T7 Tabs	4325.2 a	108.55 a
T8 Treg	4271.4 a	112.80 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

of the ANAVA of the ABC with a P of 0.0135. The results from the comparison of means test of LSD ($\alpha=0.05$) indicated that *B. subtilis* reported presence in all of the treatments in roots. The highest ABC was reached by T5 Tv + Bs 600.0, followed by T4 Bs 435.0 and T6 Ta + Bs 322.5; T2 Tv reported 255.0. T1 Th, T3 Ta, T7 Tabs and T8 Treg obtained the lowest ABC with values of 120.0, 150.0, 180.0 and 157.5 (Table 3).

Fusarium sp. substrate. The CFU of *Fusarium sp.* in substrate did not report statistical differences among treatments in ANAVA. However, values of more than 200 were obtained among various treatments (Table 4). T6 Ta + Bs obtained ABC levels of 375.0, while the values of T1 Th, T2 Tv, T7 Tabs and T8 Treg were 210, 235.5, 225.0 and 262.5, respectively. The low values were found in treatments T3 Ta 105.0, T4 Bs 187.5 and T5 Tv + Bs 165.0.

Chlorophyll and height. No statistical differences were reported among treatments in the ANAVA of these two variables.

DISCUSSION

The results of this work show that the microorganisms such as *Trichoderma spp.* and *Bacillus subtilis* are capable of establishing themselves in soil, and some have the ability to nest in roots. Thus, they have the quality of balancing the population densities of pathogenic organisms such as various species of *Fusarium* common in most soils of the world and regulating the populations of microorganisms in the soils or substrates used. Smith *et al.* (2001) indicate that the CFU levels below 100 CFU g⁻¹ can be considered low and of reduced risk for causing disease from this fungus. However, above this level, precautions

de organismos patógenos como varias de las especies de *Fusarium* comunes en la mayoría de los suelos del mundo las poblaciones de microorganismos en los suelos o sustratos que se empleen; Smith *et al.* (2001) indican que los niveles de UFC por debajo de 100 UFC g⁻¹ pueden considerarse bajos y de riesgo reducido para causar enfermedad por este hongo, sin embargo, por arriba de ese nivel se deben tomar precauciones ya que se consideran niveles elevados (Valiushkaite *et al.*, 2008). El control biológico de patógenos de plantas comúnmente involucra el mejorar o aumentar el antagonismo alrededor de las plantas o en el suelo pero en poblaciones bajas que permitan un adecuado equilibrio. Este tipo de herramientas prácticas permiten la protección contra infecciones que pudieran establecerse; la protección del material que se plantará puede protegerse vía raíces, suelo o en semilla. Gnanamanickan *et al.* (2002) reportaron el éxito de tratamiento de la semilla en millones de hectáreas de algodón en china con *Streptomyces* 5406 como un ideal de forma en la protección de cultivos desde el punto de vista preventivo. La capacidad que se observó en este trabajo de T1 Th para establecerse en suelo y raíz, también lo reportó Harman (2000) para la especie *T. harzianum* T-22 donde señaló además que la cualidad de colonizar el área de la rizósfera en las plantas trae el beneficio de poder actuar como un inductor de mecanismo de resistencia sistémica adquirida, lo que conlleva a prolongar la protección de las plantas hacia patógenos. El tratamiento T3 Ta tuvo un comportamiento similar a T1 Th; Howell (2002) y Harman *et al.* (2004) reportaron que son varias las especies de *Trichoderma* que tienen la capacidad de poder colonizar el área del sistema de raíces de plantas donde se aplica con la finalidad de conferir protección y que los organismos pueden actuar contra los patógenos a través de la producción o liberación de varios compuestos que pueden inducir respuestas de resistencia sistémica adquirida o localizada y así pérdida de patogenicidad en las plantas; señalando que dicha asociación microorganismo-raíz causa sustanciales cambios en el metabolismo y proteoma de la planta. El poder establecerse en suelo también trae como beneficio que las especies puedan actuar a través de competencia por espacio o por micoparasitismo que son algunos de los mecanismos reportados desde los 70's para algunas de las especies del género *Trichoderma* (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 y Howell, 2002). La aplicación preventiva también fue reportada por Horst *et al.* (2005) quienes mencionan que varios de los aislamientos y especies de *Trichoderma* spp. pueden reducir la severidad de enfermedades en plantas cuando se aplicaron en tratamiento a la semilla o trasplante entre ellas reportan a *T. asperellum* T-203, *T. hamatum* GT3-2, *T. hamatum* T382, *T. harzianum* T39, *T. harzianum* T22 y *T. virens* G6.

Respecto al comportamiento de *B. subtilis* los resultados de este trabajo demuestran la capacidad que tiene de establecimiento donde se adiciona sea en suelo o sustrato, así como en las raíces. El género *Bacillus* está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies han sido objeto de investigación para su implementación

should be taken, as they are considered high (Valiushkaite *et al.*, 2008). The biological control of plant pathogens commonly involves improving or increasing the antagonism around the plants or in the soil but in low populations which permits an adequate balance. This type of practical tool allows protection against infections that could be established; the protection of the material to be planted can be protected via roots, soil or seed. Gnanamanickan *et al.* (2002) reported the success of treatment of seed in millions of hectares of cotton in China with *Streptomyces* 5406 as an ideal form of crop protection from the preventive viewpoint. The capacity that was observed in this work of T1 Th for establishment in soil and root was also reported by Harman (2000) for the species *T. harzianum* T-22, where he also pointed out that the quality of colonizing the area of the rhizosphere in the plants has the benefit of acting as an inductor of acquired systemic resistance mechanism, which prolongs the protection of the plants from pathogens. Treatment T3 Ta had a behavior similar to that of T1 Th; Howell (2002) and Harman *et al.* (2004) reported that various species of *Trichoderma* have the capacity to colonize the area of the root system of plants where it is applied, in order to confer protection and so that the organisms can act against the pathogens through the production or release of various compounds which can induce acquired or localized systemic resistance, and thus, the loss of pathogenicity in the plants. These authors point out that this association of microorganism-root causes substantial changes in the metabolism and proteome of the plant. The capacity to be established in soil also has the benefit that the species can act through competition for space or for myco-parasitism, which are some of the mechanisms reported since the 1970's for some of the species of the genus *Trichoderma* (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 and Howell, 2002). Preventive application was also reported by Horst *et al.* (2005), who mention that several of the isolates and species of *Trichoderma* spp. can reduce the severity of diseases in plants when they are applied in treatment to seed or transplant, among which *T. asperellum* T-203, *T. hamatum* GT3-2, *T. hamatum* T382, *T. harzianum* T39, *T. harzianum* T22 and *T. virens* G6 were reported.

With respect to the behavior of *B. subtilis*, the results of this work demonstrate its capacity for establishment where it is added in soil or substrate, as well as in roots. The genus *Bacillus* is considered to be a growth promoter with potential for increasing plant yield. Various species have been the object of investigation for their implementation as biological control agents due to their characteristics of high colonization in roots and survival conferred by the spores (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997). It is a group of bacteria found in diverse ecological niches, including soil, water and air (Pankaj *et al.*, 2012). Jacobsen *et al.* (2004) point out that *Bacillus* spp. are biological control agents with high potential as a tool in an integrated pest management system with tendencies toward sustainable management. One of the investigations that demonstrated the findings of Jacobsen *et al.* (2004) are the results obtained by Zhang *et al.* (2009), who applied *B. subtilis* in treatment to seed and

como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997); es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo suelo, agua y aire (Pankaj *et al.*, 2012). Jacobsen *et al.* (2004) señalaron que *Bacillus* spp. son agentes de control biológico que tienen un gran potencial como herramienta en un sistema de manejo integrado de plagas con tendencias hacia un manejo sustentable. Una de las investigaciones que demostró lo señalado por Jacobsen *et al.* (2004) son los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2009) quienes aplicaron *B. subtilis* en tratamiento a semilla y directo al suelo, en cultivo de soya contra *Fusarium oxysporum* y *F. graminearum*, y reportaron que reduce la severidad de pudrición de raíces por 68 a 74% e incrementa la emergencia en 13 a 17%, la altura en 9 a 18%, y el peso seco de raíz de 8.4 a 19%. Veerubommu *et al.* (2011) encontraron que una mezcla de rizobacterias (*Bacillus atrophaeus* + *Burkholderia cepacia*) reducen la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* bajo condiciones de producción en invernaderos y en experimentos de campo fue de 48.6 y 46.1%, comparado con el tratamiento con fungicida (carbendazim) que reportó una reducción de 51.5 a 47.1%. Turner y Backman (1991) mostraron que *B. subtilis* podía colonizar consistentemente el sistema radical de cacahuete. El tratamiento a las semillas de cacahuete reportó una emergencia mayor que los no tratados y los resultados de vivero se repitieron en ensayos de campo. Dukare *et al.* (2011) señalaron resultados similares a los autores anteriores en el tratamiento de semilla y en composta con *B. subtilis* contra el ahogamiento ocasionado en plántula por *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, donde sus resultados mostraron reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad. Chae *et al.* (2006) evaluaron una composta conteniendo diversas bacterias con capacidad de producir quitinasas, entre ellas *B. subtilis*, como enmienda de suelo contra la marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici* y concluyeron que se abate el efecto del patógeno creando condiciones supresivas en el área de la rizósfera.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que el uso de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* o la mezcla de ambos, en algunos casos, debe ser un tratamiento preventivo en el material de propagación en el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. Azul, ya que se establecen las poblaciones de antagonistas creando un ambiente de equilibrio en el área de la rizósfera que no permite que las poblaciones de *Fusarium* spp. se disparen y se mantengan densidades de UFC que no superen las 100 UFC g⁻¹; también esta colonización será de apoyo cuando las plantas sean llevadas a campo y sean sometidas al estrés del trasplante y enfrentadas a la población nativa de organismos habitantes de los diferentes suelos.

LITERATURA CITADA

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of

directly to soil, in a soybean crop against *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*, and reported that it reduces the severity of rotting in roots by 68 to 74% and increases emergence by 13 to 17%, height by 9 to 18%, and dry weight of root by 8.4 to 19%. Veerubommu *et al.* (2011) found that a mixture of rhizobacteria (*Bacillus atrophaeus* + *Burkholderia cepacia*) reduces the incidence of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* under greenhouse production conditions and in field experiments was 48.6 and 46.1 %, compared with fungicide (carbendazim) treatment that reported a reduction of 51.5 to 47.1%. Turner and Backman (1991) demonstrated that *B. subtilis* could consistently colonize the root system of peanut. The treatment to peanut seeds reported a higher emergence than those untreated, and the nursery results were repeated in field assays. Dukare *et al.* (2011) indicated similar results to those of the abovementioned authors in the treatment of seed and in compost with *B. subtilis* against the seedling damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, where results showed reduction of incidence and severity of the disease. Chae *et al.* (2006) evaluated a compost containing diverse bacteria with capacity to produce chitinase, among them *B. subtilis*, as soil improvement against the withering of chili produced by *Phytophthora capsici* and concluded that the effect of the pathogen is abated, creating suppressive conditions in the area of the rhizosphere.

CONCLUSIONS

The results of this work indicate that the use of *Trichoderma* spp., *B. subtilis* or the mixture of both, in some cases, should be a preventive treatment in the propagation material in the cultivation of *Agave tequilana* Weber var. Azul, given that the populations of antagonists are established, creating an environment of equilibrium in the area of the rhizosphere which does not permit the populations of *Fusarium* spp. to multiply, and maintains CFU densities that do not surpass 100 CFU g⁻¹. In addition, this colonization will serve as support when the plants are taken to the field and subjected to the stress of transplanting and faced with the native population of organisms inhabiting the different soils.

imperfect fungi. Fourth edition. APS-Press The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 218p.

Byerly, M. K. F. 2007. Prólogo. P 7-8 in Pérez y Del Real (ed). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Libro técnico No. 4, Tepatitlán, Jalisco.

Carballo, S.M. y Díaz, C. A. 2008. Evaluación de agentes de biocontrol contra la marchitez del agave causada por *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en Tequila, Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.

- Chae, D.H., Jin, R.D., Hwangbo, H., Kim, Y.W., Kim, Y.C., Park, R.D., Krishnan, H.B. and Kim, K.Y. 2006. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with compost containing multitude of chitinase producing bacteria. *Biocontrol* 51: 339-351.
- Crespo, G. M. R., González, E.D.R., Rodríguez, M. R., Rendón, S.L.A., Del Real L. J. I. y Torres, M.J.P. 2013. Evaluación de la composta de bagazo de agave como componente de sustratos para producir plántulas de agave azul tequilero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 4:1161-1173.
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. 123p.
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Comité técnico agronómico-Subcomite de fitosanidad. 10p.
- Cuevas, A.F. y Domínguez, V. X. 2007. Evaluación *in vitro* de aislados de *Trichoderma* spp. Encontrados en la region de Tequila, Jalisco contra *Fusarium* spp. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Dukare, A.S., Prasanna, R., Dubey, S. Ch., Nain, L., Chaudhary, V., Singh, R. and Saxena, A. K. 2011. Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. *Crop Protection* 30: 436-442
- Fucikovsky-Zak, L. 2001. Tristeza and death of *Agave tequila* Weber, var .azul. Ed. De Boer, S.H., In: Plant Pathogenic Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 454p.
- Gnanamanickan, S. S. 2002 . Biological control of crop diseases. Merce Dekker, Inc. USA. 468p.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 393.
- Harman, G.E., Lorito, M., and Lynch, J. M.2004. Uses of *Trichoderma* spp. To remediate soil and water pollution. *Advances in Applied Microbiology* 56:313-330.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* Species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Horst, L. E., Locke, J., Krause, C. R., McMahan, R. W., Madden, L. V., and Hoitink, H. A. J. 2005. Suppression of *Botrytis* blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease* 89:1195-1200.
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., and Larson, B. J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.
- Klopper J.W, Tuzun S, Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science Technology* 2:349-351.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 395-417.
- Luna-Hernández G.1996. Pudrición de tallo de Agave tequila Weber, var.azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. 421 p.
- Pankaj, K., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research* 167: 493-499.
- Pérez, D.J.F y Del Real, J.I. 2007. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequila* Weber en la zona de denominación de origen de tequila. Prometeo editores e INIFAP, Guadalajara, Jalisco México. 195 p.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying *chlorophylls* a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of *chlorophyll* standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 370 pp.
- Smith, N. S, J. E. DeVay and W. Hsieh. 2002. Soilborne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, a cotton wilt fungus in California fields. *Mycologia* 93: 737-743.
- Turner, J. T., and Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75:347-353.
- Valiaskaite, A., Surviliene, E. and Raudonis, L. 2008. Effect of Mycostop on *Fusarium* root-rot agents of raspberry. *Sodininkyste ir Darzininkyste* 27 : 47-51.
- Van Veen , J. A., Van Oberbeek, L. S . and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Veerubommu, S., Nandina, K., Markandey S., Sukhjinder, S. and Ramdeen, P. 2011. Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* using plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Crop Protection* 30:807-813.
- Vicente, R. I., y Del Real, J.I. 2007. Métodos de propagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul. P 57-67 in Rulfo V., F.O., Pérez, D. J.F., Del Real, L. J. I. y Byerly, M. K. F. 2007. (ed). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Virgen-Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo

integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber, var. azul. Departamento de producción agrícola. CUCBA. U de G. Informe técnico para el programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva agave-tequila.

Zhang, J.X., Xue, A.G., and Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. Plant Disease 93:1317-1323.