

# Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico

## Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México

Cassandra Itzel Mata-Santoyo, Santos Gerardo Leyva-Mir, Moisés Camacho-Tapia, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carretera México-Texcoco Km 38.5, Texcoco, CP. 56230, Estado de México, México; Juan Manuel Tovar-Pedraza, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México; Julio Huerta-Espino, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco Km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, CP. 56250, Estado de México, México; Elizabeth García-León\*, Universidad Interserrana del estado de Puebla Ahuacatlán, Los Llanos Km 1 San Andrés Tlayehualancingo, CP. 73330, Ahuacatlán, Puebla, México. \*Autor para correspondencia: egarcialeon55@gmail.com.

Recibido: 16 de Marzo, 2018.

Aceptado: 19 de Julio, 2018.

Mata-Santoyo CI, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M, Tovar-Pedraza JM, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, García-León E. 2018. Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 432-443.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-3

Primera publicación DOI: 22 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 22, 2018.

**Resumen.** A partir de muestras de trigo de la variedad CIRNO C2008 con síntomas de tizón foliar y provenientes del Sur de Sonora, México, se obtuvieron cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* y cuatro de *Alternaria alternata*. Las especies fúngicas se identificaron mediante caracterización morfológica y análisis de secuencias ITS del DNA

**Abstract.** From samples of wheat cultivar CIRNO C2008 with leaf blight symptoms from southern Sonora, four isolates of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* were obtained. The fungal species were identified by morphological characterization and ITS sequence analysis of rDNA. Thirteen bread wheat (*Triticum aestivum*) and 6 durum wheat (*Triticum durum*) cultivars were inoculated with the eight fungal isolates under greenhouse conditions. The aggressiveness of the isolates was assessed using a severity scale of 1 to 9, with 1 being minimal lesions and 9 being necrosis and generalized chlorosis indicating susceptibility. Cultivars Vicam S70, Kronstad F2004, and Río Bravo C2016 were moderately resistant to *B. sorokiniana*; while Bárcenas S2002, Morocco, Borlaug 100 F2014, Bacanora T88, Luminaria F2012, the advanced line C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343,

ribosomal. En invernadero, se inocularon los ocho aislados en 13 variedades de trigo harinero (*Triticum aestivum*) y 6 de trigo cristalino (*Triticum durum*). La agresividad de los aislados se evaluó con una escala de severidad de 1 a 9, donde 1 fue lesiones mínimas y 9 necrosis y clorosis generalizada que indicó susceptibilidad. Las variedades Vicam S70, Kronstad F2004 y Río Bravo C2016 fueron moderadamente resistentes a *B. sorokiniana*; en contraste, Bárcenas S2002, Morocco, Borlaug 100 F2014, Bacanora T88, Luminaria F2012, la línea avanzada C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343, Nana F2007, Local red, Noio y la línea avanzada JC fueron altamente susceptibles. Adicionalmente, se observó que *A. alternata* es un patógeno secundario que invade las lesiones provocadas por *B. sorokiniana*.

**Palabras clave:** tizón foliar, mancha borrosa, patogenicidad, severidad.

El trigo (*Triticum* spp.) es el cereal más adaptado a las diferentes condiciones climatológicas en el mundo, junto con el maíz (*Zea mays*), y el arroz (*Oryza sativa*) proveen el 75% de los carbohidratos que requiere la alimentación humana. Sin embargo se estima que un 30% de la producción mundial de trigo es afectada por factores bióticos como las plagas y enfermedades que causan graves pérdidas en los rendimientos (Bockus *et al.*, 2010); dentro de sus principales enfermedades se encuentran las causadas por hongos que causan royas, carbonos, tizones foliares y pudriciones radiculares (Zillinsky, 1984). Los tizones en trigo son enfermedades foliares que se distribuyen mundialmente y son particularmente agresivos cuando la humedad relativa es alta, la temperatura de 20 °C (Zillinsky, 1984), y una baja fertilidad del suelo (Duveiller y García-Altamirano, 2000).

Nana F2007, Local Red, Noio and JC advanced line were highly susceptible. Additionally, it was observed that *A. alternata* is a secondary pathogen that invades the lesions caused by *B. sorokiniana*.

**Key words:** leaf blight, spot blotch, pathogenicity, severity.

Wheat (*Triticum* spp.) is the cereal with the greatest adaptation to different weather conditions in the world. Along with maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*), it provides 75% of the carbohydrates required for human nutrition. However, it is estimated that around 30% of the world's wheat production is affected by biotic factors such as pests and diseases that cause important losses in yields (Bockus *et al.*, 2010); some of their most important diseases are caused by fungi that cause rust, smut, leaf blight and root rotting (Zillinsky, 1984).

Blight in wheat are diseases that spread across the globe and are particularly aggressive when relative humidity is high, the temperature is around 20 °C (Zillinsky, 1984), and soil fertility is low (Duveiller and García-Altamirano, 2000).

CIRNO C2008 is the main cultivar of durum wheat planted in the north of the country, due to its high yield, which has been over 8% higher than in the commercial cultivar Júpate C2001 (Figuroa *et al.*, 2010). However, it is starting to be replaced by the varieties Quetchehueca Oro C2013 (Fuentes-Dávila *et al.*, 2014) and Baroyeca Oro C2013 (Chávez Villalba *et al.*, 2015) due to its susceptibility to leaf rust and yellow rust.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016), reported *B. sorokiniana* as the causal agent of spot blotch in wheat in the Yaqui Valley, Sonora. However, in other areas of Mexico, Duveiller and Dubin (2002), reported as related to the same disease, fungi such as *Alternaria* spp. and *Pyrenophora tritici-repentis*.

CIRNO C2008, es la principal variedad de trigo cristalino sembrada en el norte del país debido a su alto rendimiento, el cual ha sido superior en 8% a la variedad comercial Júpare C2001 (Figueroa *et al.*, 2010). Sin embargo, está empezando a ser reemplazada con las variedades Quetcheueca Oro C2013 (Fuentes-Dávila *et al.*, 2014) y Baroyeca Oro C2013 (Chávez-Villalba *et al.*, 2015) debido a su susceptibilidad a la roya de la hoja y a la roya amarilla.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016), reportaron a *B. sorokiniana* como agente causal de la mancha borrosa en trigo en el Valle del Yaqui, Sonora. Sin embargo, en otras regiones de México Duveiller y Dubin (2002), reportaron asociados a la misma enfermedad a hongos como *Alternaria* spp. y *Pyrenophora tritici-repentis*.

La estrategia de control de enfermedades causadas por tizones, incluida la mancha borrosa, se basa en un enfoque integrado, donde la resistencia genética es un elemento importante. La resistencia a estas enfermedades por genotipos de alto rendimiento no es satisfactoria (Saari, 1998), se afirma que el tizón foliar es causado por al menos una especie de hongos del género *Alternaria*, pero se desconoce que especies están involucradas y si solo se trata de ese género. Por lo que se plantearon los siguientes objetivos: identificar el agente causal de la enfermedad en muestras provenientes del sur de Sonora y determinar la agresividad del o los patógenos en variedades comerciales y líneas avanzadas de trigo en condiciones de invernadero.

En los ciclos otoño-invierno 2014 y 2015, se recolectaron cincuenta muestras de trigo de la var. CIRNO C2008 en espigamiento y con síntomas de tizón foliar en campos agrícolas y experimentales del sur de Sonora, México. Los síntomas que exhibían las muestras recolectadas fueron: lesiones pequeñas y ovals de color marrón oscuro y con el centro color marrón claro, acompañadas de clorosis en etapas avanzadas (Dickson, 1956).

The strategy to control diseases such as blight, including spot blotch, is based on an integrated approach, where genetic resistance is an important element. Resistance to these diseases by high yielding genotypes is not satisfactory (Saari, 1998); leaf blight is said to be caused by at least one fungal species of the genus *Alternaria*, although what species are involved, or if it is only that genus, is unknown. Therefore, the following goals have been established: identifying the causal agent of the disease in samples from southern Sonora, and to determine the aggressiveness of the pathogen or pathogens in commercial cultivars and advanced wheat lines under greenhouse conditions.

In the 2014 and 2015 autumn-winter cycles, fifty samples were collected of the cv. CIRNO C2008 at heading stage with symptoms of leaf blight in agricultural and experimental fields in the south of the state of Sonora, Mexico. The symptoms displayed by the samples were small, dark maroon colored lesions with a light maroon center, along with chlorosis in advanced stages (Dickson, 1956).

Using a stereoscopic microscope, the tissue was searched for the presence of conidia and transferred to Petri dishes with a potato-dextrose-agar (PDA) medium (Difco®, France).

DNA extraction was performed using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, EE.UU.) using the method reported by the manufacturer. For this, the mycelium with 7 days of growth was carefully detached from a Petri dish, which was deposited in a sterile mortar and macerated with liquid nitrogen. For the PCR we used primers ITS5 and ITS4 (White *et al.*, 1990).

The four isolates of *B. sorokiniana* and the four *A. alternata* isolates were purified and increased, and the conidia were collected directly from the Petri dishes with mycelial growth by scraping with a spatula and adding distilled water. This conidia suspension was filtered through two layers of cheesecloth to eliminate fragments of the fungus

Con un microscopio estereoscópico se buscó la presencia de conidios en el tejido los cuales se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco®, Francia).

La extracción de DNA se realizó usando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, EE.UU.) mediante la metodología reportada por el fabricante. Para ello, se desprendió cuidadosamente el micelio de una caja Petri con crecimiento de 7 días, el cual se depositó en un mortero estéril y se maceró con nitrógeno líquido. Para la PCR se utilizaron los primers ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

Los cuatro aislados de *B. sorokiniana* y los cuatro de *A. alternata* se purificaron e incrementaron y los conidios se recolectaron directamente de las cajas Petri con crecimiento micelial mediante el raspado con una espátula y adición de agua destilada. Esta suspensión de conidios se filtró a través de dos capas de manta de cielo para eliminar fragmentos del hongo y de medio de cultivo, ajustándose a una concentración de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  usando un hematocitómetro, añadiendo además una gota de Tween 20® (Cardona y González, 2008).

Para las pruebas de patogenicidad se sembraron 19 variedades de trigo bajo un diseño experimental completamente al azar, y se tomó la segunda hoja en estado de plántula como base para la evaluación, dentro de las cuales fueron: 13 variedades de trigo harinero y 6 variedades de trigo cristalino. Por cada variedad se sembraron 5 semillas en sustrato esterilizado para evaluar 5 plántulas; se sembraron 8 repeticiones por cada clasificación (harineros y cristalinos) y 3 repeticiones por cada uno de los aislados fúngicos. El experimento se repitió dos veces bajo condiciones de invernadero.

La inoculación se realizó por aspersión de acuerdo a lo descrito por Singh *et al.* (1996) y fue en volúmenes iguales de suspensión de conidios de 15 mL por aislado directo a cada charola de germinación, las cuales posteriormente se trasladaron

and culture medium, adjusted to a concentration of  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  using a hemacytometer, also adding a drop of Tween 20® (Cardona and González, 2008).

For pathogenicity tests, 19 wheat cultivars were planted under a totally randomized experimental design, and the second leaf in a seedling stage was taken as a basis for the evaluation, within which there were 13 cultivars of bread wheat and 6 cultivars of durum wheat. For each cultivar, 5 seeds were planted in a sterilized substrate to evaluate 5 seedlings; 8 repetitions were planted for each classification (bread and durum) along with 3 repetitions for each one of the fungal isolates. The experiment was carried out twice under greenhouse conditions.

Inoculation was carried out by spraying, according to descriptions by Singh *et al.* (1996) and it was in equal volumes of 15 mL conidial suspension for every isolate directly to each germination tray, which were then transferred to a controlled environment incubation chamber with a relative humidity of 100%, with the aid of an ultrasonic HU-820A humidifier (Samsung Electronic®, Korea), and an average temperature of between 19 and 21 °C for 48 h. They were later transported to the greenhouse, where they were kept at a temperature that ranged between 21 and 30 °C for 15 days until signs and symptoms appeared.

Evaluations began five days after inoculation, requiring the use of the severity scale proposed by Perelló *et al.* (1998), where: 1 = free of infections to minimum spots; 2 = 1 to 5%; 3 = 5 to 12%; 4 = 12 to 20%; 5 = 20 to 35%; 6 = 35 to 45%; 7 = 45 to 60%; 8 = 60 to 80%; 9 = over 80% of the foliar area affected with necrosis and generalized chlorosis. The data were converted into percentages and underwent an ANOVA analysis of variance using the program SAS 9.1.3 (SAS Institute®, U.S.A.). In order to stratify the results,

a una cámara de incubación con ambiente controlado con humedad relativa de 100% con ayuda de un humidificador ultrasónico HU-820A (Samsung Electronic®, Corea) y temperatura media de 19 a 21 °C por 48 h. Después se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron hasta la aparición de síntomas y signos a una temperatura que osciló de 21 a 30 °C por 15 días.

Las evaluaciones se iniciaron cinco días después de la inoculación, para lo cual se utilizó la escala de severidad propuesta por Perelló *et al.* (1998) donde: 1 = libre de infección a mínimas manchas; 2 = 1 a 5%; 3 = 5 a 12%; 4 = 12 a 20%; 5 = 20 a 35%; 6 = 35 a 45%; 7 = 45 a 60%; 8 = 60 a 80%; 9 = más del 80% del área foliar afectada con necrosis y clorosis generalizada. Los datos se transformaron a porcentaje y se les realizó análisis de varianza ANOVA con el programa SAS 9.1.3 (SAS Institute®, EUA). Para estratificar los resultados se hizo comparación de medias de las variedades y aislados mediante la prueba de Fisher (LSD) ( $p \leq 0.05$ ).

En el tejido foliar se aislaron hongos anamorficos de los géneros *Bipolaris* y *Alternaria* debido a la forma de los conidios característicos que tiene cada uno de ellos y al tipo de germinación para el caso de *Bipolaris*.

Zillinsky (1984), Duveiller y García-Altamirano (2000), Sharma y Duveiller (2004), y Mehta (2014) coincidieron con que el único agente causal de la enfermedad conocida como “Spot blotch” es *Bipolaris sorokiniana*, sin embargo, en este estudio se detectó la presencia de *A. alternata*, que puede participar como saprófito o potenciador del daño. Singh *et al.* (1996) consideraron sólo a *Alternaria triticina* como el hongo patogénico asociado al tizón foliar. Mientras que Mehta (2014) afirmó que *A. alternata* se asocia a *B. sorokiniana* para provocar el síntoma de punta negra en el grano de trigo, el cual ocasiona el ennegrecimiento del embrión.

De los aislados obtenidos en este estudio, cuatro se identificaron como *B. sorokiniana* y cuatro como

the means were compared isolated using Fisher’s test (LSD) ( $P \leq 0.05$ ).

In the foliar tissue, we isolated anamorphic fungi of the genera *Bipolaris* and *Alternaria* due to the shape of the characteristic conidia that each one has, and to the type of germination for the case of *Bipolaris*.

Zillinsky (1984), Duveiller and García-Altamirano (2000), Sharma and Duveiller (2004), and Mehta (2014) coincided in that the only causal agent of the disease known as spot blotch is *Bipolaris sorokiniana*, although this study found the presence of *A. alternata*, which can participate as a saprophyte or damage enhancer. Singh *et al.* (1996) considered only *Alternaria triticina* as the pathogenic fungus related to leaf blight. Meanwhile, Mehta (2014) claimed that *A. alternata* is related to *B. sorokiniana* to promote the black dot symptom in wheat grain, which causes the blackening of the embryo.

Out of the isolates obtained in this study, four were identified as *B. sorokiniana* and four as *A. alternata*, according to the analysis of the ITS sequences of the ribosomal DNA. The comparison in the BLASTn of the sequences obtained with accession numbers MF036007–MF036010, showed an identity of 99 to 100% with other ITS sequences of *B. sorokiniana* deposited in the database of the GenBank. Meanwhile, the ITS sequences with an accession numbers of MF036011–MF036014 presented 100% of identity with the sequences deposited in the GenBank, which confirmed the result of the morphological identification of the fungal isolates.

Symptoms were clearly observed in inoculated seedlings with the *B. sorokiniana* isolates, where the disease reached levels of severity of 100% in some genotypes 13 days after inoculation. With this, we standardized temperatures for inoculation and development of the infection process of *B. sorokiniana* and *A. alternata* in the greenhouse,



*A. alternata* de acuerdo al análisis de las secuencias ITS del DNA ribosomal. La comparación en el BLASTn de las secuencias obtenidas con números de acceso MF036007–MF036010, mostraron de 99 a 100% de identidad con otras secuencias ITS de *B. sorokiniana* depositadas en la base de datos del GenBank. Entretanto, las secuencias ITS con número de acceso MF036011–MF036014 presentaron 100% de identidad con las secuencias depositadas en el GenBank, lo que confirmó el resultado de la identificación morfológica de los aislados fúngicos.

Los síntomas se observaron claramente en las plántulas inoculadas con los aislados de *B. sorokiniana*, donde la enfermedad alcanzó niveles de severidad del 100% en algunos genotipos a los 13 días después de la inoculación. Con esto, se estandarizaron las temperaturas para la inoculación y desarrollo del proceso de infección de *B. sorokiniana* y *A. alternata* en invernadero, las cuales fueron de 19 a 21 °C y humedad de 100% por 48 h.

En 2013, la precipitación pluvial en el sur de Sonora fue de baja a escasa por lo que la región es caracterizada como un clima seco y la enfermedad era considerada secundaria (INIFAP, 2016). En 2014 y 2015, la humedad relativa de la región fue alta (60 a 100%), por lo que la enfermedad se presentó de manera contundente (Villa-Rodríguez *et al.*, 2016). Por su parte, Dubin y Bimb (1994) señalaron que en las regiones donde el trigo se cultiva en condiciones de poca lluvia, *C. sativus* (anamorf: *B. sorokiniana*) no solo puede causar pudrición de la raíz, sino que también se transmite por semilla, enfermedad que es conocida como punta negra de los cereales. Por lo que el hongo muestra una gran capacidad de adaptación a las condiciones presentes en el sur de Sonora.

Se presentaron diferencias significativas entre los aislados evaluados. El aislado 3 de *B. sorokiniana* fue el más agresivo en comparación con el

which were between 19 and 21 °C with a humidity of 100% for 48 h.

In 2013, rainfall in southern Sonora ranged from low to scarce, and therefore the region has a characteristically dry weather, and the disease was considered secondary (INIFAP, 2016). In 2014 and 2015, the relative humidity of the region was high (60 to 100%), and therefore the disease was overwhelming (Villa-Rodríguez *et al.*, 2016). On the other hand, Dubin and Bimb (1994) pointed out that in regions in which wheat is grown under conditions of scarce rainfall, *C. sativus* (anamorph: *B. sorokiniana*) can not only cause rotting of the root but is also transmitted via the seeds, a disease known as black point in cereals. The fungus, therefore, displays a great ability to adapt to the conditions found in southern Sonora.

Significant differences were observed between the isolates evaluated. Isolate 3 of *B. sorokiniana* was the most aggressive than isolate 4. Meanwhile, isolates 1 and 2 were similar to each other (Table 1). This agrees with findings in studies by Zhong and Steffenson (2001), Chand *et al.* (2003), Ghazvini and Tekauz (2007), in which they indicated the variability of *B. sorokiniana* isolates due to the lack of clear virulence patterns. This leads to suppose that the natural populations could be the result of genetic exchange through the parasexual exchange in the fungus population (Maraite *et al.*, 1998; Duveiller and García-Altamirano, 2000).

Oliveira *et al.* (2002) and Gyawali *et al.* (2012) found high genetic variability between the *B. sorokiniana* isolates in studies using the random amplification of polymorphic DNA, or RAPD, which explains the difference between isolates 3 and 4, observing that isolate 3 caused higher percentages of severity, although there was a large difference between them, since they displayed an average severity of 75% by the isolate 3, and 40% by isolate 4. By contrast, Mann *et al.* (2014)

aislado 4. Mientras que los aislados 1 y 2 fueron similares entre sí (Cuadro 1). Lo anterior concuerda con lo obtenido en los estudios de Zhong y Steffenson (2001), Chand *et al.* (2003), Ghazvini y Tekauz (2007), donde indicaron la variabilidad de aislados de *B. sorokiniana* al no mostrar patrones de virulencia claros. Esto nos permite suponer que las poblaciones naturales podrían ser el resultado de intercambio genético a través de la recombinación parasexual en la población de hongos (Maraite *et al.*, 1998; Duveiller y García-Altamirano, 2000).

Oliveira *et al.* (2002) y Gyawali *et al.* (2012) encontraron variabilidad genética alta entre los aislados de *B. sorokiniana* en estudios usando la am-

reported a low variability between isolates that they evaluated and concluded that there have been no genetic changes in the population of the pathogen in the last 15 years. This could explain the behavior of isolates 1 and 2, which displayed less aggressiveness, with an average of 51 and 53%, respectively.

The four isolates of *B. sorokiniana* turned out to be pathogenic for the 19 wheat cultivars and they also showed statistically significant differences ( $P=0.0001$ ) in terms of aggressiveness. Likewise, under greenhouse conditions, it was possible to differentiate and select genotypes such as highly susceptible, susceptible, moderately

**Cuadro 1. Severidad de la infección de cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* en variedades de trigo harinero y cristalino.**

**Table 1. Severity of the infection of four *Bipolaris sorokiniana* isolates in bread and durum wheat cultivars.**

Harineros	Aislado 1	Aislado 2	Aislado 3	Aislado 4
Kronstad F2004	33 stuv <sup>x</sup>	29 t	45 s	19.5 s
Urbina S2007	58.2 lmnop	59.7 ghijklm	92.5 abcde	47.8 klmn
Nana F2007	29 tuvwx	74 ab	91 bcde	52.5 cdefg
Villa Juárez F2009	64.5 efghij	54 ijklmn	94 abcd	27.5 opqr
Borlaug 100 F2014	63.2 bcdefg	55 ijklmn	86.2 ab	46.5 ghij
Línea avanzada C	66.5 defghi	64 cdefg	94.5 abcd	50 defgh
PBW343	80 a	72 abcde	92 bcde	54 abcde
Bacanora T88	76 ba	73.5 abc	95 abc	53 cdef
Morocco	57.5 jklmn	64.5 bcdefg	100 a	54.5 bcde
Bárceñas S2002	65 efghij	77.5 a	100 a	58 bc
Luminaria F2012	60 ghijkl	72.5 abcd	95 abc	61.5 b
Maya S2007	69 fbdec	80 a	93.5 abcde	69.5 a
Vicam S70	26.5 uvwx	29.5 ts	33 t	21.6 rs
Cristalinos	Aislado 1	Aislado 2	Aislado 3	Aislado 4
CIRNO C2008	29 fgh	27.5 gf	68.5 f	24 f
Conasist C2015	35 ef	34 ef	66 f	29 def
Río bravo C2016	24.5 h	23.5 g	48.5 h	32.5 cde
Línea avanzada JC	45.5 cd	48 cd	90 bc	43.5 b
Local red	84 a	79.5 a	100 a	60.5 a
Noio	53.5 b	62 b	91.5 b	54.5 a

<sup>x</sup>Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes significativamente de acuerdo con la prueba LSD ( $P\leq 0.05$ ) / <sup>x</sup>Means with the same letter in each column are not significantly different, according to the LSD test ( $P\leq 0.05$ ).

plificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) con lo que se explica la diferencia entre los aislados 3 y 4, observándose que el aislado 3 causó mayores porcentajes de severidad, sin embargo, hubo una gran diferencia entre ellos, ya que mostraron una media de severidad de 75% en el aislado 3, y de 40% en el aislado 4. En contraste, Mann *et al.* (2014) reportaron una variabilidad baja entre los aislados que evaluaron y concluyeron que no hay cambios genéticos en la población del patógeno durante los últimos 15 años. Esto podría explicar el comportamiento de los aislados 1 y 2, los cuales mostraron menor agresividad con una media de 51 y 53%, respectivamente.

Los cuatro aislados de *B. sorokiniana* resultaron ser patogénicos para las 19 variedades de trigo, además que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.0001$ ) en cuanto a agresividad. Asimismo, bajo condiciones de invernadero se pudo diferenciar y seleccionar a los genotipos como: altamente susceptibles, susceptibles, moderadamente susceptibles y moderadamente resistentes. Sin embargo, las plantas inoculadas con *A. alternata* no mostraron diferencias estadísticas significativas, de tal forma que no se pudo caracterizar la severidad de la enfermedad en las distintas variedades de trigo evaluadas.

La evaluación en la presente investigación se realizó tomando como patrón los síntomas característicos de la enfermedad, los cuales son lesiones pequeñas marrón oscuro, de 1–2 mm de longitud, sin un margen clorótico. En los genotipos susceptibles, estas lesiones se extendieron rápidamente para formar manchas ovales alargadas de color marrón claro y oscuro que alcanzaron varios centímetros de longitud antes de la coalescencia resultando en la muerte del tejido. Se apreció una abundante producción de conidios en las lesiones viejas acompañadas de clorosis que se difunde desde el borde de la lesión, esto pudo deberse a la producción

susceptible and moderately resistant. However, plant inoculated with *A. alternata* did not display significant differences, and so it was not possible to characterize the severity of the disease in the different wheat cultivars evaluated.

The evaluation in this investigation was carried out taking as a pattern the characteristic symptoms of the disease, which are small, dark maroon lesions, 1 to 2 mm in length, without a chlorotic margin. In susceptible genotypes, these lesions extend quickly to form light and dark maroon, elongated, oval stains that reach up to several centimeters in length before coalescing, resulting in tissue death. Abundant conidia were produced in the old lesions, along with chlorosis that spreads from the edge of the lesion, which could be caused by the production of toxins, as stated by Mercado-Vergnes *et al.* (2006). These symptoms are produced depending on the type of host, although they coalesce in the same way, regardless of the genotype (Mercado-Vergnes *et al.*, 2006).

All cultivars displayed significant differences to the susceptibility of *B. sorokiniana*, although isolate 3 was observed to be the most aggressive. The resistant cultivars to isolate 3 could be considered in a future experiment on selection for resistance. Meanwhile, isolates 1, 2 and 4 had significant differences in severity with isolate 3.

Based on the Fetch and Steffenson scale (1999), cultivars are considered highly susceptible when their percentage is higher than 90%, establishing the cvs. Bárcenas S2002, Morocco, Bacanora T88, Luminaria F2012, advanced line C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343, and Nana F2007 in this range (Table 1).

No bread wheat cultivars were observed to be resistant to the evaluated isolates of *B. sorokiniana*, although the cvs. Vicam S70 and Kronstad F2004 behaved as moderately resistant. The remaining bread wheat cultivars were moderately susceptible



de toxinas como lo afirmó Mercado-Vergnes *et al.* (2006). Este tipo de síntomas se producen dependiendo del tipo de hospedante, pero llegan a coalescer de la misma forma, independientemente del genotipo (Mercado-Vergnes *et al.*, 2006).

Todas las variedades mostraron diferencias significativas a la susceptibilidad a *B. sorokiniana*, sin embargo, se observó que el aislado 3 fue el más agresivo. Las variedades resistentes al aislado 3 podrían ser consideradas posteriormente en un experimento de selección para resistencia. Entretanto los aislados 1, 2 y 4 tuvieron diferencias significativas de severidad en comparación con el aislado 3.

Con base en la escala de Fetch y Steffenson (1999), se considera a las variedades altamente susceptibles al tener un porcentaje mayor al 90%, estableciendo en este rango a las variedades de trigo harinero Bárcenas S2002, Morocco, Bacanora T88, Luminaria F2012, la línea avanzada C, Villa Juárez F2009, Maya S2007, Urbina S2007, PBW343 y Nana F2007 (Cuadro 1).

No se observaron variedades de trigo harinero resistentes a los aislados evaluados de *B. sorokiniana*, sin embargo, las variedades Vicam S70 y Kronstad F2004, se comportaron como moderadamente resistentes. El resto de las variedades de trigo harinero fueron moderadamente susceptibles y susceptibles. Los resultados obtenidos se fundamentan con lo mencionado por Da Luz y Bergstrom (1986) y Duveiller y Dubin (2002), quienes observaron variaciones de la agresividad del patógeno y que estas no tienen relación con el genotipo evaluado.

En cuanto a los trigos cristalinos, las variedades altamente susceptibles fueron Local Red, Noio y la línea avanzada JC, mientras que Río Bravo C2016 se consideró como moderadamente resistente. De acuerdo a la escala de Fetch y Steffenson (1999), la variedad CIRNO C2008 se comportó como moderadamente susceptible a *B. sorokiniana*.

and susceptible. The results obtained are based on statements by Da Luz and Bergstrom (1986) and Duveiller and Dubin (2002), who observed variations in the aggressiveness of the pathogen and the fact that they have no relation with the genotype evaluated.

Regarding durum wheat, the cvs. Local Red, Noio and advanced line JC were highly susceptible, while Río Bravo C2016 was considered moderately resistant. According to the Fetch and Steffenson scale (1999), cv. CIRNO C2008 behaved as moderately susceptible to *B. sorokiniana*.

Cultivars Bárcenas S2002 and Morocco reached 100% severity for *Bipolaris sorokiniana*. The cultivar Borlaug 100 F2014 is resistant to leaf rust and yellow rust, as well as a moderate resistance to Karnal bunt and black point, including *B. sorokiniana* and *Alternaria* spp. (Mehta, 2014). According to Valenzuela-Herrera *et al.* (2012), the cv. Villa Juárez F2009 presents the same resistance as Borlaug 100 F2014, and it is considered moderately susceptible to the black point in grains. However, in this investigation, both cultivars were susceptible, showing maximum infection levels of 94 and 86%, respectively, to the infection by *B. sorokiniana*.

Solís-Moya *et al.* (2014) observed that the cvs. Luminaria F2012, Maya S2007 and Urbina S2007 are resistant to linear yellow rust and moderately resistant to leaf rust, although they do not mention resistance to blight, although in this study, these cultivars behave as susceptible to *B. sorokiniana*.

The cv. PBW343 is reported as moderately resistant to leaf rust and yellow rust, but susceptible to Ug99 stem rust and resistant to RTR stem rust in Mexico (Huerta-Espino and Singh, 2000), but in this investigation, it behaved as highly susceptible to *B. sorokiniana*.

The cv. Vicam S70 is considered resistant to spot blotch, but susceptible to yellow rust and leaf

Las variedades Bárcenas S2002 y Morocco alcanzaron el 100% de severidad a *Bipolaris sorokiniana*. La variedad Borlaug 100 F2014 posee resistencia a roya de la hoja y roya amarilla, además de tener una moderada resistencia al carbón parcial y a la punta negra dentro de las cuales se incluye a *B. sorokiniana* y *Alternaria* spp. (Mehta, 2014). Según Valenzuela-Herrera *et al.* (2012), la variedad Villa Juárez F2009 presenta la misma resistencia de Borlaug 100 F2014, y es considerada moderadamente susceptible a la punta negra del grano. Sin embargo, dentro de esta investigación ambas variedades fueron susceptibles mostrando niveles de infección máximos de 94 y 86% respectivamente a la infección por *B. sorokiniana*.

Solís-Moya *et al.* (2014) observaron que las variedades Luminaria F2012, Maya S2007 y Urbina S2007 son resistentes a la roya lineal amarilla y moderadamente resistentes a la roya de la hoja, pero no mencionaron la resistencia a tizones, aunque, en este estudio esas variedades se comportaron como susceptibles a *B. sorokiniana*.

La variedad PBW343 se reporta como moderadamente resistente a la roya de la hoja y roya amarilla, pero susceptible a la roya del tallo raza Ug99 y resistente a la raza RTR de roya del tallo en México (Huerta-Espino y Singh, 2000), pero en esta investigación se comportó como altamente susceptible a *B. sorokiniana*.

La variedad Vicam S70 es considerada como resistente a la mancha borrosa, pero susceptible a la roya amarilla y roya de la hoja, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este experimento, ya que su reacción fue de moderada resistencia a *B. sorokiniana*. Local red es considerada como susceptible a royas del trigo y es utilizado como progenitor en los programas de mejoramiento genético de trigo (Bárcenas-Santana *et al.*, 2016); Sustentando con esto a los resultados obtenidos y clasificando a Local Red como altamente susceptible a

rust, which coincides with the results obtained in this experiment, since its reaction was of moderate resistance to *B. sorokiniana*. Local red is considered susceptible to wheat rusts and was used as a parent in wheat breeding programs (Bárcenas-Santana *et al.*, 2016); this is based on the results obtained and classifying Local Red as highly susceptible to *B. Sorokiniana*. Likewise, the cultivar of durum wheat Noio used experimentally as susceptible to stem rust, but resistant to leaf rust and yellow rust; in this study it behaved as susceptible to *B. sorokiniana*. Within the resistance to *B. sorokiniana* in durum wheat, it was observed that advanced line JC is highly susceptible and Conasist C2015 is moderately resistant.

On the other hand, for the case of isolates of *A. alternata*, a variance analysis was not performed, since most of these had a low percentage of severity according to the scale used, which ranged between 1 and 5%, and were therefore considered as not significant.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016) claimed that variable temperatures with increases of +1 °C in the average temperature and a relative humidity of 60 to 100% in 2014 and 2015 were probably the main driving force behind the epidemic of spot blotch in wheat in southern Sonora.

This study found that the main causal agent of the spot blotch in wheat in southern Sonora was *Bipolaris sorokiniana*. Also, *Alternaria alternata* is a secondary fungus related to the development of the disease caused by *B. sorokiniana*; likewise, quantitative differences were observed in the aggressiveness of the four isolates of *Bipolaris sorokiniana* evaluated in this study.

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

*B. sorokiniana*, asimismo, la variedad de trigo duro Noio utilizada experimentalmente como susceptible a la roya del tallo, pero resistente a la roya de la hoja y roya amarilla en esta investigación se comportó susceptible a *B. sorokiniana*.

Dentro de la resistencia a *B. sorokiniana* en los trigos cristalinos se observó que la línea avanzada JC es altamente susceptible y Conasist C2015 moderadamente resistente.

Por otra parte, para el caso de los aislados de *A. alternata*, no se realizó un análisis de varianza debido a que la mayoría de estas tuvieron un porcentaje de severidad bajo según la escala utilizada, los cuales estuvieron entre 1 y 5%, considerándose como no significativos.

Villa-Rodríguez *et al.* (2016) afirmaron que temperaturas variables con incrementos de +1 °C de la temperatura media y humedad relativa del 60 al 100% que se presentaron en 2014 y 2015, fueron probablemente las principales fuerzas impulsoras de la epidemia de mancha borrosa en trigo en el sur de Sonora.

Con el presente estudio se encontró que el principal agente causante de la mancha borrosa del trigo en el sur de Sonora fue *Bipolaris sorokiniana*. Además, *Alternaria alternata* es un hongo secundario asociado al desarrollo de la enfermedad causada por *B. sorokiniana*, de igual forma se observaron diferencias cuantitativas en la agresividad de los cuatro aislados de *Bipolaris sorokiniana* evaluados en este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Bárceñas SD, Huerta EJ, Sandoval IJS, Villaseñor MHE, Leyva MSG, Mariscal ALA y Michel AA. 2016. Genética de la resistencia a la roya del tallo en genotipos de trigo cristalino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39:379-384. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v39n4/0187-7380-rfm-39-04-00379.pdf>
- Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD and Smiley RW. 2010. Diseases caused by fungi and

fungus-like organisms. *In: Compendium of wheat diseases and pests*. P. 16-84. Disponible en línea: <https://issuu.com/scisoc/docs/43856>

- Cardona R, y González MS. 2008. Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo *Helminthosporium* asociados al cultivo de arroz en Venezuela. *Bioagro* 20:141-145. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/857/85720209.pdf>
- Chand R, Pandey SP, Singh HV, Kumar S and Joshi AK. 2003. Variability and its probable cause in natural populations of spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana* in wheat (*T. aestivum* L.) in *Indian Journal Plant Disease Protection* 110:27-35. Disponible en línea: <https://www.ulmer.de/artikel.dli>
- Chávez VG, Camacho CMA, Figueroa LP, Fuentes DG, Félix FJL y Villa ABA. 2015. Baroyeca Oro C2013: nueva variedad de trigo duro para su cultivo en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:421-425. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263138086017>
- Da Luz WC and Bergstrom GC. 1986. Effect of temperature on tan spot development in spring wheat cultivars differing in resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 8:451-454. <https://doi.org/10.1080/07060668609501786>
- Dickson JG. 1956. *Diseases of field crops*. McGraw-Hill Book Company. New York, USA. Toronto, Canada and London, England. 517 p. Disponible en línea: <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.214971>
- Dubin HJ and Bimb HP. 1994. Studies of soilborne diseases and foliar blights of wheat at the National Wheat Research Experiment Station, Bhairahawa, Nepal. *Wheat Special Report No. 36*. CIMMYT. DF, México. Disponible en línea: [https://books.google.com.mx/books?id=wRUXQokNpZwC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=wRUXQokNpZwC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Duveiller E and García AI. 2000. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. *Plant Pathology* 49:235-242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00443.x>
- Duveiller E and Dubin HJ. 2002. *Helminthosporium* leaf blights: Spot blotch and tan spot. *In: Curtis BC, Rajaram S, Gomez MH (eds), Bread Wheat: Improvement and Production, Plant Production and Protection*. Rome, Italy. FAO. 30:285-299. Disponible en línea: <http://repository.cimmyt.org:8080/xmlui/bitstream/handle/10883/1229/64956.pdf>
- Fetch TG and Steffenson BJ. 1999. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease* 83:213-117. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.213>
- Figueroa LP, Félix FJL, Fuentes DG, Valenzuela HV, Chávez VG and Mendoza LJA. 2010. CIRNO C2008, nueva variedad de trigo cristalino con alto rendimiento potencial para el estado de Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:745-749. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n5/v1n5a16.pdf>
- Fuentes DG, Figueroa LP, Camacho CMA, Chávez VG y Félix FJL. 2014. 'Quetchehueca Oro C2013', nueva variedad de trigo cristalino para el noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 399-401. Disponible en línea: <https://>

- www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/37-4/11a.pdf
- Ghazvini H and Tekauz A. 2007. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease* 91:814-821. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0814>
- Gyawali S, Neate SM, Adhikari TB, Puri KD, Burlakoti RR and Zhong S. 2012. Genetic structure of *Cochliobolus sativus* populations sampled from root and leaves of barley and wheat in North Dakota. *Journal of Phytopathology* 160:637-646. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01956.x>
- INIFAP. 2016. México Estación Meteorológica Block-1201, Cajeme, Sonora. Disponible en línea: <http://clima.inifap.gob.mx/Inmysr/Historicos/Datos?Estado=25&Estacion=26858&Anio=2015&Mes=10> (consultado, octubre 2016)
- Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Van Der Sand ST. 2014. Genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates Using URP-PCR. *Tropical Plant Pathology* 39:163-171. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000200007>
- Maraite H, Zinno DT, Longree H, Daumerie V and Duveiller E. 1998. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A. (eds), *Proceedings of the Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot Workshop*. El Batán, Mexico, Mexico, DF. CIMMYT. pp. 293-300. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1229/64956.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mehta YR. 2014. *Wheat Diseases and Their Management*. Springer International Publishing Switzerland, Instituto Agronómico de Paraná-IAPAR Londrina, Paraná, Brazil. 265 p. Disponible en línea: <https://www.springer.com/gb/book/9783319064642>
- Mercado VD, Renard ME, Duveiller E, Maraite H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55:485-493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01391.x>
- Oliveira AMR, Matsumura TS, Prestes AM and Van der Sand ST. 2002. Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Genetic and Molecular Research* 1:350-358. Disponible en línea: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol4-1/pdf/gmr0042.pdf>
- Perelló A, Sistrina MN and Cortese P. 1998. Scale for appraising the leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticimaculans*. *Cereal Research Communications* 26:2. Disponible en línea: [https://www.jstor.org/stable/23785292?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/23785292?seq=1#page_scan_tab_contents)
- Saari EE. 1998. Leaf blight diseases and associated soilborne fungal pathogens of wheat in South and Southeast Asia. In: Duveiller E, Dubin HJ, Reeves J, McNab A, (Eds.). *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*. Proceedings of an International Workshop Held at CIMMYT. El Batán, México. pp. 37-51. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?id=ISr137u-SAS> Institute. Inc. 2005. SAS Version 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sharma RC and Duveiller E. 2004. Effect of *Helminthosporium* leaf blight on performance of timely and late-seeded wheat under optimal and stressed levels of soil fertility and moisture. *Field Crops Research* 89: 205-218. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.02.002>
- Singh RV, Singh AK and Singh SP. 1996. Distribution of Pathogens Causing Foliar Blight of Wheat in India and Neighboring Countries. Department of Plant Pathology, N.D. University of Agriculture and Technology Kumarganj, Uttar Pradesh, India. pp. 59-62. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=ISr137u>
- Solis ME, Huerta EJ, Villaseñor MHE, Pérez HP, Ramírez RA, Ledesma RL y De La Cruz G M. 2014. Luminaria F2012, nueva variedad de trigo harinero para riego restringido en El Bajío. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:325-330. Disponible en línea: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/art%C3%ADculo\\_redalyc\\_263129784013.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/art%C3%ADculo_redalyc_263129784013.pdf)
- Valenzuela HV, Fuentes DG, Figueroa LP, Chávez VG, Félix FJL y Mendoza LJA. 2012. Villa Juárez F2009, variedad de trigo harinero para el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:1447-1451. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000700014](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000700014)
- Villa RE, Lugo EC, De los Santos VS, Parra CFI and Figueroa LP. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in The Yaqui Valley, Mexico. *Plant Disease* 100:11, 2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetic. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). Academic Press, New York, USA. pp. 315-322. Disponible en línea: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhong S and Steffenson BJ. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91:469-476. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2001.91.5.469>
- Zillinsky FJ. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. México, D.F., México, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 141 p. Disponible en línea: <http://repository.cimmyt.org>