

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

**VOLUMEN 37, NÚMERO 3, Septiembre 2019**



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

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

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

**Editora Técnica \* Technical Editor**

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

**Composición Web y RMFito \* Web and RMFito Composition**

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, COLPOS, LANREF

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, COLPOS, LANREF

**Editoras Adjuntas \* Senior Editors**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

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

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA

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

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA

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

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, COLPOS

Dra. Magnolia Moreno Velázquez, SENASICA

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, CIATEJ

M.C. Verónica Inés Martínez Bustamante, COLPOS, LANREF

Dr. Luis Pérez Moreno, Universidad de Guanajuato

Dr. Elías Hernández Castro, UAGro.

M.C. Lervin Hernández Ramos, SENASICA

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, CIAD

Dr. Luis Fernando Ceja Torres, IPN

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, UASLP

Dr. José Abel López Buenfil, SENASICA

Dr. Raúl Díaz Moreno, UJED

---

**Portada:** Bandeado clorótico y manchas necróticas *Lycaste virginalis* (Izquierda). Variegado y coloración púrpura en flor de *Barkeria scandens* (Superior derecha). Mosaico y lesiones necróticas en *Cattleya lobata* (Inferior derecha).

**Original:** Ochoa-Martínez DL, Pérez-García EA, Carrillo-Benítez MG, Zamora-Macorra EJ y Orozco-Cirilo D, pág. 426.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS \* SCIENTIFIC ARTICLES

***Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico** \* *Botrytis cinerea* 365  
causante del moho gris en frutos de zarzamora en México.  
Terrones-Salgado J, Nieto-Angel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortiz D, García-Velasco R, Vallejo-  
Pérez MR and Sánchez-García P.

**PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot** \* Detección por 383  
PCR de *Guignardia bidwellii*, agente causal de la pudrición negra de la vid.  
Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Preuss-Angeles AK, Ronces-Frutos LE,  
Morales-González I, Carrillo-Ortiz N and Cárcamo-Rodríguez A.

**Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to 399**  
**pathogens in citrus including CLas and CTV** \* Identificación y clonación de tres genes  
endógenos que pueden conferir resistencia a patógenos en cítricos incluyendo CLas y CTV.  
Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-  
Paz A.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS \* PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

***Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in various genera of 421**  
**cultivated orchids in Mexico** \* *Cymbidium mosaic virus* y *Odontoglossum ringspot virus*  
en diversos géneros de orquídeas cultivadas en México.  
Ochoa-Martínez DL, Pérez-García EA, Carrillo-Benítez MG, Zamora-Macorra EJ and  
Orozco-Cirilo D.

**Host suitability of five populations of wild tomato (*Solanum lycopersicum* var. 432**  
***cerasiforme*) for nematode *Nacobbus aberrans sensu lato*** \* Aptitud de cinco poblaciones  
de jitomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) como hospedante del  
nematodo *Nacobbus aberrans sensu lato*.  
Cazares-Álvarez EE, Méndez-Inocencio C, Zepeda-Jazo I, Fernández-Herrera E, Medina-  
Medrano JR and Villar-Luna E.

**Phyllody of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) associated to *Candidatus* phytoplasma 444**  
**asteris** \* Filodia de la margarita (*Dimorphotheca sinuata*) asociada a *Candidatus*  
phytoplasma asteris.  
Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI and Gutiérrez-Gallegos JA.

**Etiology Strawberry dry wilt (*Fragaria* spp.) in Morelos, Mexico** \* Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. 454  
Bárceñas-Santana D, Guillén-Sánchez D, Yazmín-Basaldua C, Ramos-García ML and Valle-de la Paz M.

**Distribution, incidence and severity of the dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico** \* Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México. 464  
Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Perales-Rosas D, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M, Ariza-Flores R and Gijón-Hernán AR.

**REPORTES FITOPATOLÓGICOS \* PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS**

**First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico** \* Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México. 479  
Contreras-Pérez M, Santoyo-Pizano G, de los Santos-Villalobos S, Gutiérrez-García MA, Orozco-Mosqueda MC and Rocha-Granados MC.

# *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico

## *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México

José Terrones-Salgado, Daniel Nieto-Angel\*, Cristian Nava-Díaz, Daniel Téliz-Ortiz, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Rómulo García-Velasco, Centro Universitario UAEM Tenancingo. Km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. Estado de México, CP 52400, México; Moisés Roberto Vallejo-Pérez, CONACyT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Álvaro Obregón No. 64, Colonia Centro, San Luis Potosí, San Luis Potosí, CP 78000, México; Prometeo Sánchez-García, Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230 México. \*Autor para correspondencia: dnieto@colpos.mx.

Recibido: 01 de Junio, 2019.

Aceptado: 23 de Julio, 2019.

Terrones-Salgado J, Nieto-Angel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortiz D, García-Velasco R, Vallejo-Pérez MR and Sánchez-García P. 2019. *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 365-382.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1906-1

Primera publicación DOI: 02 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 02, 2019.

**Resumen.** La zarzamora (*Rubus* sp.) es una frutilla atacada por el género *Botrytis*. En México se desconoce que especies están involucradas con el síntoma de moho gris. El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Botrytis* asociadas a zarzamora. En noviembre-diciembre de 2016, se realizaron muestreos en 17 áreas productoras de zarzamora en México. Se colectaron frutillas con síntomas de moho gris, de las cuales se aislaron y purificaron los aislamientos. Con la técnica de cultivo monospórico, se obtuvieron 211 aislamientos,

**Abstract.** Blackberry (*Rubus* sp.) is a fruit attacked by the fungus genera *Botrytis*. In Mexico, it is unknown which species are associated with the gray mold symptoms. This research aimed to identify the *Botrytis* species associated with blackberry. In November-December of 2016, sampling was carried out in 17 blackberry production regions in Mexico. Fruits with gray mold symptoms were collected, from which fungi were isolated and purified. Two hundred and eleven isolates were obtained using the monosporic method. Isolates clustered in 21 groups based on a multivariate analysis using morphometric, pathogenic and cultural data. For each group, one isolate was selected for molecular characterization. DNA was extracted using AP method, subsequently; polymerase chain reactions of internal transcribed spacer (ITS) were performed using the ITS1 and ITS4 primers. The PCR products were sequenced in both directions with the Sanger method. Based on morphometric, pathogenic and cultural data, and the analysis of ITS sequences, we conclude that the isolates corresponding to *Botrytis cinerea*.

los cuales formaron 21 grupos basado en un agrupamiento por similitud de las características morfológicas, patogénicas y culturales. De cada grupo se eligió un aislamiento y se identificó molecularmente. El ADN se extrajo con el método de Phosphatasa Alcalina (AP), posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región del espacio transcrito interno. (ITS) utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4. El producto de amplificación se secuenció en ambas direcciones con el método de Sanger. Se identificaron diferencias morfológicas, culturales y patogénicas entre los 21 grupos. Basado en la caracterización morfológica, cultural y patogénica, así como el análisis de secuencias de la región ITS se encontró que los aislamientos corresponden a *Botrytis cinerea*.

**Palabras clave:** PCR, análisis de secuencias, patogenicidad, caracterización.

La zarzamora (*Rubus* sp.) se cultiva en todo el mundo. En México para el año 2017 se reportaron 12, 433 ha sembradas con *Rubus* sp. con una producción de 266,764 t. Los principales estados productores en orden de importancia son Michoacán, Jalisco, Colima, Baja California y Estado de México (SAGARPA, 2018). Este cultivo es atacado por fitopatógenos y uno de los principales es el género *Botrytis*, agente causal de la enfermedad conocida como moho gris. Este género incluye cerca de 30 especies descritas (Elad *et al.*, 2014; Ponce de León *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009) y afecta hojas, tallos, flores y frutos en una amplia gama de cultivos, incluyendo frutas y frutillas como zarzamora, arándano, grosella, frambuesas, fresa y uvas (Droby *et al.*, 2009). La infección por el hongo ocurre en campo y permanece quiescente, durante la postcosecha la infección se activa y se desarrolla la enfermedad durante el almacenamiento, transporte o

**Key words:** PCR, sequences analysis, pathogenicity, characterization.

Blackberries (*Rubus* sp.) are planted throughout the globe. In Mexico, for the year 2017, there were reports of 12, 433 ha planted with *Rubus* sp. With a production of 266,764 t. The main producer states, in order of importance are Michoacán, Jalisco, Colima, Baja California and the State of Mexico (SAGARPA, 2018). This crop is attacked by phytopathogens, one of the main ones is the genus *Botrytis*, causal agent of the disease known as gray mold. This genus includes nearly 30 described species (Elad *et al.*, 2014; Ponce de León *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009) and it affects leaves, stem, flowers and fruits in a wide range of crops, including fruits and berries such as blackberries, cranberries, redcurrants, strawberries and grapes (Droby *et al.*, 2009). The infection from the fungus takes place in the field and remains quiescent; during postharvest, the infection becomes activated and it develops the disease during storage, transportation, or even in the market (Calvo *et al.*, 2014; Feliziani and Romanazzi, 2013), causing critical losses (Crisosto *et al.*, 2002; Ippolito and Nigro 2000; Teles *et al.*, 2014).

Infection by the fungus *Botrytis* spp. In blackberry plants manifest themselves as soft rotting in flowers, because they are the most susceptible; on the fruit, light maroon areas appear, which quickly increase in size until the fruit becomes dried and mummified, due mainly to the fruit having a limited shelf life (Droby *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012a). Three species of *Botrytis* have been identified in blackberry fruits: *B. patula* Sacc and Berl., (Sacc. and Berl.) (Holubová, 1974), *B. cinerea* Pers.: Fr., (Farr and Rossman, 2011) and *B. caroliniana* (X. P. Li and Schnabel) (Li *et al.*, 2012a).

incluso en el mercado (Calvo *et al.*, 2014; Feliziani y Romanazzi, 2013), ocasionando graves pérdidas (Crisosto *et al.*, 2002; Ippolito y Nigro 2000; Teles *et al.*, 2014).

La infección del hongo *Botrytis* spp. en plantas de zarzamora se manifiesta como pudrición suave en flores por ser las más susceptibles; en la fruta se observan zonas blandas de color marrón claro que aumentan rápidamente en tamaño hasta secar y momificar el fruto, esto se debe principalmente a que la fruta presenta una vida de anaquel reducida (Droby *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012a). Se han identificado tres especies de *Botrytis* en frutos de zarzamora: *B. patula* Sacc y Berl., (Sacc. y Berl.) (Holu-bová, 1974), *B. cinerea* Pers.: Fr., (Farr y Rossman, 2011) y *B. caroliniana* (X. P. Li y Schnabel) (Li *et al.*, 2012a).

Las especies de *Botrytis* se identifican con base en sus características morfológicas, morfométricas y culturales (Ellis, 1971; Jarvis, 1977), rango de hospedantes y condiciones de crecimiento, donde la morfología del micelio, tamaño y forma de conidios así como número, organización y tamaño de los esclerocios y especificidad de hospedantes son muy importantes para diferenciar especies (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Martínez *et al.*, 2003). El uso de herramientas moleculares se hace imprescindible para complementar la identificación morfológica, por lo que son utilizadas para identificar las especies de *Botrytis* (Lorenzini y Zapparoli, 2014; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). El análisis de secuencias en la región del espacio transcrito interno (ITS) es un método eficiente y común para la identificación de hongos (Elmagid *et al.*, 2013) el cual confirma y refuerza la identificación morfológica y se ha utilizado con éxito para identificar a *Botrytis cinerea* (Aktaruzzaman *et al.*, 2014; Cheon y Jeon, 2013; Nieto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

The *Botrytis* species were identified based on its morphological, morphometric and cultural characteristics (Ellis, 1971; Jarvis, 1977), range of hosts and growth conditions, where the morphology of the mycelium, size and shape of the conidia, as well as the number, organization and size of the sclerotia and specificity of hosts are very important when differentiating species (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini and Zapparoli, 2014; Martínez *et al.*, 2003). The use of molecular tools becomes crucial to complement morphological identification, and are therefore used to identify species of *Botrytis* (Lorenzini and Zapparoli, 2014; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). The analysis of sequences in the region of the internal transcribed spacer (ITS) is an efficient and common method to identify fungi (Elmagid *et al.*, 2013); it confirms and reinforces the morphological identification and has been successfully used to identify *Botrytis cinerea* (Aktaruzzaman *et al.*, 2014; Cheon and Jeon, 2013; Nieto *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

In this context, the aim of this research was to carry out morphological, pathogenic, cultural and molecular identification of *Botrytis* spp. isolations in blackberry crops.

## MATERIALS AND METHODS

**Collection of samples and isolations of *Botrytis* sp.** In the months of November and December of 2016, and based on a randomized collection of samples (Steel *et al.*, 1997), blackberry fruits with symptoms of gray mold were gathered from commercial plantations in 17 municipalities distributed throughout five states in Mexico (Table 1). Each fruit was placed in an individual polyethylene bag, which were then sealed and transported in a cold ice cooler to the lab, where

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue realizar la identificación morfológica, patogénica, cultural y molecular de aislamientos de *Botrytis* spp. en el cultivo de zarzamora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de muestras y aislamiento de *Botrytis* sp.

En los meses de noviembre y diciembre de 2016 y con base en un muestreo al azar (Steel *et al.*, 1997) se colectaron frutos de zarzamora con síntomas de moho gris en plantaciones comerciales de 17 municipios distribuidos en cinco estados de México (Cuadro 1). Cada fruto se colocó en una bolsa de polietileno individual, se sellaron y se transportaron en frío en una hielera al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C (Li *et al.*, 2012a). Posteriormente, las frutillas se colocaron en bolsas de polietileno que contenían toallas de papel estériles humedecidas a temperatura de 20 ± 1 °C y una humedad relativa cercana al 100% (técnica de cámara húmeda) para estimular su esporulación, una vez esporulados los conidios se rasparon, sin tocar la fruta utilizando una aguja de disección estéril, se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se ajustaron a una concentración de conidios de 1 × 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2012a). Posteriormente 200 µL de las suspensiones fueron sembradas en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) (Bioxon, PDA, 39 g L<sup>-1</sup> de agua) modificado con ácido láctico (0.1 % v / v) en cajas Petri, que fueron selladas con Parafilm (Sigma-Aldrich) e incubadas a 20 ± 1 °C, en oscuridad, durante 36 h. Los conidios germinados se purificaron mediante el método de conidio monospórico en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Li *et al.*, 2012a)

**Pruebas de patogenicidad.** Los 211 cultivos monospóricos de *Botrytis* sp. se inocularon en frutos

they were stored at 4 °C (Li *et al.*, 2012a). Later, the berries were placed in polyethylene bags containing moist sterilized paper towels at a temperature of 20 °C ± 1 and a relative humidity of nearly 100% (humid chamber technique) to stimulate its sporulation. Once sporulated, the conidia were scraped without touching the fruit and using a sterilized dissecting needle, they were suspended in 1 mL of sterilized distilled water and adjusted to a conidial concentration of 1 × 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2012a). Next, 200 µL of the suspensions were planted in a PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium (Bioxon, PDA, 39 g L<sup>-1</sup> water) modified with lactic acid (0.1% v / v) in Petri dishes, which were sealed with Parafilm (Sigma-Aldrich) and incubated at 20 ± 1 °C in the dark for 36 h. The germinated conidia were purified using the monosporic conidia method in Petri dishes with a PDA culture medium (Li *et al.*, 2012a).

**Pathogenicity tests.** The 211 *Botrytis* sp. monosporic cultures were inoculated in Tupi variety blackberry fruits in a stage of physiological maturity, which were washed with tap water and disinfested in sodium hypochlorite at 2% for 3 min, then rinsed twice with sterilized distilled water and the excess moisture was eliminated. The inoculation procedure consisted in creating a lesion (using a sterilized dissection needle at a depth of 3 mm) and without a needle placing a 20 µL aliquot of a conidial suspension at a concentration of 1 × 10<sup>5</sup> spores mL<sup>-1</sup> on the fruits; for each isolation, two control fruits were used, on which 20 µL of sterilized distilled water were placed (Saito *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2014). The inoculated fruits and the controls were placed in 15 × 15 cm plastic containers containing dampened sterilized paper towels, sealed to increase relative humidity and incubated at 20 ± 1 °C in the dark under a totally randomized experimental design, inoculating



**Cuadro 1. *Botrytis cinerea* aislado e identificado a partir de frutillas de zarzamora en 17 plantaciones localizadas en cinco estados de México.**  
**Table 1. *Botrytis cinerea*, isolated and identified from blackberry fruits in 17 plantations located in five states in Mexico.**

Estado	Origen (municipio, año)	Altitud (m)	Coordenadas geográficas		Clima	Número de Aislamientos	Especie de Botrytis	Clave	Número de acceso del GenBank ITS1 e ITS4
			X	Y					
Colima	Comala, 2016	600	19.3216	103.753	(A)C(w1)	12	<i>B. cinerea</i>	BP3	MG838558
	Cuahtémoc, 2016	940	19.3335	103.5893	Aw1	12	<i>B. cinerea</i>	BP5	MG838559
	Minatitlán, 2016	872	19.3867	104.0571	Aw2	10	<i>B. cinerea</i>	HAR3	MG838552
Jalisco	Mazamitla, 2016	2500	19.9234	103.0078	C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	2.5	MG838554
	Tuxpan, 2016	1487	19.5585	103.3936	(A)C(wo)	10	<i>B. cinerea</i>	3.1	MG838555
	Zapopan, 2016	1567	20.6724	103.416	C(w1)	6	<i>B. cinerea</i>	4.1	MG838561
México	Zapopan, 2016	1567	20.6732	103.4132	(A)C(wo)	6	<i>B. cinerea</i>	4.4	MG838564
	Texcoco, 2016	2257	19.4548	98.9096	BS1kw	10	<i>B. cinerea</i>	1.6	MG838557
	Tenancingo, 2016	2020	18.9636	99.603	C(w2)	8	<i>B. cinerea</i>	T1	MG838565
	Tenancingo, 2016	2020	18.9654	99.5711	C(w2)	7	<i>B. cinerea</i>	T6	MG838560
	Los Reyes, 2016	1536	19.5898	102.4548	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	5.6	MG838567
Michoacán	Los Reyes, 2016	1536	19.5916	102.4604	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	1.5	MG838570
	Peribán, 2016	1640	19.5196	102.4237	(A)C(w1)	15	<i>B. cinerea</i>	MF21	MG838571
	Zamora, 2016	1580	19.9887	102.3039	(A)C(w1)	10	<i>B. cinerea</i>	4.8	MG838562
	Ziracuaretiro, 2016	1380	19.4157	101.9035	(A)C(wo)	20	<i>B. cinerea</i>	ZF10	MG838556
	Zitácuaro, 2016	1942	19.4332	100.3588	(A)C(wo)	15	<i>B. cinerea</i>	MF12	MG838572
Morelos	Hueyapan, 2016	2340	18.8874	98.6954	C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	HC19	MG838563
	Ocuituco, 2016	1933	18.8776	98.77393	(A)C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	OS5	MG838568
	Tetela del volcán, 2016	2066	18.8935	98.7197	C(w2)	10	<i>B. cinerea</i>	OS10	MG838569
Tlaxcala	Tlaxiaco, 2016	1750	19.3883	104.0442	Aw2	5	<i>B. cinerea</i>	HAR4	MG838553
	Tlaxiaco, 2016	1750	18.8135	98.7507	(A)C(w1)	5	<i>B. cinerea</i>	HC25	MG838566

de zarzamora variedad Tupi en estado de madurez fisiológica, los cuales se lavaron con agua corriente y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y el exceso de humedad fue eliminado. El procedimiento de inoculación consistió en la realización de una herida (con aguja de disección estéril a 3 mm de profundidad) y sin herida, al colocar un alícuota de 20 µL de una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> sobre las frutas, por cada aislamiento se utilizaron dos frutos testigos donde se colocó 20 µL de agua destilada estéril (Saito *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2014). Los frutos inoculados y los testigos se colocaron en recipientes de plástico de 15 × 15 cm que contenían toallas de papel estériles humedecidas con agua destilada estéril sellados para aumentar la humedad relativa y se incubaron a  $20 \pm 1$  °C en oscuridad bajo un diseño experimental completamente al azar inoculando un fruto por aislamiento con cuatro repeticiones con sus respectivos testigos, donde cada aislamiento monospórico fue considerado como un tratamiento. Se midió el diámetro de la lesión cada 24 h finalizando a las 72 h después de la inoculación (hdi). Posteriormente, se realizaron reaislamientos en medio de cultivo PDA para verificar la patogenicidad de los aislamientos inoculados y completar los postulados de Koch, el experimento se realizó dos veces. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Diferencia Mínima Significativa) utilizando el programa SAS V.9.1 para Windows.

**Caracterización morfométrica, morfológica y cultural.** Las variables determinadas a los aislamientos fueron tasa de crecimiento calculada con el crecimiento a las 48 h menos el crecimiento de las 24 h (Zhou *et al.*, 2014), forma de crecimiento y coloración de micelio, días a esporulación, días a formación de esclerocios, número de esclerocios,

one fruit per isolation with four repetitions with their respective controls, where each monosporic isolation was considered as a treatment. The diameter of the lesion was measured every 24 h, ending at 72 h after inoculation (hai). Afterwards, reisolations were carried out in PDA culture to verify the pathogenicity of the inoculated isolations and complete Koch's postulates; the experiment was carried out twice. An analysis of variance was carried out, as well as a comparison of averages (Least Significant Difference) using the program SAS V.9.1 for Windows.

**Morphometric, morphological and cultural characterization.** The variables determined to the isolations were growth rate – calculated with growth at 48 h minus the growth of 24 h (Zhou *et al.*, 2014), growth shape and color of mycelium, days to sporulation, days to formation of sclerotia, number of sclerotia, shape and color of sclerotia (Martínez *et al.*, 2003, Tanovic *et al.*, 2009, Tanovic *et al.*, 2014). The sclerotia, conidia and conidiophores were measured (n=50) (Li *et al.*, 2012) using an OLYMPUS BX 41 compound microscope with an OLIMPUS U-CMAD3 T2, U-TV1X-2 T2 camera (Tokyo, Japan) and the morphometry was carried out using the program ImageJ (Schindelin *et al.*, 2015). The information obtained from the pathogenic, morphological and morphometric characterization was used to carry out a cluster by similarity or by morphotype for the identification of groups and selection of the representative isolations to carry out the molecular characterization.

**Molecular identification.** DNA extraction was carried out using the Alkaline phosphatase (AP) method (Ruiz *et al.*, 2014, Sambrook and Russel, 2001). The regions of the internal transcribed spacer (ITS) were amplified using primers ITS1

forma y color de esclerocios (Martínez *et al.*, 2003, Tanovic *et al.*, 2009, Tanovic *et al.*, 2014). Los esclerocios, conidios y conidióforos fueron medidos (n=50) (Li *et al.*, 2012) en un microscopio compuesto OLYMPUS BX 41 con cámara OLIMPUS U-CMAD3 T2, U-TV1X-2 T2 (Tokio, Japón) y la morfometría se realizó con el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2015). La información obtenida de la caracterización patogénica, morfológica y cultural se utilizó para realizar un agrupamiento por similitud o morfotipos para la identificación de grupos y selección de los aislamientos representativos para realizar la caracterización molecular.

**Identificación molecular.** Se realizó la extracción de ADN mediante el método Phosphatasa Alcalina (AP) (Ruiz *et al.*, 2014, Sambrook y Russel, 2001). Se amplificaron las regiones del espacio transcrita interno (Internal Transcribed Spacer) utilizando los iniciadores ITS1 / ITS4 (Gardes y Bruns 1993; Staats *et al.*, 2005; White *et al.*, 1990) combinado con el programa de termociclado propuestos por White *et al.* (1990). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones con el método de Sanger en la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>, Corea). Las secuencias resultantes se analizaron por DNASTAR (2001) y Sequencher (2014), y la alineación se realizó con Clustal W en MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias se compararon usando el algoritmo BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se depositaron en el GenBank.

## RESULTADOS

En frutos de zarzamora se observaron síntomas de pudrición blanda de color marrón a negra, sobre las cuales creció abundante micelio, conidióforos y conidios que en conjunto forman el moho gris

/ ITS4 (Gardes and Bruns 1993; Staats *et al.*, 2005; White *et al.*, 1990) in combination with the thermocycling program proposed by White *et al.* (1990). TE amplified products were sequenced in both directions using the Sanger method in the company Macrogen (<http://dna.macrogen.com>, Korea). The resulting sequences were analyzed using DNASTAR (2001) and Sequencher (2014), and the alignment was carried out with Clustal W in MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The sequences were compared using the BLAST algorithm of the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and deposited in the GenBank.

## RESULTS

In blackberry fruits, symptoms of soft rotting were observed, colored maroon to black, over which abundant mycelia, conidiophores and conidia grew, altogether forming gray mold (Figure 1A and 1B). Two hundred eleven isolations of *Botrytis* sp. were obtained, isolated from blackberry fruits from different regions in Mexico. The pathogenicity tests confirmed that 100% of the isolations inoculated produced symptoms of gray mold 48 hours after inoculation (hai) on inoculated fruits, with or without lesions, and control fruits displayed no symptoms or signs of the fungus. When performing the morphometric, morphological and cultural characterization, the 211 isolations were identified as *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971; Jarvis, 1977; Martínez *et al.*, 2003). The production areas studied were: Colima, State of Mexico, Jalisco, Michoacán and Morelos, from where 34, 25, 32, 80 y 40 isolations were taken, respectively (Table 1). Clustering by similarity helped identify 21 groups, from which a representative isolation of each was taken; the pathogenic, morphological and molecular description is described below.

(Figura 1A y 1B). Se obtuvieron 21 aislamientos de *Botrytis* sp. aislados de frutos de zarzamora de distintas regiones de México. Las pruebas de patogenicidad confirmaron que el 100% de los aislamientos inoculados produjeron síntomas de moho gris 48 horas después de la inoculación (hdi), en frutos inoculados sin herida como para frutos inoculados con herida, en los frutos testigo no se observaron síntomas o signos del hongo. Al realizar la caracterización morfométrica, morfológica y cultural los 21 aislamientos fueron identificados como *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971; Jarvis, 1977; Martínez *et al.*, 2003). Las zonas productoras estudiadas fueron: Colima, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Morelos, de los cuales se obtuvieron 34, 25, 32, 80 y 40 aislamientos, respectivamente (Cuadro 1). El agrupamiento por similitud permitió identificar 21 grupos, de los cuales se seleccionó un aislamiento representativo de cada uno, la descripción patogénica, morfológica y molecular se menciona a continuación.

**Pruebas de patogenicidad.** De los 21 aislamientos inoculados el 100% fue patogénico en ambos métodos de inoculación, cuando no se realizó herida, los frutos inoculados presentaron síntomas típicos de la enfermedad 48 hdi (Figura 1C), se encontraron diferencias significativas ( $F = 2762.38$ ,  $p < 0.0001$ ) el diámetro de la lesión varió de 4.2 a 15.9 mm., a las 72 hdi el diámetro de lesión varió de 8.6 a 23.1 mm ( $F = 8289.98$ ,  $p < 0.0001$ ). En frutos con herida inoculados, los síntomas típicos se manifestaron 48 hdi existiendo diferencias significativas ( $F = 3551.21$ ,  $p < 0.0001$ ) en el diámetro de lesión el cual osciló de 7.3 a 19.6 mm. A las 72 hdi se mantuvo el comportamiento de los aislamientos, el diámetro de lesión varió de 11.2 a 24.8 mm ( $F = 4287.86$ ,  $p < 0.0001$ ) en todos los casos el aislamiento MF12 fue el más agresivo ya que indujo mayor diámetro de lesión en comparación con

**Pathogenicity tests.** Out of the 21 isolations inoculated, 100% was pathogenic in both inoculation methods. When no lesions were created, the inoculated fruits presented typical symptoms of the disease 48 hai (Figure 1C); significant differences were found ( $F = 2762.38$ ,  $p < 0.0001$ ); the diameter of the lesion varied between 4.2 and 15.9 mm., and at 72 hai the diameter of the lesion varied between 8.6 and 23.1 mm ( $F = 8289.98$ ,  $p < 0.0001$ ). In inoculated fruits with lesions, the typical symptoms manifested 48 hai, with significant differences ( $F = 3551.21$ ,  $p < 0.0001$ ) in the diameter of the lesion, which ranged between 7.3 and 19.6 mm. At 72 hai, the behavior of the isolations stabilized; the diameter of the lesion varied between 11.2 and 24.8 mm ( $F = 4287.86$ ,  $p < 0.0001$ ). In all cases, isolation MF12 was the most aggressive, since it produced the largest lesion diameter in comparison with isolation OS10, which presented the smallest lesion diameters (Table 2). Control fruits presented no symptoms or signs of the fungus (Figure 1C).

**Morphometric, morphological and cultural characterization.** The values of the mycelial growth rate varied between 0.7 cm d<sup>-1</sup> and 1.5 cm d<sup>-1</sup> where isolations 1.6 and 4.4 grew at a slower rate, while isolation MF21 was the quickest to grow (Table 3). The way of growth varied - 80.95% of isolations formed superficial mycelia and 19.05% formed aerial mycelia - as did the color, where 42.86% displayed a light gray color, 38.09% presented a gray color and 19.05%, dark gray, (Figure 1 D-G).

All isolations (100%) formed sclerotia, although isolations MF21 and 4.8 were more precocious, since they formed them 4 days after planting (dap), whereas isolation 4.1 took 11 dah. The shape of the sclerotia varied: 66.67% were irregular and 33.33% were round (Figure 1 H-J). The number of sclerotia formed in the Petri dish was 26 (isolation

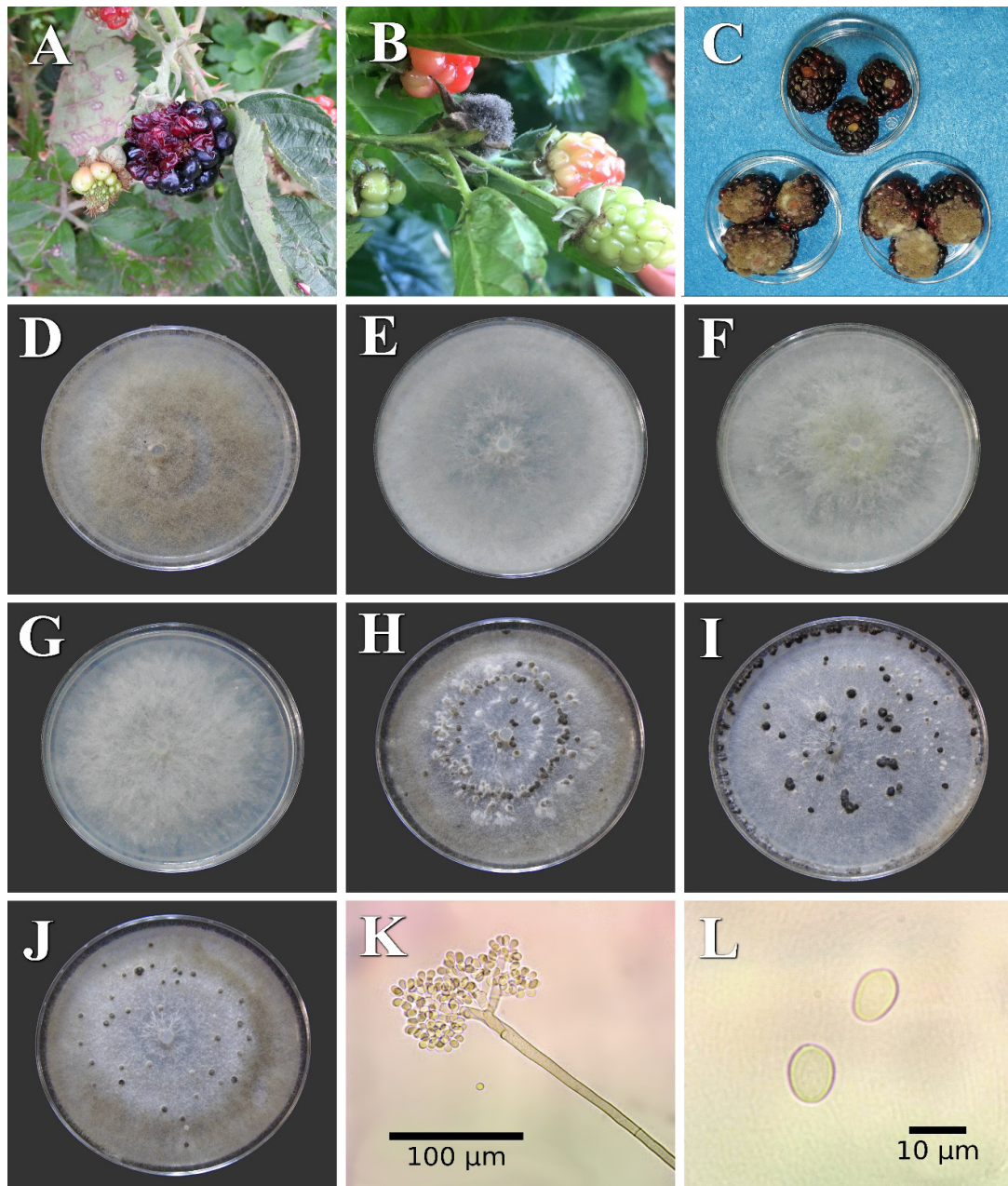


Figura 1. Características morfológicas de *B. cinerea* A. Fruto de zarzamora con síntomas en campo. B. Fruto de zarzamora con signos en campo. C. Parte superior, frutos de zarzamora inoculados con agua destilada estéril, parte inferior frutos enfermos inoculados con *B. cinerea*. D, E, F y G. Diferentes formas de crecimiento y coloración de micelio. H, I y J. Forma, color, número y disposición en el medio de cultivo PDA de esclerocios. K. Conidióforo con conidios. L. Conidios.

Figure 1. Morphological characteristics of *B. cinerea* A. Blackberry fruit with symptoms in the field. B. Blackberry fruit with signs in the field. C. Top section, blackberry fruits inoculated with sterilized distilled water, bottom section diseased fruits inoculated with *B. cinerea*. D, E, F and G. Different growth forms and color of mycelium. H, I and J. Shape, color, number and disposition in the PDA growth medium of sclerotia. K. Conidiophore with conidia. L. Conidia.

el aislamiento OS10 el cual presentó los menores diámetros de lesión (Cuadro 2). En los frutos testigo no se observaron síntomas o signos del hongo (Figura 1C).

**Caracterización morfométrica, morfológica y cultural.** Los valores de la tasa de crecimiento del micelio varió de 0.7 cm d<sup>-1</sup> a 1.5 cm d<sup>-1</sup> donde los aislamientos 1.6 y 4.4 crecieron más lento mientras que el aislamiento MF21 fue el más rápido en crecer (Cuadro 3). La forma de crecimiento varió, el 80.95% de los aislamientos formaron

ZF10) to 333 (isolation MF21) (Table 3) and the largest sclerotia were formed by isolation 1.6, sized 2.5-(3.1)-4 × 2.0-(2.5)- 3.5 mm and isolation HC19 formed the smallest, sized 0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1 mm (Table 3).

All isolations sporulated, and isolations MF21 and HC19 were the most aggressive, sporulating 9 dap, in comparison with isolation 1.5, which took place 20 dap. Conidia observed were erect, septated, branched maroon to olive in color, and the largest ones were formed by isolation HC19 with a size of 1175-1694 × 8-17 μm, whereas the

**Cuadro 2. Diámetro de lesión (mm) ocasionado por *B. cinerea* en frutos de zarzamora 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi).**

**Table 2. Diameter of lesion (mm) caused by *B. cinerea* in blackberry fruits 48 and 72 hours after inoculation (hai).**

Aislamiento	Diámetro (mm) (48 hdi)		Diámetro (mm) (72 hdi)	
	Con herida	Sin herida	Con herida	Sin herida
MF21	19.6 a <sup>z</sup>	15.9 a	24.8 a	23.1 a
4.8	16.1 b	13.2 d	20.9 b	18.1 bc
ZF10	16.1 b	13.4 c	20.1 c	18.1 b
MF12	15.9 b	13.7 b	19.9 d	17.9 cd
5.6	15.9 b	13.2 d	19.7 e	17.9 d
1.5	15.6 c	13.2 d	19.7 e	17.6 e
2.5	13.6 d	10.8 e	18.6 f	16.7 f
3.1	13.6 d	10.7 f	18.6 f	16.7 f
4.4	13.5 d	10.5 g	18.5 f	16.6 f
4.1	13.5 d	10.7 f	18.5 f	16.7 f
BP3	12.4 e	9.2 h	17.1 g	14.6 g
HAR3	12.4 e	9.3 h	16.9 g	14.3 i
BP5	12.2 f	9.2 h	16.9 g	14.4 h
T6	11.9 g	8.9 i	15.8 i	13.0 k
1.6	11.9 g	8.8 j	15.9 h	13.1 j
T1	11.8 g	9.0 i	16.0 h	13.2 j
HC25	9.9 h	6.9 k	13.6 j	11.1 m
OS5	9.9 h	6.9 k	13.3 k	10.9 m
HC19	9.9 h	6.9 k	13.6 j	11.2 l
HAR4	9.9 h	7.0 k	13.4 k	11.1 m
OS10	7.3 i	4.2 l	11.2 l	8.6 n
Testigo	0 j	0 m	0 m	0 o

<sup>z</sup> Los valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (\*= p≤0.05) según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) / <sup>z</sup> Mean values followed by the same letters in the same column are statistically equal (\*= p≤0.05) according to the Least Significance Difference (LSD) test.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento y características morfológicas y morfométricas de 21 aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de frutos de zarzamora.  
Table 3. Growth rate and morphological and morphometric characteristics of 21 isolations of *B. cinerea* obtained from blackberry fruits.

Aislamiento <i>B. cinerea</i>	Crecimiento (cm d <sup>-1</sup> )	Color micelio	Esclerocios			No. por caja	Conidios		
			Forma <sup>x</sup>	Tamaño (mm) <sup>z</sup>	Tamaño Conidioforo (µm)		Forma <sup>y</sup>	Tamaño (µm) <sup>z</sup>	
MF21	1.5	Gris oscuro	I	1.3-(1.6)-1.9 × 0.9-(1.3)-1.6	1163-1795 × 8-17	333	E	6.4-(9.4)-12.2 × 5.3-(7.0)-8.6	
ZF10	1.3	Gris claro	I	1.8-(2.3)-3.2 × 1.3-(1.7)-2.5	957-1393 × 7-16	26	R	7.4-(10.2)-12.7 × 5.7-(8.8)-11.2	
HC25	1.3	Gris claro	I	1.6-(2.3)-3.4 × 1.0-(1.7)-2.3	948-1404 × 7-16	37	A	7.0-(9.0)-11.6 × 5.2-(5.9)-6.9	
OS5	1.2	Gris claro	I	1.3-(1.8)-2.5 × 1.1-(1.4)-2.0	1073-1585 × 8-17	115	A	5.9-(8.5)-11.0 × 5.2-(6.8)-9.7	
OS10	1.2	Gris claro	I	1.1-(1.9)-2.4 × 0.9-(1.6)-2.7	1005-1593 × 8-17	47	A	5.6-(8.7)-10.3 × 5.2-(6.5)-8.0	
HAR4	1.2	Gris claro	I	1.3-(1.9)-2.5 × 0.8-(1.3)-1.8	859-1437 × 7-16	73	E	7.0-(8.5)-10.2 × 5.3-(6.6)-7.8	
1.5	1.1	Gris oscuro	R	1.2-(1.6)-1.9 × 0.9-(1.2)-1.4	941-1605 × 8-16	255	R	6.2-(8.5)-13.4 × 4.7-(6.6)-9.0	
HC19	1.1	Gris claro	I	0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1	1175-1694 × 8-17	73	E	6.2-(8.7)-10.7 × 5.9-(7.2)-8.6	
BP3	1.0	Gris claro	R	1.3-(1.9)-2.5 × 0.8-(1.3)-1.8	1023-1845 × 8-18	86	A	6.7-(8.1)-9.6 × 4.9-(6.3)-7.3	
T6	1.0	Gris	I	2.0-(2.8)-3.6 × 1.5-(2.0)-2.8	1051-1744 × 8-17	101	E	6.9-(8.5)-9.7 × 5.9-(6.8)-7.8	
HAR3	0.9	Gris claro	I	1.4-(1.7)-1.9 × 1.1-(1.2)-1.4	1156-1734 × 8-17	128	E	7.5-(8.8)-10.6 × 5.6-(7.1)-8.4	
MF12	0.9	Gris oscuro	I	1.6-(2.2)-3.8 × 1.3-(1.8)-2.3	1073-1606 × 8-17	112	E	6.7-(8.7)-10.8 × 5.4-(6.6)-8.5	
5.6	0.9	Gris claro	I	1.4-(1.8)-2.8 × 1.0-(1.4)-1.8	967-1531 × 8-16	219	E	8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)-7.9	
T1	0.9	Gris	R	1.9-(2.3)-3.3 × 1.2-(1.8)-2.5	919-1504 × 8-16	188	R	7.3-(9.0)-10.9 × 5.7-(6.6)-7.4	
4.1	0.9	Gris	I	1.3-(1.6)-2.1 × 1.1-(1.3)-1.7	1053-1682 × 8-17	281	E	6.6-(8.3)-10.8 × 5.5-(6.7)-8.2	
3.1	0.8	Gris	R	1.5-(2.0)-2.3 × 1.3-(1.5)-1.7	963-1701 × 8-17	70	E	7.1-(9.1)-11.9 × 5.6-(6.2)-7.0	
BP5	0.8	Gris	R	1.6-(2.1)-2.5 × 1.2-(1.5)-1.9	983-1593 × 8-16	113	R	6.4-(8.4)-9.9 × 5.5-(6.7)-7.8	
2.5	0.8	Gris	I	2.0-(2.4)-2.7 × 1.5-(2.1)-2.7	846-1492 × 6-15	49	E	6.9-(8.7)-12.1 × 5.4-(6.6)-7.6	
4.8	0.8	Gris oscuro	R	2.0-(2.2)-2.6 × 1.3-(1.5)-1.8	1083-1639 × 8-17	76	E	6.4-(9.4)-12.4 × 5.8-(6.7)-8.7	
4.4	0.7	Gris	R	1.5-(2.0)-2.7 × 1.3-(1.7)-2.3	1023-1740 × 8-17	190	E	6.4-(9.0)-11.4 × 6.3-(6.9)-7.27	
1.6	0.7	Gris	I	2.5-(3.1)-4.0 × 2.0-(2.5)-3.5	963-1569 × 8-17	143	E	7.2-(8.7)-11.6 × 5.6-(6.6)-8.3	

<sup>x</sup> Código de forma de los esclerocios. R = redondo, I = Irregular / Sclerotia shape code. R = round, I = Irregular.

<sup>y</sup> Código de forma de los conidios. A = almonada, E = elíptica, R = redonda / Conidia shape code. A = lemon-shaped, E = elliptical, R = round.

<sup>z</sup> Largo × ancho, mínimo-(promedio)-máximo × mínimo-(promedio)-máximo / Length × width, minimum-(average)-maximum × minimum-(average)-maximum.

micelio superficial y 19.05% formó micelio aéreo, al igual que el color, donde el 42.86% presentó color gris claro, 38.09% exhibió una coloración gris y 19.05% color gris oscuro, (Figura 1 D-G).

El 100% de los aislamientos formaron esclerocios, los aislamientos MF21 y 4.8 fueron más precoces formándolos a los 4 días después de la siembra (dds). En comparación con el aislamiento 4.1 que tardó 11 dds. La forma de los esclerocios varió, 66.67% fueron irregulares y 33.33% redondos (Figura 1 H-J), el número de esclerocios formados por caja Petri fue de 26 (aislamiento ZF10) a 333 (aislamiento MF21) (Cuadro 3) y los esclerocios más grandes los formó el aislamiento 1.6 de un tamaño de 2.5-(3.1)-4 × 2.0-(2.5)- 3.5 mm y el aislamiento HC19 formó los más pequeños de un tamaño de 0.9-(1.2)-1.3 × 0.6-(0.9)-1.1 mm (Cuadro 3).

Todos los aislamientos esporularon, el MF21 y HC19 fueron los más agresivos al esporular 9 dds en comparación con el aislamiento 1.5 que ocurrió 20 dds. Se observaron conidióforos erectos, septados, ramificados, de color marrón a olivo y los más grandes fueron formados por el aislamiento HC19 con un tamaño de 1175-1694 × 8-17 µm mientras que los más cortos los formó el aislamiento 2.5 de 846-1492 × 6-15 µm (Figura 1K). El 61.90% de los aislamientos formó conidios elípticos, 19.05% alimonados y el 19.05% redondos, el 100% fueron hialinos a marrón claro (Figura 1L), los conidios de mayor tamaño fueron los formados por el aislamiento 5.6 de 8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)- 7.9 µm y los de menor tamaño los formó el aislamiento OS10 de 5.6-(8.7)-10.30 × 5.2-(6.5)- 8.0 µm (Cuadro 3).

**Identificación molecular.** Los números de acceso de las secuencias ITS obtenidas se mencionan en el Cuadro 1, los acceso de los aislamientos 2.5, 3.1, ZF10, 4.1, 4.8, HC19, 4.4, 5.6, 1.5, MF21 y MF12, presentaron una similitud del 100% con el número de acceso MG907605.1 de *B. cinerea*; los

shortest ones were formed by isolation 2.5 and measured 846-1492 × 6-15 µm (Figure 1K). Out of all the isolations, 61.90% formed elliptical conidia, 19.05 % lemon-shaped and 19.05 % round ones; 100% were hyaline to light maroon (Figure 1L), the largest conidia were formed by isolation 5.6 and measured 8.8-(10.4)-13.8 × 6.5-(7.2)- 7.9 µm, while the smaller conidia were formed by isolation OS10 and measured 5.6-(8.7)-10.30 × 5.2-(6.5)- 8.0 µm (Table 3).

**Molecular identification.** The access numbers of the ITS sequences obtained are shown in Table 1. Access numbers from isolations 2.5, 3.1, ZF10, 4.1, 4.8, HC19, 4.4, 5.6, 1.5, MF21 and MF12, presented a similarity of 100% with access number MG907605.1 of *B. cinerea*; isolations HAR3, HAR4, BP3, BP5 were similar (100%) to the deposit KX783612.1 of *B. cinerea* and isolations 1.6, T1 and HC25 presented a similarity of 100% with access number KX463512.1 of *B. cinerea*. Isolations OS5 and OS10 were similar to the same deposit, but by 99 % and isolation T6 was similar (97%) to access number KU992695.1 of *B. cinerea*.

## DISCUSSION

The symptoms observed in this research were typical of gray mold, and similar to those reported by Li *et al.* (2012a) and Li *et al.*, (2012b). In the pathogenicity tests of this study, 100% of the inoculated isolations were ineffective, showing symptoms at 48 hai. Isolation MF21 developed the largest lesion diameter at 48 and 72 hai in both forms of inoculation, reaching the largest lesion diameter when the cut was made. The cuts in the blackberry fruit facilitate the entry of *B. cinerea*, since the fungus penetrates and uses mechanisms such as the formation of appressoria, the production



aislamientos HAR3, HAR4, BP3, BP5 fueron similares (100%) al depósito KX783612.1 de *B. cinerea* y los aislamientos 1.6, T1 y HC25 presentaron una similitud del 100% con el número de acceso KX463512.1 de *B. cinerea*, los aislamientos OS5 y OS10 fueron similares al mismo depósito pero en un 99% y el aislamiento T6 fue similar (97%) con el número de acceso KU992695.1 de *B. cinerea*.

## DISCUSIÓN

Los síntomas observados en la presente investigación fueron típicos de moho gris siendo similares a los reportados por Li *et al.* (2012a) y Li *et al.*, (2012b). En las pruebas de patogenicidad en el presente estudio el 100% de los aislamientos inoculados fueron infectivos, mostrando síntomas a las 48 hdi. El aislamiento MF21 desarrolló el mayor diámetro de lesión a las 48 y 72 hdi en las dos formas de inoculación alcanzando el mayor diámetro de lesión cuando se realizó una herida, las heridas en la fruta de zarzamora facilitan la entrada de *B. cinerea* ya que el hongo penetra y utiliza mecanismos como la formación de apresorios, producción de fitotoxinas y secreción de enzimas degradantes de la pared celular (Choquer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016), de acuerdo a los resultados la presencia de una herida induce mayor diámetro de la lesión, lo cual destaca la importancia de evitar daños físicos durante la cosecha y postcosecha para incrementar la vida de anaquel de la fruta.

Los aislamientos MF21 y ZF10 fueron los que presentaron mayor tasa de crecimiento en medio de cultivo PDA (Cuadro 3) esto se asoció a la agresividad cuando se inocularon en el hospedante, ya que ocasionaron lesiones grandes en poco tiempo, estos aislamientos provienen de parcelas del estado de Michoacán de la región de Peribán y Ziracuaretiro respectivamente, las cuales presentan antecedentes

of phytotoxins, and the secretion of enzymes that degrade the cell wall (Choquer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016). According to the results, the presence of a lesion induces a greater diameter of the lesion, which highlights the importance of avoiding physical damage during harvest and postharvest to increase the fruit's shelf life.

The isolations MF21 and ZF10 presented a higher growth rate in PDA culture medium (Table 3). This was related with aggressiveness when they were inoculated in the host, since they caused large lesions in little time. These isolations come from fields in the state of Michoacán, specifically from the area of Peribán and Ziracuaretiro, respectively, which have a background of an intensive use of products, in comparison to isolation 1.6 from Texcoco, State of Mexico, which displayed a lower growth rate and aggressiveness, and which has received no fungicides. The mycelial growth data found in this investigation coincide with those reported by Li *et al.* (2012a).

The present study found different growth forms, as well as the color of the *B. cinerea* mycelium, which coincides with different investigations (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini and Zapparoli, 2014; Ozer and Bayraktar, 2014; Tanovic *et al.* 2014; Zhou *et al.*, 2014;). The results of the present investigation expose the high morphological variability of the pathogen to develop in a culture medium, but also share similarities between the members of a state in particular. For example, the 5 isolations from the state of Morelos displayed light gray mycelia and those from Jalisco, gray ones. In addition, the most aggressive isolation was observed to form darker colored mycelia. This correlation between pigmentation and aggressiveness may possibly be due to the higher presence of melanin in *B. cinerea* conidia (Doss *et al.*, 2003).

The size, shape, color and the arrangement of the sclerotia in the culture medium is important

de una aplicación intensiva de productos, en comparación con el aislamiento 1.6 de Texcoco Edo. de México, que mostró una menor tasa de crecimiento y agresividad, a esta plantación de zarzamora no se han aplicado fungicidas. Los datos de crecimiento de micelio encontrados en la presente investigación coinciden con lo reportado por Li *et al.* (2012a).

En este estudio se encontraron diferentes formas de crecimiento así como la coloración del micelio de *B. cinerea* que coinciden con diferentes investigaciones (Li *et al.*, 2012a; Lorenzini y Zapparoli, 2014; Ozer y Bayraktar, 2014; Tanovic *et al.* 2014; Zhou *et al.*, 2014;). Los resultados de la presente investigación ponen de manifiesto la alta variabilidad morfológica del patógeno para desarrollarse en medio de cultivo pero al mismo tiempo comparten similitudes entre los miembros de un estado en particular, por ejemplo los 5 aislamientos del estado de Morelos presentaron micelio de color gris claro y los del estado de Jalisco color gris, además se observó que el aislamiento más agresivo formó micelio de coloración más oscuro, esta correlación entre pigmentación y agresividad posiblemente se explique por la mayor presencia de melanina en los conidios de *B. cinerea* (Doss *et al.*, 2003).

El tamaño de los esclerocios, la forma, el color y la disposición en el medio de cultivo es importante para la identificación morfológica de *B. cinerea* (Martínez *et al.*, 2003). Los aislamientos obtenidos producen esclerocios que coinciden en tamaño con los reportados por Erper *et al.* (2015) para *B. cinerea* en frijol y con los de arándanos y vid (Saito *et al.*, 2016). La forma redonda e irregular, color negro y distribución en el medio de cultivo de la presente investigación coincide con *B. cinerea* aislado de zarzamora (Li *et al.*, 2012a). El tiempo que tarda el hongo en formar sus esclerocios *in vitro* así como el número de estos por caja Petri nos da una idea de la sobrevivencia de los aislamientos en campo. Respecto al número de esclerocios por caja

for the morphological identification of *B. cinerea* (Martínez *et al.*, 2003). The isolations obtained produce sclerotia that coincide in size with those reported by Erper *et al.* (2015) for *B. cinerea* in beans and in cranberries and grapevines (Saito *et al.*, 2016). The round and irregular shape, the black color and the arrangement in the culture medium of the present investigation coincides with *B. cinerea* isolated from blackberries (Li *et al.*, 2012a). The time taken for the fungus to form its sclerotia *in vitro*, as well as their number per Petri dish, gives us an idea of the survival of the isolations on the field. Regarding the number of sclerotia per Petri dish, isolation MF21 formed a large amount in a short time span, in comparison with the other isolations; it produced the greatest lesion diameter and growth rate in relation with the others.

The sporulation of *B. cinerea in vitro* is broadly related with its aggressiveness, because the faster it forms its reproductive structures, it can be disseminated and cause epidemics (Carisse *et al.*, 2015). The shape and color of the conidia found in the present investigation are similar to those reported by Aktaruzzaman *et al.* (2017); Zhou *et al.* (2014); Lorenzini and Zapparoli (2014) and Xie *et al.* (2016). The size of the conidiophores differs with that reported for blackberry by Li *et al.* (2012a); despite being the same species and host, they reported larger conidiophores. The size of the conidia is the most important morphometric variable to set these species apart, which helped us identify *B. cinerea* isolated from blackberries. Findings in this investigation coincide with reports for *B. cinerea*, although in other hosts by Ozer and Bayraktar (2014), Rupp *et al.* (2017). However, they differ with those reported by Zhou *et al.* (2014) and Saito *et al.* (2016), since these authors reported larger-sized conidia. There is a similarity in biological characteristics between the individuals obtained in a particular state, which is to say that

Petri el aislamiento MF21 formó una alta cantidad en corto tiempo en comparación con los otros aislamientos, generó el mayor diámetro de lesión y tasa de crecimiento en relación con los demás.

La esporulación de *B. cinerea* *in vitro* tiene estrecha relación con la agresividad del mismo, ya que entre más rápido forme sus estructuras de reproducción se puede diseminar y ocasionar epidemias (Carisse *et al.*, 2015). La forma y el color de los conidios encontrados en la presente investigación son similares a los reportados por Aktaruzzman *et al.* (2017); Zhou *et al.* (2014); Lorenzini y Zapparoli (2014) y Xie *et al.* (2016). El tamaño de los conidióforos difiere con lo reportado para zarzamora por Li *et al.* (2012a), aunque es la misma especie y hospedante estos reportaron conidióforos más grandes. El tamaño de los conidios es la variable morfométrica más importante para diferenciar entre especies, lo cual nos permitió identificar a *B. cinerea* aislado de zarzamora, lo encontrado en la presente investigación coincide con lo reportado para *B. cinerea* pero en otros hospedantes por Ozer y Bayraktar (2014), Rupp *et al.* (2017), sin embargo difieren con los reportados por Zhou *et al.* (2014) y Saito *et al.* (2016) ya que estos informaron mayor tamaño de conidios. Existe similitud de las características biológicas entre los miembros obtenidos de un estado en particular, es decir, los aislamientos de origen geográfico cercano son similares, por ejemplo, la capacidad de inducir enfermedad, agresividad, el color del micelio, forma y morfometría de esclerocios, conidios y conidióforos, entre otras, cada estado comparte origen geográfico y clima el cual es similar en cada sitio de muestreo por estado de donde fueron obtenidos los aislamientos, (Cuadro 1), lo cual hace que existan similitudes biológicas, sin embargo, existen una variabilidad morfológica, morfométrica y patogénica por estados pero que están dentro del rango de lo reportado para *B. cinerea*, por ejemplo los aislamientos de

the isolations with nearby geographic origins are similar. For example, the ability to induce diseases, aggressiveness, the color of the mycelium, the shape and morphometry of the sclerotia, conidia and conidiophores, amongst others. Each state shares a geographic origin and weather, which is similar in every sampling site by state from which the isolations were obtained (Table 1), which leads to the existence of biological similarities. However, there is a morphological, morphometric and pathogenic variability by states, but these are within the range reported for *B. cinerea*. For instance, the isolations from Michoacán differ in the biological characteristics with isolations from the rest of the states.

*B. cinerea* has been reported to cause gray mold in blackberries in Australia, China, New Zealand, South Africa, Norway and the United States. According to records from the USDA (Farr and Rossman, 2011) and in the U.S., *B. cinerea* was reported only in species of *Rubus* in Alaska, California, North Carolina and Washington (Li *et al.*, 2012a), and in the present research, isolations were identified as *B. cinerea* causing gray mold in different states in Mexico.

## CONCLUSIONS

All isolations were pathogenic; variability was identified in the pathogenic, morphological and cultural characteristics, which are within the range of reports for this species. The isolations of the fungus obtained from the blackberry fruit were identified as *Botrytis cinerea*, taking the morphological, morphometric and cultural characteristics into consideration, confirmed with the analysis of sequences in the area of the internal transcribed spacers (ITS), and therefore the pathogen is reported as the causal agent of

Michoacán difieren en las características biológicas de los aislamientos de los demás estados.

*B. cinerea* se ha reportado causando moho gris en zarzamora en Australia, China, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Noruega, Estados Unidos, de acuerdo con los registros del USDA (Farr y Rossman, 2011) y en los Estados Unidos, *B. cinerea* fue reportada solo en especies de *Rubus* en Alaska, California, Carolina del Norte y Washington (Li *et al.*, 2012a), y en la presente investigación los aislamientos se identificaron como *B. cinerea* causando el moho gris en diferentes estados de México.

## CONCLUSIONES

Todos los aislamientos fueron patogénicos, se identificó variabilidad en las características patogénicas, morfológicas y culturales las cuales están dentro del rango de lo reportado para esta especie, los aislamientos del hongo obtenidos de la fruta de zarzamora en la presente investigación se identificaron como *Botrytis cinerea* tomando en cuenta las características morfológicas, morfométricas y culturales, confirmado con el análisis de secuencias de la región del espacio transcrito interno (ITS), por lo tanto se reporta a dicho patógeno como agente causal del moho gris en los estados de Colima, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Morelos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 429090 otorgada al primer autor para realizar sus estudios de doctorado.

## LITERATURA CITADA

Aktaruzzaman MD, Xu SJ, Kim JY and Kim BS. 2014. First Report of Postharvest Gray Mold Rot on Carrot Caused by *Botrytis cinerea* in Korea. Research in

gray mold in the states of Colima, State of Mexico, Jalisco, Michoacán and Morelos.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT) for scholarship No. 429090 granted to the first author for his PhD studies.

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

- Plant Disease 20(2):129-131. <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.2.129>
- Aktaruzzaman MD, Afroz T, Lee YG and Kim BS. 2017. *Botrytis cinerea* is the causal agent of post-harvest grey mould rot on green bean (*Phaseolus vulgaris*) in Korea. Australasian Plant Disease Notes 12: 32. DOI: 10.1007/s13314-017-0261-6
- Calvo GC, Viñas I, Elmer PAG, Usall J and Teixidó N. 2014. Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early season applications of natural products and biocontrol agents. Pest Management Science 70(4): 595–602. <https://doi.org/10.1002/ps.3587>
- Carisse O, Tremblay DM and Lefebvre A. 2014. Comparison of *Botrytis cinerea* airborne inoculum progress curves from raspberry, strawberry and grape plantings. Plant Pathology 63:983–993. <https://doi.org/10.1111/ppa.12192>
- Cheon W and Jeon YH. 2013. First Report of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Greenhouse-Grown Zucchini in Korea. Plant Disease 97(8):1116. doi: 10.1094/PDIS-01-13-0005-PDN.
- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A and Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters 277: 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- Crisosto CH, Garner D and Crisosto G. 2002. Carbon dioxide-enriched atmospheres during cold storage limit losses from *Botrytis* but accelerate rachis browning of 'Redglobe' table grapes. Postharvest Biology and Technology 26: 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00013-3)
- DNASTAR. 2001. Lasergene expert sequence analysis software, User manual. Version 5. Wisconsin, USA: DNASTAR Inc. Madison.
- Doss RP, Deisenhofer J, Krug von Nidda HA, Soeldner AH and McGuire RP. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 63: 687–691. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00323-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00323-6)
- Droby S, Wisniewski M, Macarisin D and Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology 52: 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>

- Elad Y, *et al.* 2014. Lists of plant pathogens and plant diseases in Israel. <http://www.phytopathology.org.il/pws/page!10949>.
- Elmagid ABD, Garrido P. A, Hunger R, Lyles JL, Mansfield MA, Gugino BK, Smith DL, Melouk HA and Garzon CD. 2013. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods* 92(3): 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.020>
- Erper I, Celik H, Turkkan M and Kilicoglu MC. 2015. First report of *Botrytis cinerea* on golden berry. *Australasian Plant Disease Notes* 10(1): 24-25. <http://doi.org/10.1007/s13314-015-0175-0>
- Ellis MB. 1971. *Dematiaceous* hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 p.
- Farr DF and Rossman YA. 2011. Fungal databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved 19 May 2011, from /fungaldatabases/
- Feliziani E and Romanazzi G. 2013. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. *Stewart Postharvest Review* 9(3): 1-6. DOI: 10.2212/spr.2013.3.4
- Gardes M and Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Holubová JV. 1974. A revision of the genus *Olpitrichum* Atk. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 9(4): 425–432.
- Ippolito A and Nigro F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19(8-10): 715–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00095-8)
- Jarvis WR. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15. Ottawa: Canadian Department of Agriculture. Ottawa. 195 p.
- Li X, Kerrigan J, Chai W and Schnabel G. 2012a. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104(3): 650–658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Li X, Fernández OD, Chai W, Wang F and Schnabel G. 2012b. Identification and prevalence of *Botrytis* spp. from blackberry and strawberry fields of the Carolinas. *Plant Disease* 96(11): 1634–1637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0128-RE>
- Lorenzini M and Zapparoli G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology* 63(6): 1326-1335. <https://doi.org/10.1111/ppa.12216>
- Martinez F, Blancard D, Lecomte P and Levis C. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109(5): 479-488. <https://doi.org/10.1023/A:1024222206991>
- Nieto LEH, Aguilar PLA, Ayala EV, Nieto AD, Nieto AR, Leyva MSG and Tovar PJM. 2014. FIRST REPORT OF *Botrytis cinerea* CAUSING POSTHARVEST GRAY MOLD OF TEJOCOTE (*Crataegus mexicana*) FRUIT IN MEXICO. *Journal of Plant Pathology* 96(4)124.
- Ozer G and Bayraktar H. 2014. First report of *Botrytis cinerea* on cornelian cherry. *Australasian Plant Disease Notes* 9: 126. <https://doi.org/10.1007/s13314-014-0126-1>
- Ponce de León I, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Betancor M and Vidal S. 2007. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 7: 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-52>
- Ruiz R, Hernández MJ, Ayala EV, Soto RL, Leyva MSG and Hernández RJ. 2014. Hongos asociados a cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de fitopatología*. 33 (1): 12-30. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687002>.
- Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schnabel G, Weber RWS and Hahn M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 83(9): 00269-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-17>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2018. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. (Consulta, mayo de 2018).
- Saito S, Margosan D, Michailides TJ and Xiao CL. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108(2): 330–343. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Sambrook J and Russel DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russell DW (eds) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 631–632.
- SAS Versión .9.1 for Windows
- Sequencher. 2014. Sequence analysis software Version 5.3. Ann Arbor, MI, USA: Gene Codes Corporation.
- Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC and Eliceiri KW. 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* 82(7-8): 518-529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>
- Silva MA, Correa FR, Pinho DB, Pereira OL and Furtado GQ. 2016. First report of *Botrytis cinerea* on *Miconia cinnamomifolia* 11:26. *Australasian Plant Disease Notes*. DOI 10.1007/s13314-016-0215-4
- Smith MI, Dunez J, Phillips DH, Lelliott AR and Archer AS. 2009. *European handbook of plant diseases*. Wiley online library, UK. Blackwell, Oxford, p 583. doi: 10.1002/9781444314199
- Staats M, Baarlen PV, and Van KJAL. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2): 333–346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Steel RGD, Torrie JH and Dickey DA. 1997. *Principles and procedures of statistics a biometrical approach*. 3th Edition. McGraw-Hill. USA. 139-201; 286-290.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Tanovic B, Delibasic G, Milivojevic J and Nikolic M. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Archives of Biological Sciences 61(3):419–429. DOI: 10.2298/ABS0903419T
- Tanovic B, Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovac M and Delibasic G. 2014. *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. Journal Pesticides and Phytomedicine 29(4): 237–247. DOI: 10.2298/PIF1404237T
- Teles CS, Benedetti BC, Gubler WD and Crisosto CH. 2014. Prestorage application of high carbon dioxide combined with controlled atmosphere storage as a dual approach to control *Botrytis cinerea* in organic ‘Flame Seedless’ and ‘Crimson Seedless’ table grapes. Postharvest Biology and Technology 89: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.001>
- 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 (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds), Academic Press, San Diego: 315–322.
- Xie XW, Zhang ZX, Chai AL, Shi YX and Li BJ. 2016. Grey mould on leaf mustard caused by *Botrytis cinerea*, a new disease in China. Australasian Plant Disease Notes 11: 23. <http://doi.org/10.1007/s13314-016-0211-8>
- Yu L, Zhao R, Xu SG, Su Y, Gao D and Srzednicki. 2014. First Report of Gray Mold on *Amorphophallus muelleri* Caused by *Botrytis cinerea* in China. Plant Disease 98(5):692–692. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0855-PDN>
- Zhang J, Wu MD, Li GQ, Yang L, Yu L, Jiang DH, Huang HC and Zhuang WY. 2010a. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. Mycologia 102(5): 1114–11267. <https://doi.org/10.3852/09-217>
- Zhang J, Zhang L, Li GQ, Yang L, Jiang DH, Zhuang WY and Huang HC. 2010b. *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China. Mycoscience 51(6): 421–431. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0057-4>
- Zhang M, Wang XJ, Wu HY and Sun B. 2014. First Report of *Botrytis cinerea* Causing Fruit Rot of *Pyrus sinkiangensis* in China. Plant Disease 98(2):281–281. DOI: 10.1094/PDIS-06-13-0639-PDN
- Zhang J, Yang H, Yu QY, Wu MD, Yang L, Zhuang WY, Chen WD and Li GQ. 2016. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. Mycologia 108(4): 682–696. <https://doi.org/10.3852/15-340>
- Zhou YJ, Zhang J, Wang XD, Yang L, Jiang DH, Li GQ, Hsiang T and Zhuang WY. 2014. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. Mycologia 106(1): 43–56. <https://doi.org/10.3852/13-032>

# PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot

## Detección por PCR de *Guignardia bidwellii*, agente causal de la pudrición negra de la vid

Magnolia Moreno-Velázquez, Lervin Hernández-Ramos\*, Ana Karen Preuss-Angeles, Liliana Elizabeth Ronces-Frutos, Israel Morales-González, Nayeli Carrillo-Ortiz, Antonio Cárcamo-Rodríguez. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA SAGARPA, Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac Estado de México C. P. 55740. \*Autor para correspondencia: lervin.hernandez@senasica.gob.mx

Recibido: 31 de Mayo, 2019.

Aceptado: 28 de Julio, 2019.

Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Preuss-Angeles AK, Ronces-Frutos LE, Morales-González I, Carrillo-Ortiz N and Cárcamo-Rodríguez A. 2019. PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 383-398.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-5

Primera publicación DOI: 14 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 14, 2019.

**Resumen.** *Guignardia bidwellii* (anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*) es el agente etiológico de la pudrición negra de la vid, enfermedad de importancia económica en Europa y cuarentenaria para México. La identificación del estado anamorfo mediante caracteres morfológicos resulta complicada debido a la similitud entre especies del mismo género, por ejemplo, con el endófito cosmopolita *G. endophyllicola* (*P. capitalensis*), por lo que es necesario contar con herramientas de diagnóstico rápidas y específicas. Con este propósito se desarrolló un marcador molecular basado en los polimorfismos

**Abstract.** *Guignardia bidwellii* (anamorph *Phyllosticta ampellicida*) is the etiological agent of grape black rot, a disease of economic importance in Europe and a quarantine pest for Mexico. The identification of the anamorphic state by morphological characteristics is complicated, due to the similarity among species of the same genus, for example with the cosmopolitan endophyte *G. endophyllicola* (*P. capitalensis*), therefore it is necessary to have quick and specific diagnostic tools. For this purpose, a molecular marker based on single nucleotide polymorphisms (SNP) in the ITS region of the rDNA was developed, where the Bidwell and Ampel2 primers were designed. The PCR amplification generates a fragment of 173 bp, specific to *G. bidwellii* f. *euvitis*. The validation of the method showed that there is no cross amplification with closely related phytopathogenic fungi or with the genome of grapevine. The technique was sensitive to detect up to 30 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA from monosporic cultures and in mixture of plant tissue. This diagnostic procedure is presented as a fast and specific option for the monitoring, and detection

de un solo nucleótido (SNP) en la región ITS del ADN<sub>r</sub>, donde se diseñaron los oligos Bidwell y Ampel2 que mediante amplificación PCR generan un fragmento de 173 pb específico a *G. bidwellii f. euvitis*. La validación del método demostró que no hay amplificación cruzada con otros hongos fitopatógenos ni con el genoma de la vid. La técnica fue sensible al detectar hasta 30 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN a partir de cultivos monospóricos y en mezcla con tejido vegetal. Se presenta este procedimiento de diagnóstico como una opción rápida y específica para el monitoreo y detección de *G. bidwellii f. euvitis* en apoyo a las estrategias de prevención, manejo, cuarentena y erradicación de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Phyllosticta ampellicida*, diagnóstico molecular, ITS, *Vitis* spp.

El hongo fitopatógeno *Guignardia bidwellii* (anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*) es el agente causal de la pudrición negra de la vid, una de las enfermedades más importantes de la viticultura en Europa (Ullrich *et al.*, 2009). Es nativo de Norteamérica y fue introducido a Europa a partir de la movilización de híbridos infectados a finales del siglo XIX (Wicht *et al.*, 2012). El patógeno se encuentra distribuido en importantes zonas vitícolas como Francia, Alemania y norte de Italia, lo que representa un potencial riesgo fitosanitario en aquellas regiones donde la humedad relativa es alta durante el verano, que se traduce en pérdidas económicas considerables si no se realiza un manejo adecuado de la enfermedad (Wicht *et al.*, 2014).

La pudrición negra afecta principalmente a la vid (*Vitis* spp.), pero también se presenta en otros hospedantes de la familia Vitaceae: *Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp., *Cissus* spp. (Van der Aa, 1973; Wicht *et al.*, 2012). Se han observado diferencias de susceptibilidad entre diversos cultivares,

de *G. bidwellii f. euvitis* in support of prevention, management, quarantine and eradication strategies of the disease.

**Key words:** *Phyllosticta ampellicida*, molecular diagnosis, ITS, *Vitis* spp.

The *Guignardia bidwellii* phytopathogen fungus (anamorph: *Phyllosticta ampellicida*) is the causal agent of grape black rot, one of the most important diseases that affect grape production in Europe (Ullrich *et al.*, 2009). The fungus is native to North America and was introduced into Europe when infected hybrids were mobilized at the end of the XIX century (Wicht *et al.*, 2012). The pathogen is distributed across important grape producing zones such as France, Germany and northern Italy, a fact that poses a potential phytosanitary risk in those regions, where relative humidity is high in the summer and causes considerable economic losses if there are no adequate measures for controlling the disease (Wicht *et al.*, 2014).

Black rot affects mainly grape crops (*Vitis* spp.) but is also present in other hosts of the Vitaceae family: *Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp., *Cissus* spp. (Van der Aa, 1973; Wicht *et al.*, 2012). Differences have been observed among diverse cultivars, but all the commercially important varieties are susceptible to the disease (Ullrich *et al.*, 2009). Luttrell (1946) proposed that the fungus has three variants or *forms* (*f.*) depending on the host (*f. euvitis*, *f. parthenocissi* and *f. muscadinii*). However, molecular studies have demonstrated differentiation only in two different forms: those coming from *Vitis* and *Parthenocissus* hosts (Wicht *et al.*, 2014). Traditional identification of *G. bidwellii* is based on the description of morphological traits and symptoms expression (Wicht *et al.*, 2012), but the anamorphic state has characteristics similar to



sin embargo, todas las variedades de importancia comercial son susceptibles a la enfermedad (Ullrich *et al.*, 2009). Luttrell (1946) propuso que el hongo presenta tres variantes o *formas* (*f.*) en función del hospedante (*f. euvtis*, *f. parthenocissi* y *f. muscadinii*), sin embargo, los estudios moleculares sólo han demostrado la diferenciación en dos formas distintas: las provenientes de los hospedante *Vitis* y *Parthenocissus* (Wicht *et al.*, 2014). La identificación tradicional de *G. bidwellii* se basa en la descripción de los caracteres morfológicos y la expresión de síntomas (Wicht *et al.*, 2012); sin embargo, el estado anamorfo posee características similares con varias especies relacionadas, por ejemplo: picnidios con conidios hialinos sin septos, cubiertos por una capa mucoide y un apéndice apical (Wikee *et al.*, 2013a).

El hongo endófito *Guignardia endophyllicola* (*Phyllosticta capitalensis*) es una especie cosmopolita y un parasito débil en un amplio rango de hospedantes (Okane *et al.*, 2003) que incluye a miembros de la familia Vitaceae (Wikee *et al.*, 2013b). El estado teleomorfo y anamorfo pueden confundirse morfológicamente con *G. bidwellii* y *P. ampelicida*, conduciendo a una incorrecta identificación, por lo que es necesario la corroboración mediante el uso de técnicas moleculares (Wicht *et al.*, 2014).

Existen pocos estudios moleculares sobre *G. bidwellii*. En una primera aproximación, Wicht *et al.*, (2012) analizaron filogenéticamente la región ITS1 e ITS2 de muestras provenientes de diversos orígenes geográficos, concluyendo que existe evidencia de dos variantes asociadas a los hospedantes de los géneros *Vitis* y *Parthenocissus*. Zhang *et al.* (2013) llegaron a una conclusión similar mediante un análisis multilocus de cuatro genes, propusieron recategorizar a esta *forma* a nivel de especie como *P. parthenocissi*. Mientras, el uso de microsatélites ha permitido determinar que existe una gran

several related-species, for example, pycnidia with non-septate, hyaline conidia covered by a mucoid layer, and an apical appendix (Wikee *et al.*, 2013a).

The *Guignardia endophyllicola* (*Phyllosticta capitalensis*) endophyte fungus is a cosmopolitan species and a weak parasite in a wide range of hosts (Okane *et al.*, 2003) which includes members of the Vitaceae family (Wikee *et al.*, 2013b). The teleomorphic and anamorphic states can be morphologically confounded with *G. bidwellii* and *P. ampelicida*, which leads to an incorrect identification, thus being necessary to corroborate the results using molecular techniques (Wicht *et al.*, 2014).

Only a few molecular studies about *G. bidwellii* have been conducted. In a first approximation, Wicht *et al.* (2012) performed a phylogenetic analysis of ITS1 and ITS2 regions of samples from diverse geographical origins and concluded that there was evidence of two variants associated with hosts of the *Vitis* and *Parthenocissus* genera. Zhang *et al.*, (2013) reached a similar conclusion through a multilocus analysis of four genes and proposed to re-categorize this *form* at the level species as *P. parthenocissi*. In the meantime, the use of microsatellites has made possible to determine that there is a great allelic variety in the populations in Europe and between both hosts (Wicht *et al.*, 2014). However, there is not enough evidence to associate a *G. bidwellii* genotype with one specific reaction in the *Vitis* host (Rinaldi *et al.*, 2017).

Currently, grape black rot is an economically important disease in Europe and a quarantine pest for Mexico (SENASICA, 2019), so as part of the scientific support to the epidemiological surveillance programs, it is important to have a protocol based on molecular techniques that allow a correct identification of the species. Therefore, the objective of the present study was to design, develop and validate a molecular marker based on

variación alélica en las poblaciones presentes en Europa y entre ambos hospedantes (Wicht *et al.*, 2014), sin embargo, no existe evidencia suficiente para asociar un genotipo de *G. bidwellii* a una reacción específica en el hospedante *Vitis* (Rinaldi *et al.*, 2017).

En la actualidad la pudrición negra de la vid es una enfermedad de importancia económica en Europa y cuarentenaria para México (SENASICA, 2019), como parte del sustento científico en los programas de vigilancia epidemiológica, es importante contar con un protocolo basado en técnicas moleculares que permita la correcta identificación de la especie, por lo cual el objetivo del presente estudio fue diseñar, desarrollar y validar un marcador molecular basado en la técnica de PCR con oligos específicos para el diagnóstico de *G. bidwellii*.

## MATERIALES Y METODOS

**Obtención de aislamientos.** Se utilizaron las cepas de referencia *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* ATCC 9560 (Georgia, Estados Unidos), *Guignardia endophyllicola* CNRF-MICO-C1/001 (Michoacán) y *Guignardia citricarpa* ATCC 26254 (Sudáfrica), además de aislamientos pertenecientes a la colección de hongos fitopatógenos del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en México, de las especies fitopatógenas *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, así como hojas de vid infectadas con *Plasmopara viticola*.

Los aislamientos de la colección del CNRF-SENASICA se mantienen conservados a 4 °C en aceite mineral de acuerdo a la metodología empleada por Humber (1997), se reactivaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25 °C ± 3 °C durante diez días. A continuación,

the PCR technique using specific oligos to detect *G. bidwellii*.

## MATERIALS AND METHODS

**Obtaining isolates.** For the experiment, *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* ATCC 9560 (Georgia, United States), *Guignardia endophyllicola* CNRF-MICO-C1/001 (Michoacán, Mexico) and *Guignardia citricarpa* ATCC 26254 (South Africa) were used as reference strains, as well as isolates of phytopathogen species *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* from the phytopathogen fungi collection of the National Phytosanitary Reference Center (CNRF, for its acronym in Spanish) of the General Directorate of Plant Health (DGSV, for its acronym in Spanish) in Mexico, and grape leaves infected with *Plasmopara viticola*.

The isolates of the CNRF-SENASICA collection are kept in mineral oil at 4 °C, according to the methodology used by Humber (1997) and were reactivated in a potato-dextrose-agar (PDA) medium and incubated at 25 °C ± 3 °C for 10 days. Then, monosporic cultures, monopycnidial cultures in the case of gender *Guignardia*, were carried out in PDA, based on Crous *et al.*, (2005), and incubated at the previously mentioned temperature under 12/12 hours light-darkness intervals for 15 days. *P. viticola* was preserved in the form of herbarium in a botanical press.

**DNA extraction.** Total genomic DNA was extracted from species of the *Guignardia* genus and from grape tissue, healthy and infected with *P. viticola*, following the method of CTAB (Doyle and Doyle, 1987); for the other four species, DNA was extracted according to the methodology proposed

los cultivos monospóricos, monopicnidiales para el caso del género *Phyllosticta*, se realizaron con base en Crous *et al.* (2005), en PDA y se incubaron a la temperatura mencionada anteriormente bajo 12/12 horas luz-oscuridad durante 15 días. Para *P. viticola* se mantuvo preservado en forma de herbario en prensa botánica.

**Extracción de ADN.** La extracción de ADN genómico total se realizó mediante el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) para las especies del género *Guignardia* y para el tejido de vid sano e infectado con *P. viticola*, mientras que para las cuatro especies restantes se utilizó la metodología propuesta por Ceniz (1992) a partir de placas de PDA, omitiéndose el primer centrifugado. La cantidad y calidad del ADN se verificó por la relación de absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  (Manchester, 1995) en un espectrofotómetro Nanodrop 2000C.

**Diseño de oligos.** *In silico* se utilizaron secuencias de la región ITS del ADNr de 46 especies del género *Guignardia* reportadas por Wikee *et al.*, (2013a), más las secuencias de referencia AB095505, AB095509 a AB095511, AB454268, AB454276, AB454313, HM008727 a HM008728, FJ824766, EU683672, KC193586, KF015253 a KF015268 y KF851288 a KF851317 correspondientes a la *f. euvitis* y *f. parthenocissus* (Okane *et al.*, 2003, Motohashi *et al.*, 2009, Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). Las secuencias se alinearon con el algoritmo ClustalW en BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Se identificaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) característicos de la secuencia consenso de referencia de *G. bidwellii f. euvitis* respecto a las otras 46 especies, la región ITS se utilizó para diseñar el oligonucleótido *forward* Bidwell.

El oligonucleótido *reverse* Ampel2 se diseñó utilizando el software Primer3 (Untergasser *et al.*,

by Ceniz (1992), that is, using PDA plates but omitting the first centrifugation. The amount and quality of DNA was verified through the absorbance relation  $A_{260/280}$  and  $A_{260/230}$  (Manchester, 1995) in a Nanocrop 2000C spectrophotometer.

**Design of oligos.** For *in silico* tests, sequences of ITS regions of rDNA of 46 species of the *Guignardia* genus reported by Wikee *et al.* (2013a) were used, as well as the reference sequences AB095505, AB095509 to AB095511, AB454268, AB454276, AB454313, HM008727 to HM008728, FJ824766, EU683672, KC193586, KF015253 to KF015268 and KF851288 to KF851317 corresponding to *f. euvitis* and *f. parthenocissus* (Okane *et al.*, 2003, Motohashi *et al.*, 2009, Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). The sequences were aligned using the ClustalW algorithm in BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Single nucleotide polymorphisms (SNP) characteristic to *G. bidwellii f. euvitis* consensus reference were identified with respect to the other 46 species, and the ITS region was used to design the *forward* Bidwell oligonucleotide.

The *reverse* Ampel2 oligonucleotide was designed with the Primer3 software (Untergasser *et al.*, 2012) using the same consensus sequence. The pair of oligonucleotides was structured in order to amplify a unique 173 bp fragment. The thermodynamic parameters, the formation of internal structures, the heterodimers and the autodimers were examined *in silico* using mFold (Zuker, 2003). The specificity of both oligonucleotides was tested *in silico* with Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012).

**PCR amplification.** After extraction, a PCR test of the endogenous gene was conducted using ITS1 oligonucleotides (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5'

2012) a partir de la misma secuencia consenso. El par de oligonucleótidos se estructuró para amplificar un fragmento único de 173 pb. Los parámetros termodinámicos, la formación de estructuras internas, heterodímeros y autodímeros se examinaron *in silico* con mFold (Zuker, 2003). La especificidad de ambos oligonucleótidos fue ensayada *in silico* mediante Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012).

**Amplificación por PCR.** Después de la extracción se realizó un ensayo de PCR de gen endógeno con los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) para verificar la calidad del material genético. La amplificación se realizó con el Kit Taq DNA Polymerase de Invitrogen®, la mezcla de reacción se hizo a una concentración final de Buffer 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.5 µM de cada iniciador, 2.5 U Taq Polymerase y 2 ng µL<sup>-1</sup> de ADN en un volumen de 25 µL. El programa térmico utilizado fue una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, hibridación a 58 °C por 45 s, extensión de 72 °C por 45 s y una extensión final de 72 °C por 10 min. Se utilizó un T100™ Thermal Cycler de BioRad.

La amplificación del fragmento de 173 pb con los oligonucleótidos específicos se realizó usando la misma mezcla de reacción con un programa térmico de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, hibridación a 62 °C por 30 s, extensión de 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X marcado con 1X de GelRed® Biotium. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó utilizando un marcador TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

**Control positivo.** Se generó a partir del fragmento específico del gen amplificado con los

TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) to verify the quality of the genetic material. The amplification was performed with a Taq DNA Polymerase kit from Invitrogen®, the reaction mixture was prepared using a final concentration of Buffer 1X, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 µM of each primer, 2.5 U Taq Polymerase and 2 ng µL<sup>-1</sup> of DNA in a 25 µL volume. The thermal program used was an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 45 s, hybridization at 58 °C for 45 s, an extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 10 min. For this, a T100™ Thermal Cycler from BioRad was used.

The amplification of the 173 bp fragment using the specific oligonucleotides was performed using the same reaction mixture with a thermal program of denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 45 s, hybridization at 62 °C for 30 s, one extension at 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were analyzed in 2% ultra-pure agarose gels in a TAE 1X buffer marked with 1X from GelRed® Biotium. The size of the amplified fragments was estimated using a TrackIt 100 bp DNA Ladder marker from Invitrogen.

**Positive control.** The positive control was obtained using the specific fragment of the amplified gene with Bidwell and Ampel2 oligonucleotides. The PCR product was cloned using pGEM® T Easy Vector from Promega. The plasmid carrying the fragment was used to transform One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> *E. coli* competent cells from Invitrogen. The bacterial colonies that were able to introduce the plasmid were selected and DNA extraction was carried out following the alkaline lysis method (Sambrook and Russell, 2001). Then, the cloned insert was amplified by PCR and sequenced in both directions with an ABI PRISM 3130 sequencer from Applied Biosystems® through BigDye™ Terminator v3.1 chemistry.

oligonucleótidos Bidwell y Ampel2. El producto de PCR se clonó utilizando pGEM® T Easy Vector de Promega. El plásmido portador del fragmento se utilizó para transformar las células competentes One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> *E. coli* de Invitrogen. Se seleccionaron las colonias bacterianas que lograron introducir el plásmido y se realizó extracción de ADN con el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). A continuación, el inserto clonado se amplificó por PCR y se secuenció en ambos sentidos con el equipo ABI PRISM 3130 de Applied Biosystems® mediante la química BigDye™ Terminator v3.1.

Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el algoritmo denominado Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (nucleotide BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) y con las secuencias reportadas por Wicht *et al.*, (2012) y Rinaldi *et al.*, (2017).

**Ensayo de especificidad.** Se evaluó el par de oligonucleótidos contra los hongos *G. bidwellii f. euvitis*, *G. citricarpa*, *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *P. viticola* y *G. endophyllicola*, este último reportado como hongo cosmopolita endófito (Okane *et al.*, 2003) relacionado morfológica y filogenéticamente a *G. bidwellii*. Como control negativo se utilizó ADN de tejido de vid sano y un control blanco (sin ningún tipo de ADN). El ensayo se realizó por duplicado incluyendo cada vez dos repeticiones por espécimen. El resultado se consideró como positivo cuando se obtuvo la amplificación del fragmento de 173 pb.

**Ensayo de sensibilidad.** A partir del control clonado de *G. bidwellii f. euvitis* a una concentración inicial de 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  se realizaron diluciones seriadas para obtener ocho concentraciones de trabajo (3000, 300, 30, 3, 0.3, 0.15, 0.06 y 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Cada dilución se amplificó por triplicado usando

The sequences obtained were compared to sequences in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the algorithm known as Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) and with the sequences reported by Wicht *et al.* (2012) and Rinaldi *et al.* (2017).

**Specificity test.** The pair of oligonucleotides was evaluated against fungi *G. bidwellii f. euvitis*, *G. citricarpa*, *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *P. viticola* and *G. endophyllicola*, from which the latter has been reported as a cosmopolitan fungal endophyte (Okane *et al.*, 2003) morphologically and phylogenetically related to *G. bidwellii*. DNA of healthy grape tissue was used as a negative control, and one blank control (without any type of DNA). The test was conducted by duplicate including two replications per specimen each time. The result was considered positive when a 173 bp amplified fragment was obtained.

**Sensitivity test.** Serial dilutions to obtain eight working concentration (3000, 300, 30, 3, 0.3, 0.15, 0.06 and 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) were prepared using a cloned control of *G. bidwellii f. euvitis* at an initial concentration of 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Each dilution was amplified per triplicate using Bidwell-1 and Ampel-2 oligos under the reaction conditions and the thermal program previously mentioned. Then, a second test was conducted with seven dilutions of the cloned control (1000, 500, 300, 30, 3, 0.3 and 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), two replications per dilution, and 1  $\mu\text{L}$  of DNA extracted from healthy grapes (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) was added to the 25  $\mu\text{L}$  of the final reaction.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design of oligos.** The bioinformatic analysis of the oligonucleotides designed for *G. bidwellii*

los oligos Bidwell-1 y Ampel-2 siguiendo las condiciones de reacción y programa térmico mencionados con anterioridad. A continuación, se realizó un segundo ensayo con siete diluciones del control clonado (1000, 500, 300, 30, 3, 0.3 y 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), dos repeticiones por dilución y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de ADN extraído de vid sana (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) a los 25  $\mu\text{L}$  de la reacción final.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Diseño de oligos.** El análisis bioinformático de los oligonucleótidos diseñados para *G. bidwellii* (Cuadro 1), señala que el valor de  $\Delta G$  fue menor a 2 kcal  $\text{mol}^{-1}$ , lo que indica que no hay formación de estructuras secundarias importantes que afecten negativamente la reacción (Matveeva *et al.*, 2003); En consecuencia los valores de  $\Delta G$  para el extremo 3', autodimeros y heterodimeros estuvieron dentro de los rangos tolerados de acuerdo a Untergasser *et al.* (2012). Otros criterios como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), longitud, % de GC, presencia de C o G en el extremo 3', dinucleótidos en tándem y bases repetidas, estuvieron dentro de los parámetros aceptables de acuerdo a Rychlik (1995).

Respecto a la especificidad, el análisis *in silico* mediante BLAST del oligonucleótido *forward* Bidwell

(Table 1) shows that the value of  $\Delta G$  was less than 2 kcal  $\text{mol}^{-1}$ , which indicates that there was no formation of important secondary structures that negatively affect the reaction (Matveeva *et al.*, 2003). Consequently, the values of  $\Delta G$  for end 3', autodimers and heterodimers were within the tolerated ranges, according to Untergasser *et al.* (2012). Other criteria such as fusion temperature ( $T_m$ ), length, GC %, presence of C or G at end 3', tandem dinucleotides and repeated bases were within acceptable parameters, according to Rychlik (1995).

Regarding specificity, the analysis *in silico* of the *forward* Bidwell oligonucleotide using BLAST showed 100% coverage and identity only with *G. bidwellii* sequences; no other fungus had an homologous region, and the closest organisms were *Streptomyces* sp. and *Bacillus subtilis* with 85% and 76% coverage, respectively. The oligo *reverse* Ampel2 also showed 100% coverage and identity with *G. bidwellii*. However, in this case they were completely homologous to many species of *Guignardia* genus but not to *Streptomyces* and *Bacillus* genera.

A multiple alignment with the reference sequences of Wikee *et al.* (2013a) confirmed that Bidwell is specific, given that the 21 nucleotides of the oligonucleotide are completely homologous

**Cuadro 1. Oligonucleótidos específicos para la detección de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampelicida*) mediante PCR punto final.**

**Table 1. Specific oligonucleotides to detect *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampelicida*) through end-point PCR.**

| Oligo   | Secuencia 5'a 3'      | pb  | $T_m$<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>x</sup> | %GC <sup>x</sup> | $\Delta G$ <sup>y</sup> | Valor de E <sup>z</sup> | % Cobertura <sup>z</sup> | % Identidad <sup>z</sup> |
|---------|-----------------------|-----|----------------------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Bidwell | GAAAAGCCGTCGAAAGAGCC  | 173 | 66.47                                        | 57.14            | 1.98                    | 0.083                   | 100                      | 100                      |
| Ampel2  | CAGGACTTCACGAAATAATCG |     | 57.38                                        | 42.86            | 0.84                    | 0.083                   | 100                      | 100                      |

<sup>x</sup> Valores calculados mediante Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) ♦ Values calculated using Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012).

<sup>y</sup> Valor de energía libre de Gibbs calculado con mFOLD (Zuker, 2003) ♦ Value of Gibbs free energy calculated using mFOLD (Zuker, 2003).

<sup>z</sup> Valor de E, cobertura e identidad determinado con nBLAST del NCBI para las accesiones KF851289 a KF851315 ♦ Value of E, coverage and identity determined using nBLAST from NCBI for accessions KF851289 to KF851315.

mostró un 100% de cobertura e identidad sólo con secuencias de *G. bidwellii*, ningún otro hongo presentó una región homóloga, los organismos más cercanos fueron *Streptomyces* sp. y *Bacillus subtilis* con un 85 y 76% de cobertura. Para el oligo *reverse* Ampel2 también hubo 100% de cobertura e identidad con *G. bidwellii*, sin embargo, en este caso hubo homología completa con muchas especies dentro del género *Guignardia*, no así con los géneros *Streptomyces* y *Bacillus*.

El alineamiento múltiple con las secuencias de referencia de Wikee *et al.* (2013a) confirmó que Bidwell es específico, dado que los 21 nucleótidos del oligonucleótido tienen homología completa con las secuencias reportadas en el hospedante *Vitis* (Figura 1a), adicionalmente, los primeros once nucleótidos del extremo 3' de este oligo incluyen a la variante reportada en el hospedante *Parthenocissus* (Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). Por otra parte, Ampel2 se ubica en una región conservada, puesto que los últimos ocho nucleótidos hacia el extremo 3' son constantes para todas las especies del género *Guignardia* (Figura 1b). Ambos resultados fueron acordes a lo observado en BLAST.

**Amplificación y especificidad.** Se obtuvo ADN genómico de buena calidad tanto para los cultivos monospóricos como para las muestras provenientes de tejido vegetal. El ensayo de gen endógeno de la región ITS del ADNr tuvo una amplificación de PCR eficiente que varió entre 550 a 750 pb de acuerdo a cada especie (Figura 2a), lo que indica que el ADN obtenido es apto para ser amplificado, esta íntegro y no existe inhibición proteica de la reacción.

La reacción de PCR con el par de oligonucleótidos específicos Bidwell y Ampel2 generó el fragmento esperado de 173 pb sólo para el ADN de *G. bidwellii* (Figura 2b). Los oligonucleótidos

to the sequences reported for the *Vitis* host (Figure 1a). Additionally, the first 11 nucleotides of the oligo end 3' include the variant reported for the *Parthenocissus* host (Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Rinaldi *et al.*, 2017). On the other hand, Ampel2 is located in a conserved region, since the last eight nucleotides towards end 3' are constant to all the species of the *Guignardia* genus (Figure 1b). Both results were in agreement with what we observed in BLAST.

**Amplification and specificity.** Genomic DNA of good quality was obtained both for monosporic cultures and for samples from vegetal tissue. The test of the endogenous genes of the ITS region of rDNA had an efficient PCR amplification ranging from 550 to 750 bp according to each species (Figure 2a), which indicates that the DNA obtained is suitable for amplification, is whole and there is no protein inhibition of the reaction.

The PCR reaction with the pair of specific oligonucleotides Bidwell and Ampel2 produced the expected 173 bp fragment only for *G. bidwellii* DNA (Figure 2b). The oligonucleotides did not show any cross reaction with any other fungus, including *G. endophyllicola*, which is the most related species at the molecular level. No reaction was either observed in grape tissue, so the plant's genome does not produce false positives. Oligonucleotides specificity was also confirmed through sequencing of the PCR products that were positive in the test, obtaining a 100% coverage and identity with *G. bidwellii* accessions KF015253 to KF015255, according to Rinaldi *et al.* (2017).

**Sensitivity test.** The amplification of the cloned fragment was inhibited when a concentration of 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  was used, so in a second test a concentration of 1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  was used, where the band was dim or imperceptible. All the other

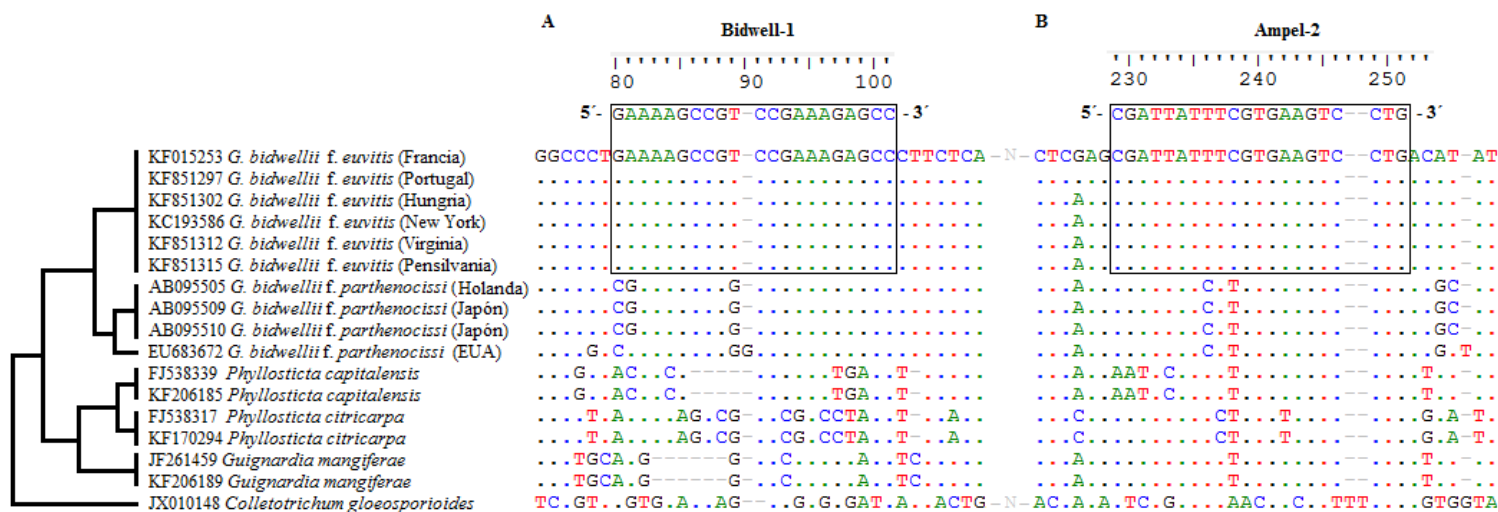


Figura 1. Filogenia de la región ITS del ADNr para las secuencias representativas de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* y f. *parthenocissi*. A) Alineamiento de las secuencias para diseñar el forward Bidwell-1. B) Diseño en sentido 5'-3' del reverse Ampel-2. Se utilizó a *C. gloeosporioides* como nodo raíz externo al grupo.

Figure 1. Phylogeny of the ITS region of rDNA for the representative *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* and f. *parthenocissi* sequences. A) Alignment of the sequences to design forward Bidwell-1. B) Design in direction 5'-3' of reverse Ampel-2. *C. gloeosporioides* was used as a root node external to the group.



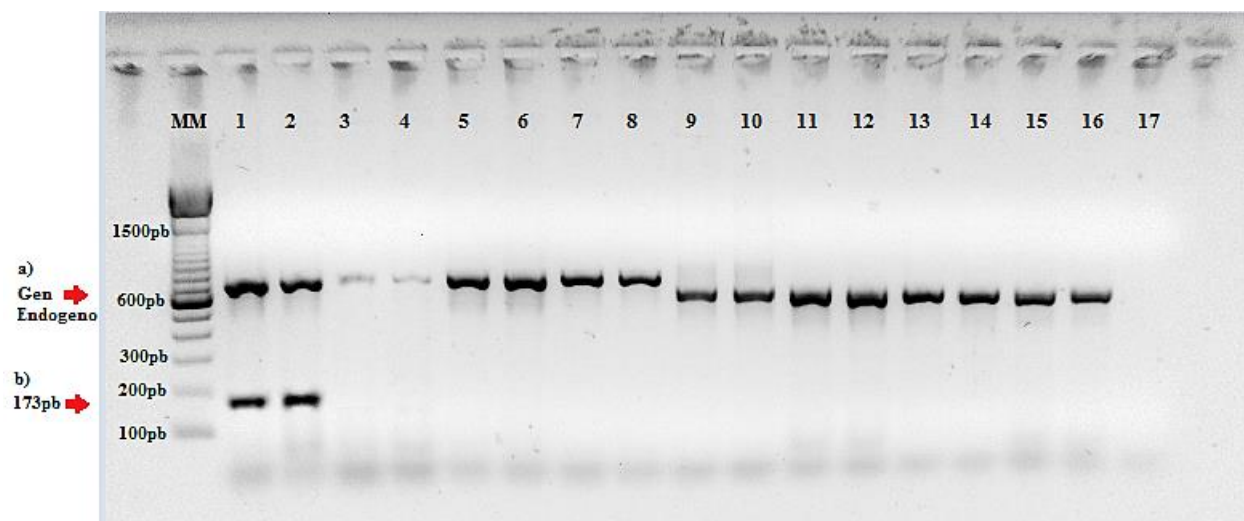


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR. A) Ensayo de gen endógeno con los oligos ITS-1 e ITS-4 (550-750 pb). B) Ensayo con los oligos específicos Bidwell-1 y Ampel-2 (173 pb). Para ambos ensayos carril 1-2: *G. bidwellii*, 3-4: ADN de vid con *Plasmopara viticola*, 5-6: *G. endophyllicola*, 7-8: *G. citricarpa*, 9-10: *Verticillium dahliae*, 11-12: *F. oxysporum*, 13-14: *A. alternata*, 15-16: *C. gloeosporioides*, 17: Blanco con H<sub>2</sub>O. MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

Figure 2. Amplification of the PCR products. A) Test of the endogenous gene with oligos ITS-1 and ITS-4 (550-750 bp). B) Test using specific oligos Bidwell-1 and Ampel-2 (173 bp). For both tests, lane 1-2: *G. bidwellii*, 3-4: Grape DNA *Plasmopara viticola*, 5-6: *G. endophyllicola*, 7-8: *G. citricarpa*, 9-10: *Verticillium dahliae*, 11-12: *F. oxysporum*, 13-14: *A. alternata*, 15-16: *C. gloeosporioides*, 17: Blank with H<sub>2</sub>O. MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder from Invitrogen.

no mostraron reacción cruzada con ninguno otro hongo, incluido *G. endophyllicola*, el cual es la especie molecularmente más relacionada. Tampoco se observó reacción en el tejido de vid, por lo tanto el genoma de la planta no produce falsos positivos. En adición, se confirmó la especificidad de los oligonucleótidos mediante la secuenciación de los productos de PCR que resultaron positivos en el ensayo, obteniendo un 100% de cobertura e identidad con *G. bidwellii* accesiones KF015253 a KF015255 de Rinaldi *et al.* (2017).

**Ensayo de sensibilidad.** La amplificación del fragmento clonado se inhibió al usar una concentración de 3000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , por lo que en un segundo ensayo se incluyó una concentración de 1000 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  donde la banda fue tenue o imperceptible. Todas las demás diluciones mostraron una óptima amplificación, lo que indica que el método es sensible ya que

dilutions showed an optimal amplification, which indicates that the method is sensitive because it allows detecting *G. bidwellii* in concentrations of less than 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  with a lower limit of detection evaluated in 0.03 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The test with an extract of grape DNA showed similar results, so the sensitivity of the technique was not affected by the presence of the plant's genome (Figure 3).

The specific oligonucleotides for *G. bidwellii* were designed using as reference all the available sequences of *G. bidwellii f. euvitis* for the ITS region of rDNA, which was chosen to differentiate the species of the *Guignardia* genus (Wikee *et al.*, 2013a), because it is polymorphic. The internal transcribed spacers of this region have been proposed as a universal *DNA Barcoding* for the kingdom *Fungi* because of their high interspecific variability in a wide range of *Eumycetos* (Schoch *et al.*, 2012). Bonants *et al.* (2003), Everett and Rees

permite detectar a *G. bidwellii* en concentraciones menores a  $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  con un límite de detección inferior evaluado en  $0.03 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . El ensayo con el extracto de ADN de vid mostró resultados similares, por lo que la sensibilidad de la técnica no se vio afectada por la presencia del genoma de la planta (Figura 3).

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para *G. bidwellii* tomando como referencia todas las secuencias disponibles de *G. bidwellii f. euvitis* para la región ITS del ADNr, la cual se eligió debido a que es polimórfica para diferenciar a las especies del género *Guignardia* (Wikee *et al.*, 2013a). Además, los espaciadores transcritos internos de esta región han sido propuestos como *DNA Barcoding* universal para el reino *Fungi* debido a su alta variabilidad inter específica en un amplio rango de *Eumycetos* (Schoch *et al.*, 2012). Asimismo, Bonants *et al.* (2003), Everett y Rees (2006) y Peres *et*

(2006) and Peres *et al.* (2007) have successfully developed specific oligonucleotides based on the same ITS region of rDNA for other species of the *Guignardia* genus.

The design of oligos included sequences of representative isolates of the major grape producing regions where the disease is present: United States (Zhang *et al.*, 2013) and Europe (Rinaldi *et al.*, 2017). The sequences of the ATCC 9560 reference control and the cloned control were homologous. Also, for this gene in particular no single-nucleotide polymorphisms were detected for the different geographical origins of the same species, as referred by Wicht *et al.*, (2012). Therefore, although the oligos designed during this study have interspecific strength, the intraspecific variation of subpopulations or haplotypes will require more robust markers (Wicht *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2017).

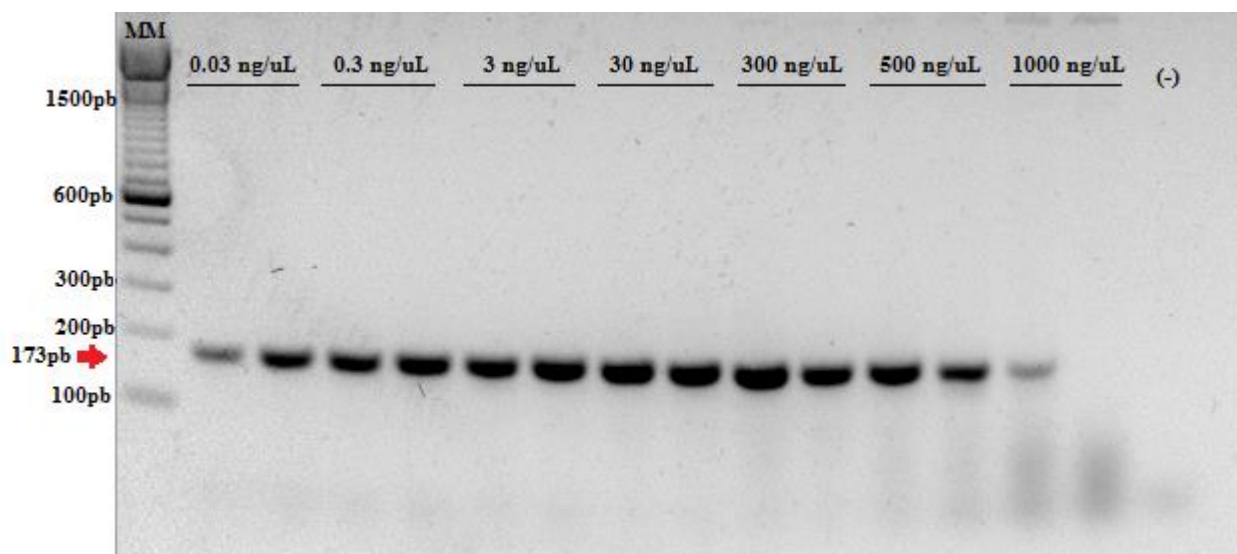


Figura 3. Ensayo de sensibilidad de los oligonucleótidos Bidwell-1 y Ampel-2 utilizando gradiente de diluciones del control clonado en mezcla con  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN de Vid. (-): Blanco con  $\text{H}_2\text{O}$ . MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

Figure 3. Test of sensitivity of oligonucleotides Bidwell-1 and Ampel-2 using a dilutions gradient of the cloned control in a  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  mixture of grape DNA. (-): Blank with  $\text{H}_2\text{O}$ . MM: TrackIt 100 bp DNA Ladder from Invitrogen.

*al.* (2007) han desarrollado con éxito oligonucleótidos específicos basados en la misma región ITS del ADNr para otras especies del género *Guignardia*.

En el diseño de los oligos se incluyeron secuencias de los aislamientos representativos de las principales regiones vitícolas donde se presenta la enfermedad: Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2013) y Europa (Rinaldi *et al.*, 2017). Las secuencias del control de referencia ATCC 9560 y el control clonado fueron homologas. Asimismo, para este gen en particular no se detectaron polimorfismos de un solo nucleótido para los distintos orígenes geográficos de la misma especie, tal como lo refiere Wicht *et al.* (2012), por lo tanto, los oligos aquí diseñados tienen robustez interespecífica, sin embargo, la variación intraespecífica, de subpoblaciones o haplotipos requerirá de marcadores más robustos (Wicht *et al.*, 2014; Rinaldi *et al.*, 2017).

Respecto al rango de hospedantes y la posible especialización o variantes citadas por Luttrell (1946) y Wicht *et al.* (2012), los oligos diseñados Bidwell y Ampel2 son complementarios en un 100% con las secuencias reportadas para los aislamientos obtenidos del hospedante del género *Vitis*, los ensayos *in silico* e *in vivo* generaron el fragmento esperado de 173 pb. No obstante, el alineamiento con las secuencias de la *f. parthenocissi* mostró un SNP de guanina por timina en la posición 12 del *forward* Bidwell y dos SNP's más en las posiciones ocho y diez del *reverse* Ampel2. En los ensayos *in silico* un solo SNP es suficiente para determinar especificidad entre dos organismos (Stadhouders *et al.*, 2010); sin embargo, *in vivo* la especificidad puede estar dada sólo por los primeros nucleótidos del extremo 3' (Ayyadevara *et al.*, 2000; Stadhouders *et al.*, 2010). En futuras investigaciones se sugiere evaluar los oligos para los aislamientos obtenidos de los hospedantes *Parthenocissus*, *Ampelopsis* y *Cissus*.

Considerando que de acuerdo con Wicht *et al.* (2012) la tasa de crecimiento del hongo en medios

As for the host range and possible specialization or variants cited by Luttrell (1946) and Wicht *et al.* (2012), the Bidwell and Ampel2 oligos designed are 100% complementary to the sequences reported for the isolates obtained from the host of the *Vitis* genus; the *in silico* and *in vivo* tests produced the expected 173 bp fragment. However, the alignment with the sequences of *f. parthenocissi* showed an SNP of guanine rather than thymine at position 12 of *forward* Bidwell, and two additional SNPs at positions 8 and 12 of *reverse* Ampel2. In *in silico* tests only one SNP is enough to determine the specificity between two organisms (Stadhouders *et al.*, 2010), but the *in vivo* specificity could be given only by the first nucleotides of end 3' (Ayyadevara *et al.*, 2000; Stadhouders *et al.*, 2010). We suggest evaluating oligos for the isolates obtained from *Parthenocissus*, *Ampelopsis* and *Cissus* hosts in future studies.

Considering that, according to Wicht *et al.* (2012), the growth rate of the fungus in culture mediums is slow (fruiting bodies take more than two weeks to form), the protocol described here represents a fast and reliable tool to detect and identify the pathogen, because it allows the use of vegetal material infected or mycelium cultured *in vitro* that has been growing for less than a week. Similar protocols have been implemented to detect other fungi that are difficult to isolate, such as *P. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2007) and *Elsinoë fawcettii* (Hyun *et al.*, 2007). Oligos allow a quick differentiation of *G. bidwellii* from the rest of species, but do not allow to differentiate a teleomorph from an anamorph, and for this reason they have to be biologically identified. On the other hand, the PCR assay can be complemented by the one proposed by Everett and Rees (2006) for specific detection of the *G. endophyllicola* endophyte in order to obtain more robust results when diagnosing *G. bidwellii f. euvitis* (*P. ampelicida*).

de cultivo es lenta, pudiendo requerir más de dos semanas para la formación de cuerpos fructíferos, el protocolo aquí descrito representa una herramienta rápida y confiable para la detección e identificación del patógeno, al poder realizarse a partir de material vegetal infectado o de micelio cultivado *in vitro* con menos de una semana de crecimiento. Protocolos similares se han implementado para la detección de otros hongos de difícil aislamiento como *P. citricarpa* (Bonants *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2007) y *Elsinoë fawcettii* (Hyun *et al.*, 2007). Los oligos permiten diferenciar rápidamente a *G. bidwellii* del resto de especies, sin embargo, no permiten diferenciar teleomorfo de anamorfo, por lo que la identificación biológica es necesaria. Por otra parte, este ensayo de PCR puede ser complementado por el propuesto por Everett y Rees (2006) para la detección específica del endófito *G. endophyllicola*, a fin de obtener resultados más robustos en el diagnóstico de *G. bidwellii f. euvitis* (*P. ampellicida*).

Finalmente, debido a que la principal fuente de dispersión de la pudrición negra de la vid es la movilización de material propagativo (Wicht *et al.*, 2012), su introducción a regiones vitícolas representa un gran riesgo para la producción, tal como se ha reportado en Europa (Rinaldi *et al.*, 2017). Para México, su introducción pondría repercutir en más de 33 000 ha de vid (SIAP, 2018), debido a que no se cuenta con cultivares resistentes (Ullrich *et al.*, 2009), por lo que la detección oportuna del hongo a partir de material vegetal propagativo y la aplicación de medidas adecuadas de confinamiento y delimitación demandan como una prioridad el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y precisos como lo es la PCR.

Finally, given that the main source to spread grape black rot is mobilization of propagative material (Wicht *et al.*, 2012), its introduction to grape producing zones poses a great risk for this crop, such as that reported in Europe (Rinaldi *et al.*, 2017). In Mexico, its introduction could affect more than 33 000 ha of grape crops (SIAP, 2018), because there are no resistant cultivars (Ullrich *et al.*, 2009). For this reason, developing fast and accurate diagnosis methods such as PCR must be a priority in order to detect the fungus in time by using propagative vegetal material and implementing adequate confinement and delimitation measures.

## CONCLUSIONS

This study reports the development of an endpoint PCR test based on the ITS region of rDNA to detect and identify in a specific, fast and simple way *Guignardia bidwellii f. euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*), the causal agent of grape black rot. The test allows to obtain a reliable diagnosis of the fungus and is a starting point for planning and implementing measures to prevent its introduction, thus providing a methodology for timely disease management and supporting the epidemiological surveillance and phytosanitary management programs.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to DGSV-CNRF of SENASICA for directly supporting our research by letting us use equipment and reagents and obtain ATCC isolates.

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

## CONCLUSIONES

Esta investigación reporta el desarrollo de un ensayo de PCR punto final con base en la región ITS del ADNr para la detección e identificación específica, rápida y sencilla de *Guignardia bidwellii* f. *euvitis* (*Phyllosticta ampellicida*), agente causal de la pudrición negra de la vid, lo cual permite contar con un diagnóstico confiable del hongo siendo punto de partida para la planeación y aplicación de medidas de prevención de la introducción y manejo oportuno de la enfermedad, contribuyendo así con los programas de vigilancia epidemiológica y manejo fitosanitario.

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestra gratitud a la DGSV-CNRF del SENASICA por apoyar directamente en las facilidades para el uso de equipos, reactivos y la adquisición de los aislamientos de la ATCC.

## LITERATURA CITADA

- Altschul FS, Gish W, Miller W, Myers WE and Lipman JD. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ayadevara S, Thaden JJ and Shmookler RJ. 2000. Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 284: 11-18. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4635>
- Bonants JM Peter, Carroll CG, Weerd M, Brouwershaven RI and Baayen PR. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 503-513. <https://doi.org/10.1023/A:1024219629669>
- Cenis LJ. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20 (9): 2380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312363/pdf/nar00083-0171.pdf>
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, J Houbraken. 2005. *Laboratory Manual Series No. 1: Fungal Biodiversity*. CBS Fungal Biodiversity Centre. 425 pp. <http://www.westerdijkinstituut.nl/News/Category/Laboratory%20Manual%20Series>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15. [https://webpages.unc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.unc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Everett RK and George Rees J. 2006. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. *New Zealand Plant Protection* 59: 141-145. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.902.294&rep=rep1&type=pdf>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999hall1.pdf>
- Humber AR. 1997. *Fungi: Preservation of cultures*. Pp. 269-279. In: Lawrence A. Lacey (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. 409p. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Hyun JW, Peres NA, Yi SY, Timmer LW, Kim KS, Kwon HM and Lim HC. 2007. Development of PCR assays for the identification of species and pathotypes of *Elsinoë* causing scab on citrus. *Plant Disease* 91: 865-870. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0865>
- Luttrell SE. 1946. Black rot of muscadine grapes. *Phytopathology* 36: 905-924. <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43894446/PDF>
- Manchester KL. 1995. Value of A<sub>260/A280</sub> ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19 (2): 208-210. [https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL\\_ID=200902136544040775&rel=0](https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902136544040775&rel=0)
- Matveeva VO, Shabalina AS, Nemtsov AV, Tsodikov DA, Gesteland RF and Atkins FJ. 2003. Thermodynamic calculations and statistical correlations for oligo-probes design. *Nucleic Acids Research* 31 (14): 4211-4217. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167637/>
- Motohashi Keiichi, Shigeki Inaba, Kozue Anzai, Susumu Takamatsu and Chiharu Nakashima. 2009. Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu stricto. *Mycoscience* 50: 291-302. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0487-Z>
- Okane I, Lumyong S, Nakagiri A and Ito T. 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44 (5): 353-363. <https://doi.org/10.1007/s10267-003-0128-x>
- Peres NA, Harakava R, Carroll CG, Adaskaveg EJ and Timmer WL. 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease* 91 (5): 525-531. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0525>
- Rinaldi AP, Paffetti D, Comparini C, Brogini ALG, Gessler C and Mugnai L. 2017. Genetic variability of *Phyllosticta ampellicida*, the agent of black rot disease of grapevine. *Phytopathology* 107: 1406-1416. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0404-R>
- Rychlik W. 1995. Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biotechnology* 3 (2): 129-134. <https://doi.org/10.1007/BF02789108>

- Sambrook J and Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. USA. 2344.
- Schoch LC, Seifert AK, Huhndorf S, Robert V, Spouge LJ, Lesquesle A and Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- SENASICA. 2019. Pudrición negra de la vid (*Guignardia bidwellii*–*Phyllosticta ampellicida*). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No 63. 15p. Consultado en línea el 22/07/2019 a través del portal: [https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Pudrici%C3%B3n%20Negra%20de%20la%20Vid%20\(Guignardia%20bidwellii\).pdf](https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Pudrici%C3%B3n%20Negra%20de%20la%20Vid%20(Guignardia%20bidwellii).pdf)
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola: producción de vid. Consultado online en Abril de 2019 a través de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Stadhouders R, Paz DS, Anber J, Voermans J, Mes MHT and Schutten M. 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 12 (1): 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmol-dx.2010.090035>
- Ullrich IC, Kleespies GR, Enders M and Koch E. 2009. Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal für Kulturpflanzen* 61 (3): 82–90.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Van der Aa H. 1973. Studies in *Phyllosticta*. *Studies in Mycology* 5: 1–110.
- White JT, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. 315–322. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Wicht B, Petrini O, Jermini M, Gessler C and Lodovico BGA. 2012. Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification. *Mycologia* 104(5): 1036–1045. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492405>
- Wicht B, Jermini M, Gessler C and Lodovico BGA. 2014. Microsatellite markers for population studies of the ascomycete *Phyllosticta ampellicida*, the pathogen causing grape black rot. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3): 470–479. <http://www.jstor.org/stable/43871799>
- Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EH, Hyde KD and Crous PW. 2013a. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). *Studies in Mycology* 76: 1–29. <https://dx.doi.org/10.3114%2Fsim0019>
- Wikee S, Lombard L, Crous WP, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Alias AS, McKenzie HCE and Hyde DK. 2013b. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. *Fungal Diversity* 60: 91–105. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0235-8>
- Ye Jian, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden LT. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang Ke, Ning Zhang and Lei Cai. 2013. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*. *Mycologia* 105(4): 1030–1042. <https://doi.org/10.3852/12-392>
- Zuker M. 2003. mFold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: 3406–3415. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169194/>

# Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLAs and CTV

## Identificación y clonación de tres genes endógenos que pueden conferir resistencia a patógenos en cítricos incluyendo CLAs y CTV

Pedro Iván Ventura-Medina, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa\*, RGP-Fruticultura, <sup>1</sup>Fitopatología, <sup>2</sup>RGBP-Semillas, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, CP 56230; Vicente Febres, Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, FL, 32611, USA; <sup>1</sup>Gustavo Mora-Aguilera, <sup>2</sup>Alejandrina Robledo-Paz. \*Autor para correspondencia: alexge@colpos.mx

Recibido: 30 de Junio, 2019.

Aceptado: 16 de Agosto, 2019.

Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLAs and CTV. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 399-420.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1906-6

Primera publicación DOI: 05 de Septiembre, 2019.

First DOI publication: September 05, 2019.

**Resumen.** *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLAs), agente causal del huanglongbing (HLB), y el *Citrus tristeza virus* (CTV) constituyen amenazas para la citricultura mexicana por su condición endémica en cítricos agrios de algunas regiones del pacífico y de focos recientes de razas severas, respectivamente. La identificación y clonación de genes relacionados con la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) de la planta podrían coadyuvar como parte de una estrategia de manejo integrado. Este

**Abstract.** *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLAs), causal agent of Huanglongbing disease (HLB), and the *Citrus tristeza virus* (CTV) constitute a serious threat to Mexican citriculture because its endemic status in limes in several regions of the Pacific coast and also for the recent detection of severe strains, respectively. The identification and cloning of some genes related to the Systemic Acquired Resistance (SAR) of the plant could help to confront the diseases as an integrated management strategy. This work had the objective of cloning specific genes inherent to the plant as a first step to obtain transgenic citrus plants putatively resistant to CLAs. The genes were selected based on the response of citrus plants to a wide range of pathogens, they were; a regulating gene for salicylic acid signaling (SA) as the inducer gen Azelaic Acid Induced 1 (*AZI-1*), a Citrus Non-Race-Specific Disease Resistance 1 (*CsNDR-1*) and a pathogenesis related protein 1 gen (*PR-1*). These three genes (*AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*)

trabajo tuvo como objetivo desarrollar construcciones con genes específicos inherentes a la planta como primera etapa en la generación de plantas transgénicas resistentes a CLas. Los genes seleccionados con base a la respuesta de cítricos a una amplia gama de patógenos, fueron *AZI-1*, 1-inductor del ácido 'Azelaic' y *CsNDR-1*, 1-resistencia no específica a enfermedades en cítricos, ambos genes reguladores de la señalización del ácido salicílico (SA), y el gen asociado con la síntesis de proteína 1 relacionada con la patogenicidad (*PR-1*). Los tres genes (*AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*) se insertaron independientemente en pUC118-FMV-Poly-2-1. Posteriormente estos tres genes fueron subclonados individualmente en el vector pCAMBIA 2301, mientras que en pCAMBIA 2201 se clonó el gen *AZI-1*. La clonación de los genes en los vectores pCAMBIA2301 y pCAMBIA2201 permitió incorporar a las construcciones un gen de selección de transformación (35S-nptII-35S) y un gen reportero (35S-GUS-NOS). La construcción *CsNDR-1* fue clonada en las cepas EHA5 y AgL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Los genes *AZI-1* y *PR-1* no se lograron integrar a estas cepas de *Agrobacterium*. Estas construcciones representan el primer paso para generar cítricos transgénicos como una alternativa para enfrentar a CLas y CTV.

**Palabras clave:** RSA, plásmidos, *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*.

El CTV es subendémico en México con un reciente brote de raza severa en algunos municipios del Golfo de México. Es un organismo reglamentado por el área oficial desde los 80's prevaleciendo en condición asintomática. Por el contrario, el huanglongbing (HLB) o dragón amarillo también llamado citrus greening o enverdecimiento de los cítricos se detectó en 2009 con rápida dispersión en el país. Esta es una enfermedad causada por una

were independently inserted into pUC118-FMV-Poly-2-1, subsequently they were subcloned individually into the vector pCAMBIA 2301 while gene *AZI-1* was only cloned into pCAMBIA 2201. The *CsNDR-1* construct was cloned into *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA5 and AgL1 while genes *AZI-1* and *PR-1* could not be inserted into these strains of *Agrobacterium*. These constructions are the first step to be able to generate transgenic citrus as an alternative to face the HLB.

**Keywords:** SAR, plasmids, *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*.

The CTV is a subendemic pathogen in Mexico and a recent outbreak of a severe race has been detected in some municipalities of the Gulf of Mexico. The *Citrus tristeza virus* is an organism regulated by the official division since the 1980s but has remained symptomless. Conversely, Huanglongbing (HLB) or yellow dragon, also known as citrus greening (*enverdecimiento de los cítricos*), was detected in 2009 and spread rapidly in Mexico. Huanglongbing is a disease caused by a Gram-negative *Candidatus liberibacter* bacterium (Gottwald, 2007). Three species are known: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) and *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam); *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) is the only one reported in Mexico. CLas attacks all citrus, affects the productive physiology of young and adult plants, including hybrids, by producing moderate-to-severe symptoms and is distributed in almost all the citrus producing countries (Bové, 2012; Hall *et al.*, 2012). This systemic bacterium multiplies and is transported by the phloem and requires insect vectors to spread the disease, the most important being *Diaphorina citri* (Hall *et al.*, 2012; Ichinose *et al.*, 2010).



bacteria Gram-negativa *Candidatus liberibacter* (Gottwald, 2007). Se conocen tres especies: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), siendo la primera la única reportada en México. CLas ataca a todos los cítricos, afecta la fisiología productiva de las plantas jóvenes y adultas con síntomas moderado a severos, incluyendo a los híbridos, y está distribuida en casi todos los países productores de cítricos (Bové, 2012; Hall *et al.*, 2012). La bacteria sistémica se multiplica y transporta por el floema requiriendo de insectos vectores para su transmisión, siendo *Diaphorina citri* más importante (Hall *et al.*, 2012; Ichinose *et al.*, 2010).

Mora-Aguilera *et al.* (2014) reportan niveles de intensidad epidémica variable con incidencia del 26% en Brasil hasta 100% en China. Los mismos autores reportan el potencial de pérdidas productivas en 42% para naranja dulce, 62% en limón mexicano y 17.3% en limón persa bajo las condiciones citricolas de México. Por el carácter epidémico de la enfermedad, el gobierno federal ha impulsado desde 2008 un programa nacional de control basado en la erradicación de plantas enfermas, control del vector y uso de material certificado, el cual ha permitido contener el impacto de la enfermedad, reconociéndose regiones endémicas y subendémicas como Colima, Michoacán y Nayarit. Actualmente no existen variedades resistentes por lo que el control del vector y un manejo agronómico eficiente con énfasis en la nutrición y riego permite mantener la rentabilidad de plantaciones comerciales (Mora-Aguilera, G. 2018. Datos no publicados; Fu *et al.*, 2016). Existen a nivel experimental diversas alternativas físicas y químicas para el control de CLas (Zhang *et al.*, 2014; Vazquez-Garcia *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2008). Algunos de estos métodos no han tenido resultados consistentes, y

Mora-Aguilera *et al.* (2014) reported a variable level of epidemic intensity with 26% incidence in Brazil and up to 100% in China. The same authors reported it could cause production losses of 42% in sweet orange, 62% in Mexican lemon and 17.3% in Persian lime under the citrus production conditions in Mexico. Due to the epidemic character of the disease, since 2008 the Mexican government has supported a national program for controlling the disease based on eradicating infected plants, controlling the vector and using certified materials, which has made it possible to control the disease impact and identify endemic and subendemic regions such as Colima, Michoacán and Nayarit. Since no resistant varieties are currently available, measures for controlling the vector and an effective agronomic management with special attention on nutrition and irrigation have made it possible to maintain profitability in commercial plantations (Mora-Aguilera, G. 2018. Data not published; Fu *et al.*, 2016). At the experimental level, there are several physical and chemical alternatives for controlling CLas (Zhang *et al.*, 2014; Vazquez-Garcia *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2008). Some of these methods have not produced consistent results, and others, including the use of antibiotics, are not environmentally or economically viable. The development of transgenic citrus varieties as an alternative for rapidly developing resistance has proven to be viable against CTV, but the use of genes exogenous to the plant has limited its commercial implementation. One alternative is to use CRISPR, a gene editing technique that is still being developed, and endogenous genes associated with plant defense mechanisms.

The activation of these mechanisms starts by recognizing effectors such as flagelin, chitins, glucoproteins and lipopolysaccharides known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

otros, como el uso de antibióticos, no son viables ambiental y económicamente. El desarrollo de variedades transgénicas en cítricos, como una alternativa para el rápido desarrollo de resistencia, ha demostrado su viabilidad contra el CTV; sin embargo, el empleo de genes exógenos a la planta ha limitado su implementación comercial. Una alternativa es el empleo de CRISPR, técnica de edición de genes aun en desarrollo, y el uso de genes endógenos asociados a mecanismos de defensa en plantas.

La activación de estos mecanismos comienza con el reconocimiento de efectores como flagelina, quitinas, glucoproteínas y lipopolisacáridos que se denominan Patrones Moleculares Generales Asociados a Patógenos (PMGAP). Las proteínas que reconocen a estos efectores son llamadas Proteínas de Resistencia (R). Este mecanismo de respuesta específica se denomina resistencia gen por gen *sensu* Flor (Gao *et al.*, 2015; Nishimura y Dangl 2010; Belkhadir *et al.*, 2004). Al tipo de resistencia ejercida por proteínas R, únicamente en presencia de un patógeno, se denomina resistencia sistémica adquirida (RSA) (Gómez y Mejía, 2011).

Recientemente, el análisis del transcriptoma de cítricos en respuesta a la infección de CLas, CLam y CTV ha demostrado que varios genes se sobreexpresan en respuesta a la infección mientras que otros genes se reprimen (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). Entre los múltiples genes consistentemente asociados con la RSA se incluyen *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* expresados en respuesta a fitopatógenos de cítricos y otros cultivos (Hu *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013; Pajerowska *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Van Loon y Van Strien, 1999). La identificación de genes activados por la presencia de fitopatógenos permite postular la posibilidad de garantizar su expresión en la planta en forma continua y regular mediante ingeniería genética con el fin de anticipar procesos de infección. Este trabajo

The proteins that recognize these effectors are known as resistance proteins (R). This specific response mechanism is called gene-for-gene resistance *sensu* Flor (Gao *et al.*, 2015; Nishimura and Dangl 2010; Belkhadir *et al.*, 2004). The type of resistance conferred by R proteins only in the presence of a pathogen, is called systemic acquired resistance (SAR) (Gómez and Mejía, 2011).

Recently, analyses of citrus transcriptome in response to CLas, CLam and CTV infection have demonstrated that several genes are overexpressed in response to infection, while others are restrained (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). The multiple genes consistently associated with RSA include *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1*, which are expressed in response to phytopathogens of citrus and other crops (Hu *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013; Pajerowska *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Van Loon and Van Strien, 1999). Genes activated by the presence of phytopathogens have been identified, which offers the possibility of ensuring the continuous and regular expression of those genes in the plant through genetic engineering in order to avoid infection processes. Therefore, the objective of this study was to identify and isolate *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1* using genetic engineering, clone them in transformation vectors and introduce them into two *Agrobacterium tumefaciens* strains for future implementation in citrus genetic transformation using endogenous genes in order to induce resistance to CLas and CTV.

## MATERIALS AND METHODS

**Biological material.** Plants of *Arabidopsis thaliana* and sweet orange (*Citrus sinensis*) were grown in a mixture of peat moss-perlite substrate (60:40) under

tuvo como propósito identificar y aislar los genes *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* a través de ingeniería genética, clonarlos en vectores de transformación e introducirlos en dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para su implementación futura en transformación genética de cítricos con genes endógenos para inducir la resistencia a CLas y CTV.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Material biológico.** Las plantas de *Arabidopsis thaliana* y de naranja dulce (*Citrus sinensis*) fueron crecidas en una mezcla de sustrato peat moss-perlita (60:40) en condiciones de invernadero a una temperatura de 27-30 °C y 2243 m.s.n.m. en Montecillo Texcoco, Estado de México.

**Análisis bio-informático.** Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) para buscar las secuencias consenso de la base de datos de *Arabidopsis* (Pajerowska M.K. *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) y de *C. sinensis* (Lu *et al.*, 2013); se eligió la secuencia con mayor similaridad (Query). Para el análisis de alineamiento de las secuencias conservadas de los genes reportados se utilizó el programa Mega6. Los cebadores diseñados se analizaron con los programas Oligo Analyzer tool, Primer Questo Tool (IDT, Integrated DNA Technologies) y con NEBcutter (BioLabs) para analizar la posible formación de dímeros e identificar los sitios de restricción en los cebadores.

**Extracción de ADN.** La extracción de ADN para el aislamiento de los genes *AZI-1* y *PR-1*, se llevó a cabo usando 0.1 gramos de hojas maduras de *A. thaliana* siguiendo el método de CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987). Mientras que para el aislamiento de *CsNDR-1* se emplearon hojas jóvenes de *C. sinensis* usando el QIAGEN DNAeasy kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de

greenhouse conditions at 27-30 °C temperature and 2243 masl, in Montecillo, Texcoco, State of Mexico.

**Bioinformatic analysis.** The consensus sequences in the *Arabidopsis* (Pajerowska M.K. *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) and *C. sinensis* database (Lu *et al.*, 2013) were found using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) program, and the sequence with the highest similarity (Query) was selected. The analysis of alignment of the conserved sequences of the reported genes was conducted using the Mega6 program. The designed primers were analyzed using the Oligo Analyzer Tool and Primer Questo Tool (IDT, Integrated DNA Technologies) programs, and NEBcutter (BioLabs) was used to detect the possible formation of dimers and identify the restriction sites in the primers.

**DNA extraction.** To extract DNA from the *AZI-1* and *PR-1* gene isolates, 0.1 gram of mature *A. thaliana* leaves was used following the method of 2% CTAB (Doyle and Doyle, 1987). To extract DNA from the *CsNDR-1* isolate, young leaves of *C. sinensis* and the QIAGEN DNAeasy kit were used following the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured using 1 µL of the sample in a Nanodrop (Thermo SCIENTIFIC, NANODROP 2000).

**Design of primers.** The gene search was conducted using BLAST. For the *CsNDR-1* gene the following sequence was found: gi|568842565|ref|XM\_006475151.1| PREDICTED: *Citrus sinensis* protein *CsNDR-1*-like (LOC102630232), mRNA. Based on the sequence found, one 'Forward' primer and one 'Reverse' primer were designed, both containing a series of 6 A/T followed by the sequence of the restriction enzyme selected for cloning plus the Kozac ACC sequence, and, finally, the primer sequence.

ADN se midió con 1 µL de la muestra en un nanodrop (Thermo SCIENTIFIC, NANODROP 2000).

**Diseño de iniciadores.** Se realizó la búsqueda de los genes en BLAST. Para el gen *CsNDR-1* se ubicó la secuencia gi|568842565|ref|XM\_006475151.1| PREDICTED: *Citrus sinensis* protein *CsNDR-1*-like (LOC102630232), mRNA. Con la secuencia encontrada se diseñó un iniciador 'Forward' y uno 'Reverse' ambos conteniendo una serie de 6 A/T seguida de la secuencia de la enzima de restricción elegida para la clonación más la secuencia Kozac ACC y finalmente la secuencia del iniciador.

Para el caso del gen *AZI-1* se encontró el siguiente registro gi|30682133|ref|NM\_117317.4| *Arabidopsis thaliana* azelaic acid induced 1 (AT4G12470), mRNA y para el *PR-1* gi|17381133|AY064023| *Arabidopsis thaliana* putative pathogenesis-related *PR-1* protein (At2g14610), mRNA. Con las secuencias encontradas se diseñó un iniciador 'Forward' y 'Reverse' para cada gen.

**Identificación y Amplificación de genes.** La detección y amplificación de los genes por PCR punto final se realizó con cebadores específicos para cada gen incluyendo sitios de restricción para la clonación (Cuadro 1).

En el diseño de los cebadores se incorporaron sitios de restricción de *Apal* (GGGCCC) y *SpeI* (ACTAGT) además de varias adeninas seguidas a esos sitios de restricción. Se usó un volumen final de 25 µL conteniendo 5 µL de ADN, 2.5 µL de 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 (Invitrogen), 0.5 µL de dNTPs 10 mM (Promega), 1 µL de cada cebador (10 pmol), H<sub>2</sub>O libre de ARNsa/ADNsa (Invitrogen) y 0.2 µL de Taq polimerasa (Invitrogen). Se usó un programa de amplificación de 35 ciclos para *AZI-1* y *PR-1*: 95 °C por 30 s, 68 °C por 30 s y 68 °C por 30 s. Para *CsNDR-1* 35 ciclos: 95 °C por 30 s, 66 °C por 30 s y 68 °C por 40 s. Los tres genes tuvieron una primera etapa de

The following record of the *AZI-1* gene was found: gi|30682133|ref|NM\_117317.4| *Arabidopsis thaliana* azelaic acid induced 1 (AT4G12470), mRNA, and for *PR-1* gi|17381133|AY064023| *Arabidopsis thaliana* putative pathogenesis-related *PR-1* protein (At2g14610), mRNA. Based on the sequences found, the 'Forward' and 'Reverse' primers were designed for each gene.

**Gene identification and amplification.** Gene detection and amplification through end-point PCR was performed using specific primers for each gene, including restriction points for cloning (Table 1).

To design the primers, restriction sites of *Apal* (GGGCCC) and *SpeI* (ACTAGT) were incorporated, as well as several adenines following the restriction sites. For this, we used a final volume of 25 µL of a mixture containing 5 µL of DNA, 2.5 µL of 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1 µL of MgCl<sub>2</sub> 50 (Invitrogen), 0.5 µL of dNTPs 10 mM (Promega), 1 µL of each primer (10 pmol), RNAsa/DNAsa-free H<sub>2</sub>O (Invitrogen) and 0.2 µL of Taq polymerase (Invitrogen). The amplification program consisted of 35 cycles for *AZI-1* and *PR-1*: 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s and 68 °C for 30 s. For *CsNDR-1*, 35 cycles: 95 °C for 30 s, 66 °C for 30 s and 68 °C for 40 s. The three genes had an initial pre-denaturation stage at 95 °C for 2 min and a final extension stage at 68 °C for 5 min.

The PCR products were analyzed in 1% agarose gel, with 5 µL of the PCR product and 3 µL of load buffer (Promega). The gel was run at 90 volts, 400 amperes for one hour, and was dyed in ethidium bromide for 5 min. The PCR products that amplified at the expected size were purified using the QIAquick® PCR Purification kit and sequenced to corroborate the isolation of the tested gene before using engineering.

**Vector construction.** The pUC118-FMV-Poly-2-1 vector (Febres *et al.*, 2003) was grown in

**Cuadro 1. Cebadores diseñados para aislar y clonar los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*.  
Table 1. Primers designed to isolate and clone the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes.**

| Cebador <sup>x</sup> | Secuencia <sup>y</sup>   | Amplicon <sup>z</sup> |
|----------------------|--|-----------------------|
| <i>AZII</i> F        | 5' AAAGGGCCCATGGCTTCAAAGAACTCAGCCTCTCTTG-3'                    |                       |
| <i>AZII</i> R        | 5'-AAA <del>ACTAGTT</del> CAAGCACATTGGAAACCAGATGGAAGC-3'       | 486pb                 |
| <i>PR-1</i> F        | 5'AAAGGGCCCATGAATTTTACTGGCTATTCTCGATTTTTAA-3'                  |                       |
| <i>PR-1</i> R        | 5'-AAA <del>ACTAGTT</del> TAGTATGGCTTCTCGTTCACATAATTCC-3'      | 486pb                 |
| <i>CsNDR1</i> F      | 5'-AAA AAAGGGCCCA <del>CCATGTCAGAAAA</del> CGCCGGTGGGTGCTGC-3' |                       |
| <i>CsNDR1</i> R      | 5'-AAAAAA <del>ACTAGTT</del> TAAAGCAAAAATCAAGACAAAAAATACAAC-3' | 618pb                 |

<sup>x</sup>Nombre de los cebadores F:forward, R: reverse / Name of the primers: F:forward, R: reverse.

<sup>y</sup>Secuencia de cada cebador empleado / Sequence of each primer used.

<sup>z</sup>tamaño del amplicon a obtener para cada gen / Size of the amplicon to obtain each gene.

predesnaturalización de 95 °C por 2 min y una etapa final de extensión de 68 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%, con 5 µL de producto de PCR y 3 µL de Buffer de carga (Promega). El gel se corrió a 90 Volts, 400 Amperios, durante una hora, dejando teñir en bromuro de etidio por 5 min. Los productos de PCR que amplificaron del tamaño esperado se purificaron con QIAquick® PCR Purification Kit y fueron secuenciados para corroborar el aislamiento del gen en cuestión antes de continuar con la ingeniería.

**Contrucción del vector.** El vector pUC118-FMV-Poly-2-1 (Febres *et al.*, 2003) fue crecido en tres mililitros de medio líquido 2xYT (extracto de levadura 10 g L, triptone 16 g L, NaCl 5 g L) conteniendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina (amp) a 37 °C por 12 h para después aislar el plásmido con el QIAprep®Spin miniprep kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* purificados y el vector pUC118-FMV-Poly-2-1 aislado fueron digeridos con las enzimas de restricción *Apal* y *SpeI* a la temperatura y tiempo recomendado para cada enzima. La doble digestión de los tres genes y del vector pUC118-FMV-Poly-2-1 producen un solo fragmento por lo que se

three millimeters of 2xYT liquid culture medium (yeast extract 10 g L, tryptone 16 g L, NaCl 5 g L) containing 100 µg mL<sup>-1</sup> of ampicillin (amp) at 37 °C for 12 h and then the plasmid was isolated using the QIAprep®Spin miniprep kit, following the manufacturer's instructions. The purified *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes, as well as the pUC118-FMV-Poly-2-1 isolated vector, were digested with *Apal* and *SpeI* restriction enzymes at the temperature and time recommended for each enzyme. The double digestion of the three genes and vector pUC118-FMV-Poly-2-1 produce a single fragment, so they were purified using a QIAquick® PCR Purification kit, and then ligated for 12 h at 4 °C. The digestion products were cloned in *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) using 80 to 100 ng µL<sup>-1</sup> of DNA by electroporation under one pulse conditions at 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacteria that were supposedly transformed were sown in a 2xYT solid culture medium containing 100 µg mL<sup>-1</sup> of amp; three aliquots of transformed cells (10, 20 and 50 µL) were tested using a sterile microinjector to distribute them on the medium surface. After 12 h at 37 °C, several individual colonies formed and were analyzed using PCR with the previously mentioned primers in order to corroborate the presence of the genes.

purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit para posteriormente ser ligados durante 12 h a 4 °C. Los productos de la digestión fueron clonados en *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) con 80 a 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN por electroporación bajo condiciones de un pulso a 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las bacterias presuntamente transformadas fueron sembradas en medio sólido 2xYT conteniendo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de amp probando tres alícuotas de células transformadas (10, 20 y 50  $\mu\text{l}$ ) empleando una micropunta estéril y distribuyendo en la superficie del medio. Transcurridas 12 h a 37 °C varias colonias individuales crecidas fueron analizadas mediante PCR con los cebadores antes mencionados para corroborar la presencia de los genes. Los productos de PCR se corrieron en un gel con 0.8% de agarosa a 100 volts por 30 min.

Las colonias identificadas positivas se crecieron en tres ml de medio líquido 2xYT conteniendo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de amp a 37 °C a 230 rpm durante 12 h. Con la mitad del cultivo bacteriano crecido (1.5 mL) se realizó la extracción del plásmido con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN y se mandó a secuenciar para verificar las secuencias de los tres genes. Con la otra mitad de los cultivos bacterianos se hicieron 'stocks' con glicerol y se almacenaron a -80 °C.

Para continuar con la inserción de los genes de interés ahora en plásmidos vectores de transformación pCAMBIA se procedió como sigue: las bacterias con los tres genes contenidos independientemente en pUC118-FMV-Poly-2-1 fueron crecidas en medio sólido 2xYT con 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina mientras que aquellas que contenían los plásmidos pCAMBIA2201 y pCAMBIA 2301 se crecieron en medio sólido 2xYT con 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cloranfenicol (Cap) o 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina (Kan) respectivamente por 12 h a 37 °C. Los plásmidos fueron extraídos con el QIAprep® Spin Miniprep Kit y fueron subsecuentemente digeridos con las

The PCR products were run in 0.8% agarose gel at 100 volts for 30 min.

The positive colonies were sown in three ml of 2xYT liquid culture medium containing 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of amp at 37 °C at 230 rpm for 12 h. Using half of the bacterial culture that had grown (1.5 ml), the plasmid was extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit from QIAGEN and sent out for sequencing to verify the sequences of the three genes. With the other half of the bacterial cultures, "stocks" were prepared using glycerol and then stored at -80 °C.

To continue inserting the genes of interest now into pCAMBIA transformation vector plasmids, the following procedure was used: the bacteria with the three genes independently contained in pUC118-FMV-Poly-2-1 were grown in 2xYT solid culture medium with 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of ampicillin, while those containing the pCAMBIA2201 and pCAMBIA 2301 plasmids were grown in solid 2xYT culture medium with 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of chloramphenicol (Cap) or 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of kanamycin (Kan), respectively, for 12 h at 37 °C. The plasmids were extracted with a QIAprep® Spin Miniprep kit and then digested with *Bam*HI and *Sph*I restriction enzymes at the temperature and time recommended for each enzyme. The double digestion products of pUC118-FMV-Poly-2-1 were purified using the QIAgen gel purification kit, while the double digestion products of the pCAMBIA vectors were purified using the QIAprep Miniprep kit. Product ligation was carried out by incubating them at 4 °C for 12 h. The digestion products were cloned in *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) using 80 to 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA by electroporation under one pulse conditions at 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacteria that were supposedly transformed were sown in 2xYT solid culture medium containing 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Cap for pCAMBIA2201, or 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Kan for pCAMBIA 2301; three aliquots of

enzimas de restricción *Bam*HI y *Sph*I a la temperatura y tiempo recomendado para cada enzima. Los productos de la doble digestión de pUC118-FMV-Poly-2-1 fueron purificados usando el QIAgen gel purification kit en tanto que los productos de la doble digestión de los vectores pCAMBIA fueron purificados con el Qiaprep Miniprep Kit. La ligación de los productos se realizó incubándolos durante 12 h a 4 °C. Los productos de la digestión fueron clonados en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) con 80 a 100ng/ $\mu$ l de ADN por electroporación bajo condiciones de un pulso a 1.8 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las bacterias presuntamente transformadas fueron sembradas en medio sólido 2xYT conteniendo 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Cap para pCAMBIA2201 o 50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Kan en el caso de pCAMBIA 2301 probando tres alícuotas de células transformadas (10, 20 y 50  $\mu$ L) empleando una micropunta estéril y distribuyendo en la superficie del medio. Transcurridas 12 h a 37 °C varias colonias individuales crecidas fueron analizadas mediante PCR con los cebadores específicos para corroborar la presencia de cada uno de los tres genes.

Una vez más las colonias individuales que resultaron positivas se crecieron en medio líquido con los antibióticos respectivos para cada plásmido durante a 37 °C a 230 rpm por 12 h. De igual manera, una alícuota se mandó a secuenciar y con la otra alícuota de bacterias se hicieron ‘stocks’ para almacenar a -80 °C.

**Transformación de *A. tumefaciens*.** Los plásmidos pCAMBIA con las construcciones fueron crecidos en medio sólido 2xYT conteniendo 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Cap para pCAMBIA2201 o 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Kan en el caso de pCAMBIA 2301 a 37 °C por 12 h, transcurrido este tiempo los plásmidos se extrajeron con el Qiaprep Spin miniprep kit. Las cepas competentes de *A. tumefaciens* EHA 105 y AGL 1 (Kayim y Koc 2005; Almeida *et al.*, 2003)

transformed cells (10, 20 and 50  $\mu$ L) were tested using a sterile microinjector to distribute them on the medium surface. After 12 h at 37 °C, several individual colonies formed and were analyzed through PCR using the specific primers in order to corroborate the presence of each of the three genes. Once more, the positive colonies were individually grown in a liquid culture medium containing the corresponding antibiotics for each plasmid at 37 °C at 230 rpm for 12 h. Similarly, one aliquot was sent out for sequencing, and the other aliquot of bacteria was used to prepare “stocks” that were stored at -80 °C.

**Transformation of *A. tumefaciens*.** The pCAMBIA plasmids with the constructions were grown in 2xYT solid culture medium containing 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of Cap for pCAMBIA2201, or 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of Kan for pCAMBIA 2301 at 37 °C for 12 h, and then the plasmids were extracted using the Qiaprep Spin miniprep kit. The competent EHA 105 and AGL 1 strains of *A. tumefaciens* (Kayim and Koc 2005; Almeida *et al.*, 2003) were selected for transformation through electroporation (Bio-Rad, 165-2100) under one pulse conditions at 2.5 kV (Bio-Rad, 165-2100). The bacterial cells of the EHA 105 strain that were supposedly transformed were grown in solid YEP culture medium (10 g L of bactopectone, NaCl 5 g L, yeast extract 10 g L) with rifampicin (Rif) (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and Kan (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), while the cells of the AGL 1 strain were grown in solid YEP culture medium with Rif (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), Kan (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and carbenicillin (Carb) (25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Aliquots of 50, 100 and 200  $\mu$ L of the two *Agrobacterium* strains were tested and incubated for two to three days at 27 °C. The individual colonies that grew were analyzed through end-point PCR using the primers and under the conditions previously described for each gene. The colonies that were positive were sent out for sequencing. The

se eligieron para ser transformadas mediante electroporación (Bio-Rad, 165-2100) bajo las condiciones de un pulso a 2.5 kV (Bio-Rad, 165-2100). Las células bacterianas presuntamente transformadas de la cepa EHA 105 fue crecidas en medio sólido YEP (bactopeptone 10 g L, NaCl 5 g L, extracto de levadura 10 g L) con rifampicina (Rif) ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Kan ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mientras que las células de la cepa AGL 1 fueron crecidas en medio sólido YEP con Rif ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Kan ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y carbenicilina (Carb) ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se probaron alícuotas de 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$  de las dos cepas de *Agrobacterium* y se incubaron durante dos a tres días a 27 °C. Las colonias individuales crecidas se analizaron por PCR punto final con los iniciadores y condiciones antes descritos por cada gen, las que resultaron positivas se mandaron a secuenciar. Aquellas colonias cuya transformación y construcción se verificaron mediante la secuenciación se crecieron en medio YEP líquido con los antibióticos respectivos antes de criopreservarlas a -80 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Identificación de los genes.** La concentración de ADN de *Arabidopsis* fue de 478.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  con un valor de unidades de densidad óptica (D.O.) de 2.04. La concentración de ADN de *C. sinensis* fue de 48.7 y su lectura D.O. fue de 1.7. Los productos de PCR corridos en el gel de agarosa mostraron las bandas del tamaño esperado, de 486 pb correspondiente al gen *AZI-1* y *PR-1* y para el gen *CsNDR-1* se obtuvo una banda de 618 pb (Figura 1). La secuenciación de los productos mostró identidad del 99% al menos.

**Clonación de los genes en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1.** Los genes purificados se insertaron en el vector pUC118-FMV-poly-2-1 (Febres

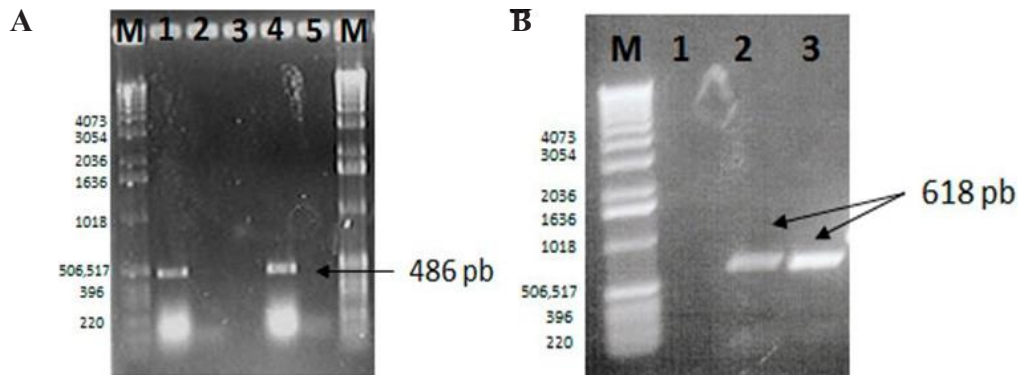
colonies whose transformation and construction were verified through sequencing were grown in liquid YEP culture medium using the corresponding antibiotics before being cryopreserved at -80 °C.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identifying genes.** The concentration of *Arabidopsis* DNA was 478.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  with a value of optical density (O.D.) units of 2.04. The concentration of *C. sinensis* DNA was 48.7, and its OD reading was 1.7. The PCR products run in agarose gel showed bands of the expected size, that is, 486 pb, corresponding to the *AZI-1* and *PR-1* genes, and for the *CsNDR-1* gene one 618 pb band was obtained (Figure 1). Sequencing of the products showed at least 99% identity.

**Cloning genes in the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid.** The purified genes were inserted into the pUC118-FMV-poly-2-1 vector (Febres *et al.*, 2013). Individual *E. coli* colonies that grew were analyzed through PCR to detect the transformed colonies. For the *AZI-1* gene, 18 colonies were analyzed using the *AZI-1* F/*AZI-1* R primers, and three positive colonies were obtained (Figure 2A, lanes 2, 4 and 10). For the *PR-1* gene, 18 colonies were also analyzed using the *PR-1* F/*PR-1* R primers, and six positive colonies were obtained (Figure 2B, lanes 2, 9, 11 to 13, and 16). For the *CsNDR-1* gene, the transformation was done twice, and a total of 35 colonies were analyzed using the *CsNDR-1* F/*CsNDR-1* R primers; two positive colonies were obtained, and one of them appears in lane 12 of Figure 2C. All the colonies that were positive by PCR were sent out for sequencing, and the colony of each of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes that showed the greatest similarity with the sequence reported in the database of the NCBI GenBank was selected to continue cloning in





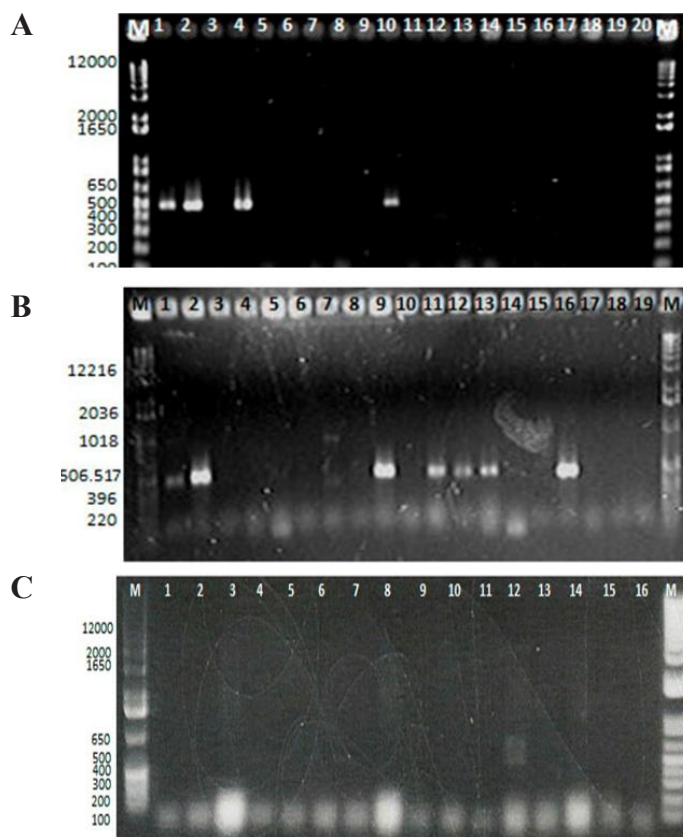
**Figura 1.** Amplificación de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*. Geles de agarosa al 1.5 %, con 5  $\mu$ l de producto de PCR (carriles 1-2 y 4-5) más 3  $\mu$ l de buffer de carga. M; marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). Carril 1: amplificación del gen *AZI-1* de *Arabidopsis*. Carril 2: control negativo del gen *AZI-1*. Carril 4: amplificación del gen *PR-1* de *Arabidopsis*. Carril 5: control negativo del gen *PR-1*. B). Carril 1: control negativo de *CsNDR-1*. Carril 2 y 3: amplificación del gen *CsNDR-1*.

**Figure 1.** Amplification of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes. 1.5% agarose gels with 5  $\mu$ l of PCR product (lanes 1-2 and 4-5) plus 3  $\mu$ l of load buffer. M; molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). Lane 1: amplification of the *Arabidopsis AZI-1* gene. Lane 2: negative control of the *AZI-1* gene. Lane 4: amplification of the *Arabidopsis PR-1* gene. Lane 5: negative control of the *PR-1* gene. B). Lane 1: *CsNDR-1* negative control. Lanes 2 and 3: amplification of the *CsNDR-1* gene.

*et al.*, 2013). Las colonias individuales de *E. coli* que crecieron se analizaron por PCR para detectar las transformadas. Para el gen *AZI-1* se analizaron 18 colonias con los iniciadores *AZI-1 F/AZI-1 R*, obteniendo tres colonias positivas (Figura 2A, carriles 2, 4 y 10). Para el gen *PR-1* se analizaron de igual forma 18 colonias con los iniciadores *PR-1 F/PR-1 R*, obteniendo seis colonias positivas (Figura 2B, carriles 2, 9, 11 al 13 y 16). Para el gen *CsNDR-1* se repitió la transformación dos veces y se analizaron un total de 35 colonias con los iniciadores *CsNDR-1 F/CsNDR-1 R*, se obtuvieron dos colonias positivas y se muestra una en el carril 12 de la Figura 2C. Se mandaron a secuenciar todas las colonias que resultaron positivas por PCR y la colonia de cada uno de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* que mostró la mayor similitud con la secuencia reportada en la base de datos de GenBank de NCBI, se eligió para continuar con la clonación en el vector pUC118-FMV-poly-2-1. Para el caso del gen *PR-1* la colonia tres mostró la mayor similitud (99%), en el caso del gen *AZI-1* la colonia

vector pUC118-FMV-poly-2-1. For the *PR-1* gene, colony three showed the highest level of similarity (99%); in the case of the *AZI-1* gene, colony one showed 99% similarity, and colony 14 showed 99% similarity in the *CsNDR-1* gene. Three constructions were built using the best colonies of each gene inserted between the FMV promoter and the 35S termination signal of pUC118-FMV-Poly-2-1 (Figure 3A, B and C).

The genes isolated in this study (*CsNDR-1*, *AZI-1*, *PR-1*) have been consistently described as possible candidates for generating resistance to several pathogens (Lu *et al.*, 2013). These genes are part of the 633 genes that are altered after inoculation with CLAs, according to Mafra *et al.* (2013), and are associated with the plant's systemic acquired resistance (SAR). Several authors have also identified these genes as part of the plant's response to CLAs and CTV attacks (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016), and, for this reason, they were selected to develop the constructions.



**Figura 2.** Confirmación mediante PCR de colonias DH5α transformadas con los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* contenidos en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1. Fragmentos amplificados en gel de agarosa al 0.8%. M: marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). Carril 1: Control positivo del gen *AZI-1*. Carril 2, 4 y 10: Amplificación del gen esperado. Carril 19: control negativo del gen *AZI-1*. B). carril 1: control positivo del gen *PR-1*. Carril 2, 9, 11, 12, 13 y 16; colonias positivas de la amplificación del gen *PR-1*. Carril 19: control negativo del gen *PR-1*. C). Carril 1 al 15, colonias analizadas del gen *CsNDR-1*. Carril 12: muestra positiva. Carril 16; control negativo.

**Figure 2.** PCR confirmation of DH5α colonies transformed with the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes contained in the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid. Amplified fragments in 0.8% agarose gel. M: molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). Lane 1: Positive control of the *AZI-1* gene. Lanes 2, 4 and 10: Amplification of the expected gene. Lane 19: negative control of the *AZI-1* gene. B). lane 1: positive control of the *PR-1* gene. Lanes 2, 9, 11, 12, 13 and 16: positive colonies from the amplification of the *PR-1* gene. Lane 19: negative control of the *PR-1* gene. C). Lanes 1-15: *CsNDR-1* gene colonies analyzed. Lane 12: positive sample. Lane 16: negative control.

uno mostró una similaridad del 99% y la colonia 14 fue la que mostró 99% de similaridad en el gen *CsNDR-1*. Se obtuvieron tres construcciones con las mejores colonias de cada uno de los genes insertadas entre el promotor FMV y señal de terminación 35S de pUC118-FMV-Poly-2-1 (Figura 3A, B y C).

Los genes aislados en esta investigación *CsNDR-1*, *AZI-1*, *PR-1* han sido descritos

The pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid was selected because of its small size, and because it produces a large number of copies (500-700). In addition, its multiple cloning site facilitates the integration of DNA fragments within this vector (Febres *et al.*, 2013), and it is also compatible for subsequent cloning within the pCAMBIA vectors incorporating the CaMV35S and/or NOS promoters and terminators of pCAMBIA.

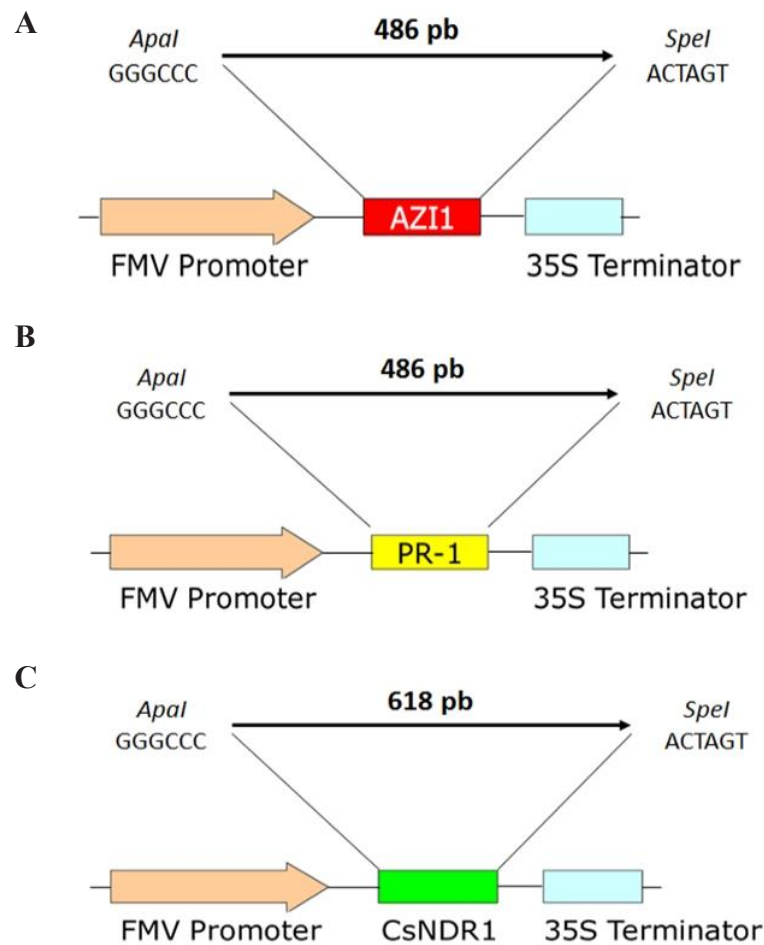


Figura 3. Representación esquemática de las construcciones de los genes insertadas en el plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1. A). *AZI-1*, B). *PR-1* y C). *CsNDR-1*. En la imagen se muestran los genes *AZI-1* (rojo), *PR-1* (amarillo) y *CsNDR-1* (verde) clonados bajo el promotor FMV (anaranjado) y su señal de terminación 35S (azul). En la parte superior de cada construcción se indica el tamaño del amplicón y las enzimas de restricción utilizadas durante la clonación.

Figure 3. Schematic representation of the constructions of the genes inserted into the pUC118-FMV-Poly-2-1 plasmid. A). *AZI-1*, B). *PR-1*, and C). *CsNDR-1*. The image shows the *AZI-1* (red), *PR-1* (yellow) and *CsNDR-1* (green) genes cloned under the FMV promoter (orange) and their 35S termination signal (blue). The upper part of each construction indicates the size of the amplicon and the restriction enzymes used during cloning.

consistentemente como posibles candidatos para generar resistencia a diversos patógenos (Lu *et al.*, 2013). Dichos genes forman parte de los 633 genes que se ven alterados después de la inoculación con CLas de acuerdo con Mafra *et al.*, (2013), los cuales están relacionados con la respuesta sistémica adquirida (RSA) de la planta. Varios autores han identificado también estos genes como parte de la

**Cloning in pCAMBIA plasmids.** The constructions containing the genes of interest were inserted into vectors pCAMBIA 2201 and 2301. The cloning process was repeated twice, modifying DNA concentrations in the ligation reaction because no transformed colonies with the genes of interest were found. Twenty-one colonies were analyzed in each experiment, for a total of

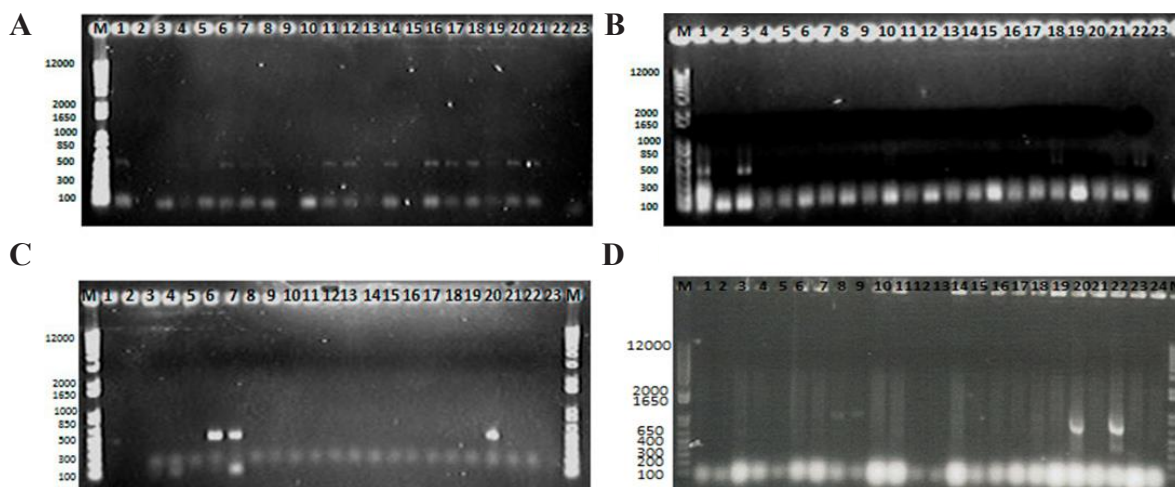
respuesta de la planta ante el ataque por CLas y CTV (Hu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017; Da Graca *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016), por tal motivo, fueron elegidos para el desarrollo de estas construcciones.

El plásmido pUC118-FMV-Poly-2-1 fue seleccionado por su tamaño pequeño, por generar un gran número de copias (500 a 700), su sitio múltiple de clonación que permite la fácil integración de los fragmentos de ADN dentro de este vector (Febres *et al.*, 2013); además de ser compatible, para la subsecuente clonación dentro de los vectores pCAMBIA, incorporando los promotores y terminadores CaMV35S y/o NOS de pCAMBIA.

**Clonación en plásmidos pCAMBIA.** Las construcciones que contenían los genes de interés fueron insertadas en los vectores pCAMBIA 2201 y 2301. El proceso de clonación se repitió por duplicado, modificando las concentraciones de ADN en la reacción de ligación, al no encontrar colonias transformadas con los genes de interés. En cada experimento se analizaron 21 colonias, dando un total de 42 colonias analizadas por cada gen. Para el gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA 2201, se modificó la concentración de ADN-plásmido en la reacción de ligación de 31.8 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 108 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 63.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 72 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; las colonias crecidas se analizaron por PCR con los iniciadores AZI-1 F/AZI-1 R, obteniendo diez colonias positivas en la segunda repetición de clonación (Figura 4A). El gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA 2301 la modificación de la concentración de ADN en la ligación fue de 41.1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 82.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 86.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; de igual forma se analizaron por PCR las colonias crecidas con los mismos iniciadores AZI-1 F/AZI-1 R, se obtuvieron cuatro colonias positivas en el segundo experimento (Figura 4B). En cuanto al gen *PR-1* clonado en el vector pCAMBIA 2301, la concentración del ADN modificado en la ligación fue de 25.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 86.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a 37.8 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  - 72 ng

42 colonias analizadas para cada gen. Para el *AZI-1* gene clonado in pCAMBIA 2201, the concentration of DNA-plasmid was modified in the ligation reaction from 31.8 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -108 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  to 63.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -72 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; the grown colonies were analyzed by PCR using the AZI-1 F/AZI-1 R primers, and 10 positive colonies were obtained from the second cloning replication (Figure 4A). The *AZI-1* gene clonado in pCAMBIA 2301, the DNA concentration in the ligation reaction was from 41.1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  to 82.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -86.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; the grown colonies were also analyzed by PCR using the AZI-1 F/AZI-1 R primers, and four positive colonies were obtained from the second experiment (Figure 4B). For the *PR-1* gene clonado in the pCAMBIA 2301 vector, the DNA concentration in the ligation reaction was modified from 25.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -86.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  to 37.8 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ -72 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , and two hours were added to the incubation step after the electric shock; the grown colonies were analyzed using the PR-1 F/PR-1 R primers, and three positive colonies were obtained in the last experiment (Figure 4C). The constructions amplified a product of 486 pb, as expected. For the *CsNDR-1* gene in pCAMBIA, a single test was carried out; 32 colonies were analyzed and only two positive colonies were obtained (Figure 4D).

All the constructions containing the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes under the FMV promoter and the 35S terminator were cloned between the neomycin fosfotransferasaII (*ntptII*) selection gene that confers resistance to kanamycin and the  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*) reporter gene, known as GUS, of the pCAMBIA 2201 and 2301 plasmids. The *ntptII* transformation selection gene remained with the 35S promoter and terminator, and the GUS reporter gene remained with the 35S promoter and the NOS terminator. The *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes clonado in pCAMBIA 2301 have the *ntptII* gene as the bacterium selection gene (Figure 5A,



**Figura 4.** Confirmación mediante PCR de colonias DH5 $\alpha$  con los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* insertados en los plásmidos pCAMBIA 2201 y 2301. Fragmentos amplificados en gel de agarosa al 0.8%. M: marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). A). *AZI-1*-pCAMBIA 2201. Carril 1; Control positivo del gen *AZI-1*. Carril; 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16-21; Amplificación del gen esperado. Carril 23; control negativo. B). *AZI-1*-pCAMBIA 2301. Carril 1; Control positivo. Carril; 3, 18, 21 y 22; Amplificación del gen esperado. Carril 23; control negativo. C). *PR-1*-pCAMBIA 2301. Carril 1; control positivo del gen *PR-1*. Carril; 6, 7 y 20; colonias positivas de la amplificación del gen *PR-1*. Carril 23; control negativo. D). *CsNDR-1* en pCAMBIA 2301. Carril 20 y 22; colonias positivas para el gen *CsNDR-1*. Carril 24; control negativo.

**Figure 4.** PCR confirmation of DH5 $\alpha$  colonies with the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes inserted into the pCAMBIA 2201 and 2301 plasmids. Amplified fragments in 0.8% agarose gel. M: molecular weight marker (1 kb DNA ladder). A). *AZI-1*-pCAMBIA 2201. Lane 1: Positive control of the *AZI-1* gene. Lanes 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16-21: amplification of the expected gene. Lane 23: negative control. B). *AZI-1*-pCAMBIA 2301. Lane 1: positive control. Lanes 3, 18, 21 and 22: amplification of the expected gene. Lane 23: negative control. C). *PR-1*-pCAMBIA 2301. Lane 1: positive control of the *PR-1* gene. Lanes 6, 7 and 20: positive colonies from the amplification of the *PR-1* gene. Lane 23: negative control. D). *CsNDR-1* in pCAMBIA 2301. Lanes 20 and 22: positive colonies for the *CsNDR-1* gene. Lane 24: negative control.

$\mu\text{L}^{-1}$ , además de aumentar a dos horas el paso de incubación después del choque eléctrico, las colonias crecidas se analizaron con los iniciadores PR-1 F/ PR-1 R, obteniendo tres colonias positivas en el último experimento (Figura 4C). Las construcciones amplificaron un producto de 486 pb lo cual fue lo esperado. Para el gen *CsNDR-1* en pCAMBIA, se realizó un solo ensayo, se analizaron 32 colonias, obteniendo sólo dos colonias positivas (Figura 4D). Todas las construcciones que contenían los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* bajo el promotor FMV y el terminador 35S, fueron clonadas entre el gen de selección neomicin fosfotransferasaII (*ntptII*) que confiere resistencia a Kanamicina y el gen reportero

C and D). The *AZI-1* gene inserted in pCAMBIA 2201 is located under the bacterium selection gene to chloramphenicol (Figure 5 B).

The constructions were sent out for sequencing in order to corroborate the identity and orientation of the insertion before being transformed to *A. tumefaciens*; the ones that were at least 99% homologous were selected. Figure 6 shows 100% identity of colony two in the case of the *AZI-1* gene inserted in pCAMBIA2301. The pCAMBIA plasmids are successfully used in the genetic transformation of several plants, including citrus (De Oliveira *et al.*, 2015; Hajeri *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014).

$\beta$ -glucoronidasa (*uidA*) conocido como GUS de los plásmidos pCAMBIA 2201 y 2301. El gen de selección de transformación *nptII* quedó con el promotor y terminador 35S y el gen reportero GUS quedó con el promotor 35S y con el terminador NOS. Los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* clonados en pCAMBIA 2301 tienen como gen de selección de la bacteria al gen *nptII* (Figura 5A, C y D). El gen *AZI-1* insertado en pCAMBIA 2201 se encuentra bajo el gen de selección en bacteria a cloranfenicol (Figura 5 B).

Las construcciones se mandaron secuenciar para corroborar la identidad y orientación de la inserción antes de continuar con la transformación en *A. tumefaciens* se eligieron aquellas que mostraron una homología de 99% al menos. En la Figura 6 se muestra el 100% de identidad de la colonia dos para el caso del gen *AZI-1* insertado en pCAMBIA2301. Los plásmidos pCAMBIA se usan con éxito en transformación genética de diversas plantas incluyendo cítricos (De Oliveira *et al.*, 2015; Hajeri *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014).

**Transformación de *A. tumefaciens*.** Se hizo transformación de las dos cepas *A. tumefaciens* con los tres genes clonados en pCAMBIA y se analizaron con PCR colonias individuales para confirmar la transformación. La construcción del gen *PR-1* en pCAMBIA2301 en la cepa EHA105 produjo varias colonias individuales (Figura 7A); de igual manera la construcción del gen *CsNDR-1* en pCAMBIA2301 en la cepa Ag11 (Figura 7B). Los resultados de PCR confirmaron colonias positivas para ambos genes sin embargo la verificación mediante secuenciación no mostró alta identidad para el caso de la construcción con el gen *PR-1*. La construcción del gen *CsNDR-1* con el promotor FMV y el terminador 35S clonados en pCAMBIA 2301 logró ser insertada en las dos cepas de *A. tumefaciens* EHA 105 y AGL 1. Se analizaron 11 colonias

**Transformation of *A. tumefaciens*.** Two *A. tumefaciens* strains were transformed using the three genes cloned in pCAMBIA and then individual colonies were analyzed through PCR to confirm that they have been transformed. The construction of the *PR-1* gene in pCAMBIA2301 in the EHA105 strain developed several individual colonies (Figure 7A), as did the construction of the *CsNDR-1* gene in pCAMBIA2301 in the Ag11 strain (Figure 7B). The PCR results confirmed that there were positive colonies for both genes, but the verification through sequencing did not show a high level of identity in the case of the construction with the *PR-1* gene. The construction of the *CsNDR-1* gene with the FMV promoter and the 35S terminator cloned in pCAMBIA 2301 was successfully inserted into the two *A. tumefaciens* EHA 105 and AGL 1 strains. Eleven colonies were randomly analyzed through PCR using the *CsNDR-1* F/*CsNDR-1* R primers, and one positive colony was obtained in the EHA105 strain (Figure 8A), while four positive colonies were obtained for the AGL1 strain (Figure 8B). The low transformation efficiency of *Agrobacterium* and *E. coli* is somewhat common in gene construction and cloning experiments. Gelvin (2003) mentioned that many factors may be involved, such as the low competence of the bacterial cells, stressed cells, poor quality DNA, low or high DNA concentration during transformation, the conditions during fragment ligation, the conditions during electroporation, the incubation temperature, and the concentration of antibiotics, among others. The *A. tumefaciens* EHA 105 strain has been used in citrus genetic transformation and has produced excellent transformation percentages because of its virulence (Hao *et al.*, 2016; Dutt *et al.*, 2015). The AgL1 strain has also shown a high level of transformation in citrus (Shi *et al.*, 2016; Kayim and Koc 2005).

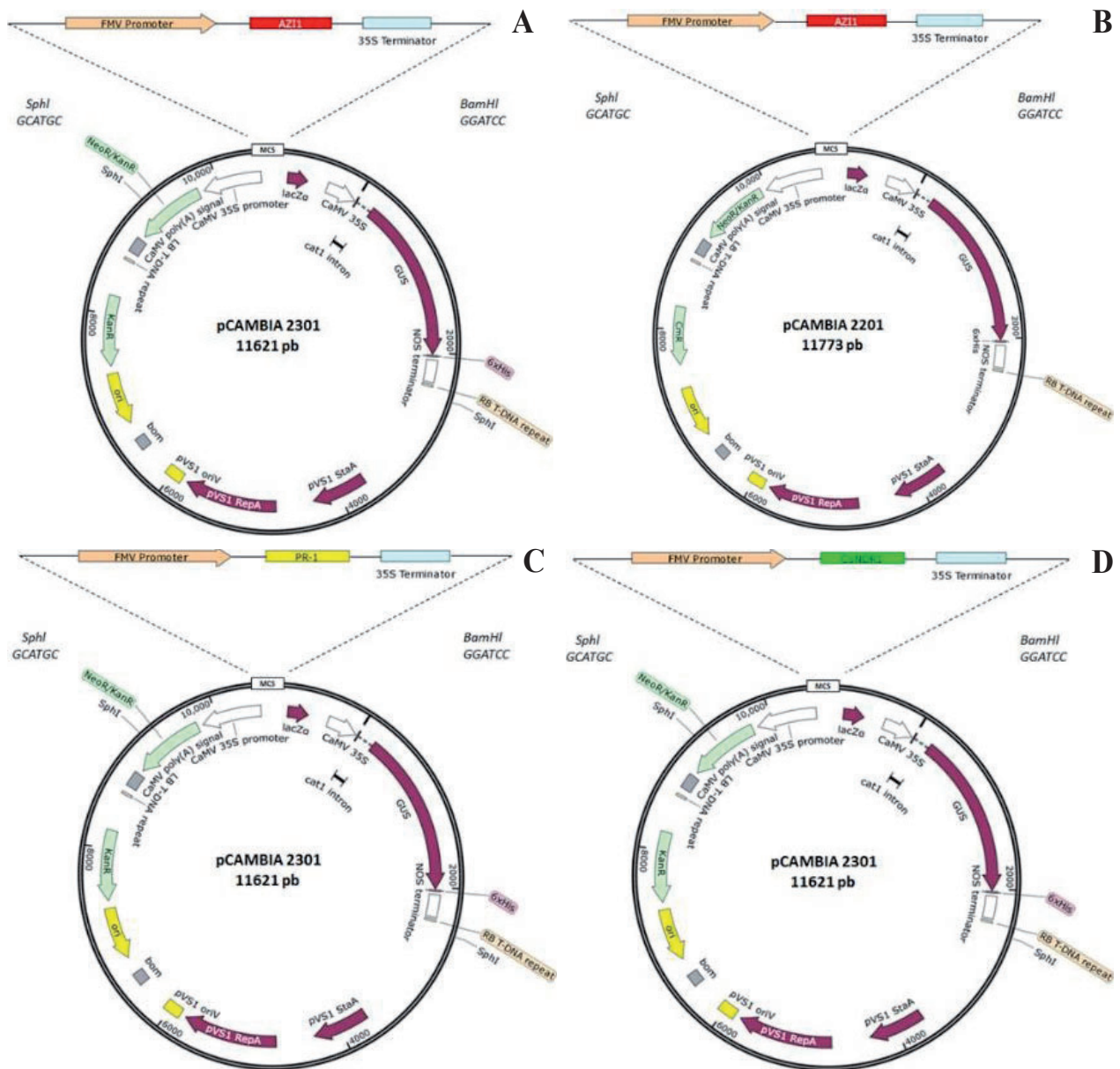


Figura 5. Representación esquemática de la construcción en pCAMBIA 2201 y 2301. Construcción FMV-*AZI-1*-35S insertada en los plásmidos A). pCAMBIA 2301, y B). pCAMBIA 2201. C). Construcción FMV-*PR-1*-35S, y D). Construcción FMV-*CsNDR-1*-35S insertadas en el plásmido pCAMBIA 2301. Los genes de interés, barras de color rojo, amarillo y verde, quedaron insertados entre el gen de selección *ntptII* que confiere resistencia a kanamicina con el promotor y terminador de CaMV (*Cauliflower mosaic caulimovirus*) y entre el gen reportero GUS bajo el promotor 35S del CaMV y terminador Nopalina sintasa (NOS).

Figure 5. Schematic representation of the construction in pCAMBIA 2201 and 2301. FMV-*AZI-1*-35S construction inserted into the plasmids A). pCAMBIA 2301, and B). pCAMBIA 2201. C). FMV-*PR-1*-35S construction, and D). FMV-*CsNDR-1*-35S construction inserted into the pCAMBIA 2301 plasmid. The genes of interest (red, yellow and green bars) were inserted between the *ntptII* selection gene that confers resistance to kanamycin with the CaMV (*Cauliflower mosaic caulimovirus*) promoter and terminator, and the GUS reporter gene under the 35S promoter of CaMV and the nopaline synthase (NOS) terminator.

Arabidopsis thaliana azelaic acid induced 1 (AZI1), mRNA

Sequence ID: [NM\\_117317.4](#) Length: 865 Number of Matches: 1

Range 1: 176 to 581 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect   | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|--|---------------|-----------|-----------|
| 750 bits(406) | 0.0  | 406/406(100%) | 0/406(0%) | Plus/Plus |
| Query 60      | TTGCAACTGCAAGCCAAGTCTTAAACCAAAGCCAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT  |               |           | 119       |
| Sbjct 176     | TTGCAACTGCAAGCCAAGTCTTAAACCAAAGCCAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT  |               |           | 235       |
| Query 120     | CCAATGTCTCTCCACCCCGTCTTCAAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT          |               |           | 179       |
| Sbjct 236     | CCAATGTCTCTCCACCCCGTCTTCAAGTCCCAAGTCTTAAAGCCCAAGCCGGT          |               |           | 295       |
| Query 180     | TCCACGCACCCCTGGTTCATCCGGAAACAGCTGTCTATTGATGCTCTCAAGCTCGGTGT    |               |           | 239       |
| Sbjct 296     | TCCACGCACCCCTGGTTCATCCGGAAACAGCTGTCTATTGATGCTCTCAAGCTCGGTGT    |               |           | 355       |
| Query 240     | ATGTGCAAAATGTCTTAAAGCAGTCTACTCAACATCCAGTTGGGACAGCCATCCTCTCAACA |               |           | 299       |
| Sbjct 356     | ATGTGCAAAATGTCTTAAAGCAGTCTACTCAACATCCAGTTGGGACAGCCATCCTCTCAACA |               |           | 415       |
| Query 300     | ATGTTGCTCGCTCATCCAAGGTTTGGTTGACGTCGACGCTGCGATTTGTCTATGCACTGC   |               |           | 359       |
| Sbjct 416     | ATGTTGCTCGCTCATCCAAGGTTTGGTTGACGTCGACGCTGCGATTTGTCTATGCACTGC   |               |           | 475       |
| Query 360     | TCTGAGGGCTAACGTTCTTGGTATCAACCTTAAAGTTCCGATATCTCTCAGCGTTCTTCT   |               |           | 419       |
| Sbjct 476     | TCTGAGGGCTAACGTTCTTGGTATCAACCTTAAAGTTCCGATATCTCTCAGCGTTCTTCT   |               |           | 535       |
| Query 420     | CAACGTTTGTAAACAGAAAGCTTCCATCTGGTTTCCAATGTGCTTGA                |               | 465       |           |
| Sbjct 536     | CAACGTTTGTAAACAGAAAGCTTCCATCTGGTTTCCAATGTGCTTGA                |               | 581       |           |

**Figura 6.** Análisis en GenBank de la secuencia del gen *AZI-1* clonado en pCAMBIA2301. La secuencia Query es el gen reportado de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia Sbjct es la clonada en esta investigación con el 100% de similitud. **Figure 6.** Analysis of the *AZI-1* gene cloned in pCAMBIA2301 conducted in the GenBank. The Query sequence is the *Arabidopsis thaliana* reported gene and the Sbjct sequence corresponds to the cloned sequence with 100% similarity obtained in this study.

al azar por PCR con los cebadores CsNDR-1 F/ CsNDR-1 R, obteniendo una colonia positiva en la cepa EHA105 (Figura 8A) mientras que para la cepa AGL1 se obtuvieron cuatro colonias positivas (Figura 8B). La baja eficiencia de transformación de *Agrobacterium* y de *E. coli* es algo común en experimentos de construcción y clonación de genes. Gelvin (2003) menciona que hay muchos factores que pudieran estar involucrados tales como la baja competencia de las células bacterianas, células estresadas, ADN de mala calidad, baja o alta concentración de ADN en la transformación, condiciones durante la ligación de fragmentos, condiciones de electroporación, la temperatura de incubación, concentraciones de antibióticos entre otros. La cepa de *A. tumefaciens* EHA 105 ha sido utilizada

## CONCLUSIONS

The *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes were isolated through PCR using the designed primers using the *Arabidopsis thaliana* and *Citrus sinensis* genome that had specific restriction sites for cloning. The isolated and cloned sequences of the *AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1* genes showed 99% similarity compared to the records of the *A. thaliana* and *C. sinensis* sequences in the NCBI GenBank database. The three genes (*AZI-1*, *PR-1* and *CsNDR-1*) were incorporated between the FMV promoter and the 35S CaMV terminator of the pUC118-FMV-poly 2-1 cloning vector. Cloning the genes in the pCAMBIA2301 and pCAMBIA2201 vectors made it possible to incorporate a transformation



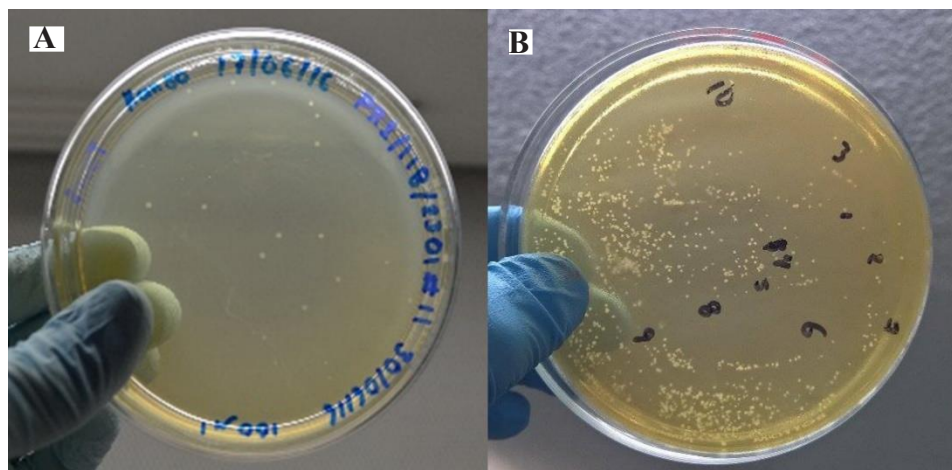


Figura 7. A). Colonias transformadas de *A. tumefaciens* EHA 105 con el plásmido pCAMBIA 2301 con el gen *PR-1* en el medio YEP con Rif (50 µl/ml). B). Colonias transformadas de *A. tumefaciens* Agl1 con el plásmido pCAMBIA 2301 con el gen *CsNDR-1* en el medio YEP con Rif (50 µl/ml), Kan (50 µg/ml) y Carb (25 µg/ml). Los números indican las colonias elegidas al azar para confirmar la presencia del gen mediante PCR.

Figure 7. A). Transformed colonies of *A. tumefaciens* EHA 105 with the pCAMBIA 2301 plasmid with the *PR-1* gene in YEP culture medium with Rif (50 µl/ml). B). Transformed colonies of *A. tumefaciens* Agl1 with the pCAMBIA 2301 plasmid with the *CsNDR-1* gene in YEP culture medium with Rif (50 µl/ml), Kan (50 µg/ml) and Carb (25 µg/ml). The numbers indicate the colonies that were randomly selected to confirm the presence of the gene using PCR.

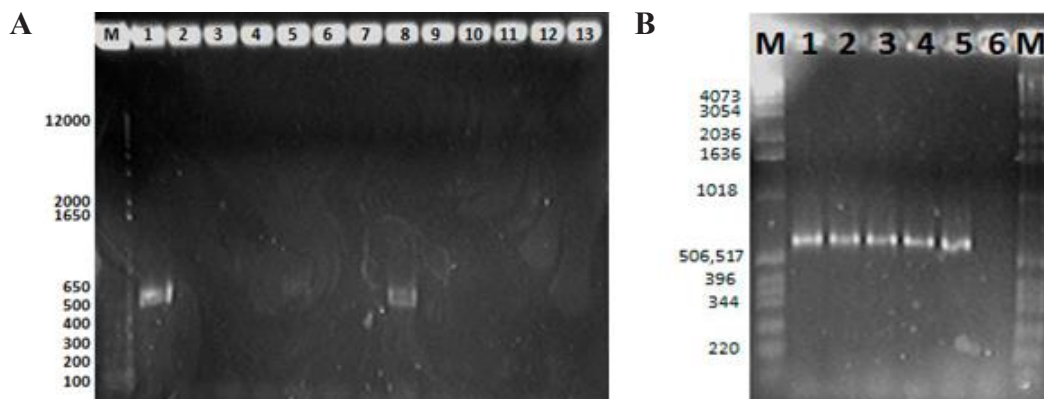


Figura 8. PCR de colonias de *A. tumefaciens*. M: Marcador molecular (1 kb DNA ladder). A). EHA 105 transformadas con el gen *CsNDR-1*. Carril 1: control positivo. Carril; 8 colonia positiva con el gen *CsNDR-1*. Carril 12: control negativo. B). AGL 1 transformada con el gen *CsNDR-1*. Carril 1: control positivo de *CsNDR-1*. Carril 2-5: colonias positivas con el gen *CsNDR-1*. Carril 6: control negativo.

Figure 8. PCR of *A. tumefaciens* colonies. M: Molecular marker (1 kb DNA ladder). A). EHA 105 transformed with the *CsNDR-1* gene. Lane 1: positive control. Lane 8: positive colony with the *CsNDR-1* gene. Lane 12: negative control. B). AGL 1 transformed with the *CsNDR-1* gene. Lane 1: *CsNDR-1* positive control. Lanes 2-5: positive colonies with the *CsNDR-1* gene. Lane 6: negative control.

en transformación genética en cítricos, mostrando excelentes porcentajes de transformación, debido a la virulencia que posee (Hao *et al.*, 2016; Dutt *et al.*, 2015). La cepa AgL1 ha mostrado de igual forma alto grado de transformación de cítricos (Shi *et al.*, 2016; Kayim y Koc 2005).

## CONCLUSIONES

Se lograron aislar los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* mediante PCR con los iniciadores diseñados a partir del genoma de *Arabidopsis thaliana* y de *Citrus sinensis* con sitios de restricción específicos para su clonación. Las secuencias aisladas y clonadas de los genes *AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1* mostraron el 99 % de similitud con respecto a los registros de las secuencias de *A. thaliana* y *C. sinensis* registrada en la base de datos de Genbank de NCBI.

Se incorporaron los tres genes entre el promotor FMV y el terminador 35S CaMV del vector de clonación pUC118-FMV-poly 2-1. La clonación de los genes en los vectores pCAMBIA2301 y pCAMBIA2201 permitió incorporar a las construcciones un gen de selección de transformación (35S-nptII-35S) y un gen reportero (35S-GUS-NOS). Los tres genes (*AZI-1*, *PR-1* y *CsNDR-1*) se clonaron independiente en pCAMBIA2301 sin embargo sólo el gen *AZI-1* logró clonarse en pCAMBIA2201.

El gen *CsNDR-1* fue incorporado a las cepas *A. tumefaciens* EHA 105 y AgL1. Los genes *AZI-1* y *PR-1* no se lograron integrar a estas cepas de *Agrobacterium*. La identificación, aislamiento y clonación de los genes *CsNDR-1*, *AZI-1* y *PR-1* involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de un patógeno podrían ser sobreexpresados mediante ingeniería genética en cítricos y ser usados para inducir resistencia a varios patógenos incluyendo la bacteria *Candidatus*

selection gene (35S-nptII-35S) and one reporter gene (35S-GUS-NOS) into the constructions. The three genes were then independently cloned into pCAMBIA2301 while gen *AZI-1* was cloned only into pCAMBIA2201.

The *CsNDR-1* gene was incorporated into the *A. tumefaciens* EHA 105 and AgL1 strains. Genes *AZI-1* and *PR-1* could not be integrated into any of the *Agrobacterium* strains. Identifying, isolating and cloning the *CsNDR-1*, *AZI-1* and *PR-1* genes involved in the plants defense mechanisms against a pathogen's attack may be over-expressed through genetic engineering in citrus and used to induce resistance to several pathogens, including the *Candidatus liberibacter* bacterium, the causal agent of HLB and *Citrus tristeza virus*.

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

liberibacter causante de la enfermedad HLB y al *Citrus tristeza virus*.

## LITERATURA CITADA

- Almeida AB, Mourão-Filho AA, Januzzi-Mendes BM, Pavan A. y Martinelli-Rodriguez AP. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. *Scientia Agricola* 60:1: 23-29. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162003000100005>.
- Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert D, Mackey D and Danglet J. 2004. Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *The Plant Cell*. 16:10: 2822-2835. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024117>
- Bové JM. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Plant Pathology*. 94(3):465-467.
- Da Graca JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G, and Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58(4):373-387. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>

- De Oliveira MLP, Stover ED and Thomson JG 2015. The *codA* gene as a negative selection marker in *Citrus*. SpringerPlus 4:264: 3-7. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1047-y>
- Ding F, Jin S, Hong N, Zhong Y and Cao Q. 2008. Vitri-fication–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the citrus Huanglong-bing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. Plant Cell Reports 27(2): 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0467-8>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin 19: 11-15.
- Dutt M, Barthe G, Irely M and Grosser J. 2015. Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR-1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). Public Library of Science One. 10:9: 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Febres VJ, Niblet CL, Lee RF and Moore GA. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. Plant Cell Reports 21: 421-428. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0528-y>
- Fu S, Shao J, Zhou Ch, and Hartung JS. 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and two strains of *Citrus Tristeza Virus*. BMC Genomics 17:349 <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>.
- Gao QM, Zhu S, Kachroo P and Kacharoo A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. Frontiers in Plant Science 6: 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gómez S y Mejía Z. 2011. Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 29:2: 154-164. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222864007.pdf>
- Gottwald TR. 2007. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the western hemisphere. Outlooks on PestManagement 18(6):274–279. <https://doi.org/10.1564/18dec09>
- Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO and Gowda S. 2014. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). Journal of Biotechnology 176:20: 42–49. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.010>
- Hall DG, Richardson ML, Ammar El-Desouky and Halbert SE. 2012. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata. 146: 207–223. [10.1111/eea.12025](https://doi.org/10.1111/eea.12025)
- Hao G, Stover E and Gupta G. 2016. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to Citrus canker and Huanglongbing (HLB). Frontiers in Plant Science 7: 1078: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01078>
- Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang M and Ding F. 2012. Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. Phytopathology. 103:15–22. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0138-r>
- Hu Y, Zhong X, Liu X, Lou B, Zhou Ch, and Wang X. 2017. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. Public Library of Science ONE 12(12)e0189229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189229>.
- Ichinose K, Miyazi K, Matsuhira K, Yasuda K, Sadoyama Y, Do HT and Doan VB. 2010. Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. Journal of Environmental Science and Health B. 45:5:466–472. <https://doi.org/10.1080/03601231003800263>
- Pajerowska MK, Emerine DK and Shahid-Mukhtar M. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. Trends in Plant Science. 18:7: 402-4011. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.004>
- Kayim M and Koc NK. 2005. Improved transformation efficiency in Citrus by plasmolysis treatment. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 14(1):15-20. <https://doi.org/10.1007/BF03263218>
- Lu H, Zhang C, Albrecht U, Shimizu R, Wang G and Bowman KD. 2013. Overexpression of a citrus NDR1 ortholog increases disease resistance in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science. 4:157:1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00157>
- Mafra V, Martins P, Francisco C, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado M. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. BMC Genomics. 14:247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>.
- Mora-Aguilera G, Robles GP, López AJL, Flores SJ, Acevedo SG, Domínguez MS, Gutiérrez EA and Loeza KE. 2014. Current situation and perspectives in management of citrus HLB. Mexican Journal of Phytopathology 32(2):108-119. <https://doi.org/10.7550/rmb.46314>
- Nishimura MT and Dangl JL. 2010. *Arabidopsis* and the plant immune system. The Plant Journal 61(6): 1053–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04131.x>
- Pinheiro TT, Figueira A and Latado RR. 2014. Early-flowering sweet orange mutant “x11” as a model for functional genomic studies of *Citrus*. BMC Research Notes. 7:511: 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-511>.
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan YP, Bowman KD, Gmitter FGJr, and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. Horticulture Research 4,17064. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB and Moore GA. 2016. A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Horticultural Research 3:16022: 1-11. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.22>.
- Van-Loon LC and Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 55. 85–97. <https://doi.org/10.1006/mpmp.1999.0213>

- Vazquez-García M, Velázquez-Monreal J, Medina-Urrutia VM, Cruz-Vargas CD, Sandoval-Salazar M, Virgen-Calleros G and Torres-Moran JP. 2013. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central West Mexico. *Southwestern Entomologist*. 38: 579-596. <http://doi.org/10.3958/059.038.0404>
- Yu K, Moreira-Soares J, Kumar-Mandal M, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A and Kachroo P. 2013. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and *AZI-1* mediates Azelaic-Acid-induced system immunity. *Cell Reports*. 3(4):1266-1278. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.030>
- Zhang M, Guo Y, Powell C, Doud M, Yang C and Duan Y. 2014. Effective antibiotics against 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in HLB-affected Citrus plants identified via the graft-based evaluation. *Public Library of Science One*. 9:11: e111032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111032>
- Zhang M, Powell CA, Guo Y, Doud MS and Duan Y. 2012. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology*. 102(6): 567-574. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-11-0265>

# *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in various genera of cultivated orchids in Mexico

## *Cymbidium mosaic virus* y *Odontoglossum ringspot virus* en diversos géneros de orquídeas cultivadas en México

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México, Eduardo Alberto Pérez-García, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México, María Guadalupe Carrillo-Benítez, Erika Janet Zamora-Macorra\*, Darío Orozco-Cirilo, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. \*Autor para correspondencia: erikazam@gmail.com

Recibido: 16 de Marzo, 2019.

Aceptado: 01 de Mayo, 2019.

Ochoa-Martínez DL, Pérez-García EA, Carrillo-Benítez MG, Zamora-Macorra EJ and Orozco-Cirilo D. 2019. *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in various genera of cultivated orchids in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 421-431.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-1

Primera publicación DOI: 24 de Mayo, 2019.

First DOI publication: May 24, 2019.

**Resumen.** En el Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas, de la Facultad de Ciencias UNAM, se han detectado plantas con síntomas consistentes en clorosis, variegado, necrosis y mosaico. Varias de estas plantas son especies endémicas de México y a la fecha no existe información sobre su manejo fitosanitario. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue conocer a los virus asociados a estos síntomas mediante pruebas de ELISA, RT-PCR, plantas diferenciales y análisis filogenéticos. Se detectó al *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) y al

**Abstract.** In the Miguel Ángel Soto Arenas Orchid, of the UNAM Faculty of Sciences, plants with symptoms consisting of chlorosis, variegated, necrosis and mosaic have been detected. Several of these plants are endemic species of Mexico, and there is no information on their phytosanitary management. Therefore, the objective of the present study was to know the causal agent or agents of these symptoms through ELISA tests, RT-PCR, differential plants and phylogenetic analyzes. *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) were detected in 89% of the sampled plants with symptoms. Differential plants (*Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* and *Datura stramonium*) shown local lesions after six days of the mechanical inoculation in both viruses; And only using CymMV, *N. benthamiana* was systemically infected. The phylogenetic analyses showed that these viruses were grouped with isolates from Asian countries suggesting that the infection probably originated

*Cymbidium mosaic virus* (CymMV) en el 89% de las plantas con síntomas muestradas. Las plantas diferenciales *Nicotiana tabacum* var. *xhanti*, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranthicolor* y *Datura stramonium* inoculadas mecánicamente con tejido foliar positivo a ambos virus mostraron lesiones locales seis días después de la inoculación y sólo CymMV infectó sistémicamente a *N. benthamiana*. El análisis filogenético mostró que estos virus se agruparon con aislamientos de países asiáticos lo que sugiere que la infección se originó probablemente por el intercambio de material vegetal entre productores. Este es el primer reporte del CymMV y ORSV infectando a *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria*, *Epidendrum* sec. *Oerstedella*, *Dendrobium*, *Sobralia* y *Cuitlauzina* en México.

**Palabras clave:** *Barkeria*, *Lycaste*, *Dendrobium*, tobamovirus, potexvirus.

Las orquídeas conforman una de las familias más diversas que existen, con un número estimado entre 25 y 30 mil especies silvestres y varios miles de híbridos tanto naturales como artificiales (Dressler, 1981; Beutelspacher, 2012). En México se conocen alrededor de 1260 especies de la familia Orchidaceae (Hágsater *et al.*, 2005) y se estima que alrededor del 40% son endémicas. Las enfermedades producidas por virus ocupan el segundo lugar de los problemas fitosanitarios (Arauz, 1998) y ya que las orquídeas son plantas herbáceas longevas las hace más propensas a infecciones virales. Dado que las orquídeas pueden alcanzar altos precios y en ocasiones ser ejemplares muy raros, hace que aun plantas infectadas por virus no sean eliminadas y con ello se incrementa el riesgo de contagio a las demás. Actualmente se han registrado por lo menos 30 especies de virus que infectan orquídeas,

from the exchange of plant material between producers. This is the first report of CymMV and ORSV infecting *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria*, *Epidendrum* sec. *Oerstedella*, *Dendrobium*, *Sobralia* and *Cuitlauzina* in Mexico.

**Key words:** *Barkeria*, *Lycaste*, *Dendrobium*, tobamovirus, potexvirus.

Orchids are one of the most diverse families, with an estimated 25 to 30 thousand species, and several thousands of hybrids, both natural and artificial (Dressler, 1981; Beutelspacher, 2012). In Mexico there are around 1260 known species of the family Orchidaceae (Hágsater *et al.*, 2005) and around 40% are endemic. Diseases caused by viruses are in the second place in terms of phytosanitary problems (Arauz, 1998), and since orchids are long-lived herbaceous plants, this makes them more vulnerable to viral infections. Since orchids can be costly, and occasionally rare specimens, which leads to, even plants infected by viruses not being discarded, increasing the risk of infection to the others. Currently, at least 30 viruses species have been known and recorded to infect orchids, some of which can be transmitted by vectors such as the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Lawson, 2002), but the most common ones, transmitted mechanically and via propagative material, are the *Cymbidium ringspot virus* (Tombusvirus), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) (Freitas-Astúa, 2003). CymMV and ORSV are the most economically important, since they reduce growth and flowering (Lawson, 2002) and in greenhouses in Mexico, they have been reported as infecting some genera (López-Hernández *et al.*, 2014). Nowadays, in the Miguel Ángel Soto Arenas

algunos de estos se pueden transmitir por vectores como el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Lawson, 2002), pero los más comunes, transmitidos mecánicamente y por material propagativo, son *Cymbidium ringspot virus* (Tombusvirus), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) y *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) (Freitas-Astúa, 2003). El CymMV y ORSV son los de mayor importancia económica ya que reducen el crecimiento y floración (Lawson, 2002) y en México se han reportado en invernaderos comerciales infectando algunos géneros (López-Hernández *et al.*, 2014). Actualmente, en el Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas (Orquideario MAS), de la Facultad de Ciencias UNAM, se han observado plantas de diversos géneros de orquídeas con síntomas característicos de infecciones virales. Muchas de estas plantas tienen valor histórico, hortícola, científico o biológico, y por lo tanto no pueden ser sacrificadas, pero tienen que ser diagnosticadas para su manejo adecuado. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el o los virus asociados a estos síntomas mediante pruebas de ELISA, RT-PCR y plantas diferenciales, describirlos en los géneros de orquídeas que no han sido reportados como hospedantes en México y, mediante un análisis filogenético, determinar si la infección procede de géneros nativos.

Del 22 al 24 de abril de 2018, en el Orquideario MAS se realizó una colecta dirigida de tejido vegetal (hojas, raíces y flores) de plantas con síntomas de variegado, clorosis y manchas necróticas foliares; dichas plantas se marcaron y fotografiaron. En total se recolectaron 47 muestras de distintas plantas. Las muestras se etiquetaron y transportaron en una hielera al laboratorio de virus del Colegio de Postgraduados para procesadas. De estas se seleccionaron 12 provenientes de las plantas con síntomas más evidentes y se procedió a realizar la extracción de RNA total con CTAB (Sambrook y Rusell, 2001) a partir de 100 mg de tejido vegetal.

(MAS) orchidarium, in the School of Science of the UNAM, plants of diverse orchid genera have been observed to present characteristic symptoms of viral infections. Many of these plants have historic, horticultural, scientific or biological value, and therefore cannot be sacrificed, but they must rather be diagnosed for their adequate handling. Therefore, the aim of this study was to determine the virus or viruses related to these symptoms via ELISA, RT-PCR and differential plants test, to describe them in the genera of orchids that have not been reported as hosts in Mexico, and using a phylogenetic analysis, determine if the infection comes from native genera.

Between April 22 and 24 of 2018, in the MAS orchidarium, samples were taken of tissues (leaves, roots and flowers) from plants with symptoms of variegation, chlorosis and foliar necrotic spots; these plants were marked and photographed. A total of 47 samples were taken from different plants. The samples were labeled and transported in a cooler to the virus lab of the Colegio de Postgraduados for processing. Out of these, we chose 12, which came from plants with more evident symptoms, and the extraction of total RNA was carried out, using CTAB (Sambrook and Rusell, 2001) starting at 100 mg of plant tissue. The integrity of the extractions was verified by electrophoresis and the concentration was quantified using the Nanodrop®. The retrotranscriptions were carried out using general primers to detect some of the most common phytopathogenic genera of viruses. For *Potexvirus* we used primers Potex1RC, Potex5 and Potex2RC described by Van der Vlugt and Berendesen (2002); for *Tospovirus*, primers BR60 and BR65 described by Eiras *et al.* (2001); for *Potyvirus*, primers NIB2F and NIB3R described by Zheng *et al.* (2010); and for *Tomabovirus*, primers TobRTup1 and TobRTdo2 described by Dovas *et al.* (2004). The general conditions for amplification were

La integridad de las extracciones se corroboró mediante electroforesis y la concentración se cuantificó en el Nanodrop®. Se realizaron las retrotranscripciones con cebadores generales para detectar algunos de los géneros de virus fitopatógenos más comunes. Para *Potexvirus* se utilizaron los cebadores Potex1RC, Potex5 y Potex2RC descritos por Van der Vlugt y Berendesen (2002), para *Tospovirus* los cebadores BR60 y BR65 descritos por Eiras *et al.* (2001), para *Potyvirus* los cebadores Nib2F y Nib3R descritos por Zheng *et al.* (2010) y para *Tomabovirus* se utilizaron los cebadores TobRTup1 y TobRTdo2 descritos por Dovas *et al.* (2004). Se siguieron las condiciones generales de amplificación y la concentración de reactivos recomendado por cada descriptor de los cebadores generales. Los productos esperados de PCR se purificaron con el kit comercial Wizard® y se secuenciaron en MacroGen. Las secuencias se editaron con el programa BioEdit® y se compararon con las reportadas en el GenBank. Las secuencias consenso se registraron en el GenBank y con estas se realizó el análisis filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML) basado en el modelo de Kimura-2 parámetros, con distribución Gamma discreta con 5 categorías, utilizando el software libre MEGA7. Para la comparación, se eligieron diferentes secuencias del CymMV y ORSV procedentes de Costa Rica, Taiwán, Japón, Francia, Corea y Nueva Zelanda, disponibles en la base de datos del NCBI.

La ELISA se hizo con anticuerpos policlonales específicos, positivos y negativos de ORSV y CymMV (Agdia®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se maceraron 300 mg de tejido vegetal en 3 mL de buffer de extracción. Cada una de las 47 muestras se analizó por duplicado para asegurar la confiabilidad del diagnóstico. Se obtuvo la densidad óptica a 405 nm (OD405) de las muestras en un lector de placas de ELISA. Para el análisis mediante plantas indicadoras, tejido vegetal positivo a CymMV y ORSV se maceró por separado en tampón

followed, along with the concentration of reactants recommended for each descriptor of the general primers. The products expected from the PCR were purified using the Wizard® commercial kit, and were sequenced in MacroGen. The sequences were edited using the program BioEdit® and compared with those reported in the GenBank. The consensus sequences were recorded in the GenBank and used to carry out the phylogenetic analyses using the maximum likelihood method (ML), based on the Kimura-2 parameter model, with a discreet Gamma distribution with 5 categories, using the free software MEGA7. For the comparison, we chose different sequences of the CymMV and ORSV from Costa Rica, Taiwan, Japan, France, Korea and New Zealand, available in the NCBI database.

The ELISA was performed using specific positive and negative ORSV and CymMV polyclonal antibodies (Agdia®) following instructions from the manufacturer. We macerated 300 mg of plant tissue in 3 mL of extraction buffer. Each one of the 47 samples was analyzed in duplicates in order to ensure the reliability of the diagnosis. The optical density for the samples was obtained at 405 nm (OD405) in an ELISA slide reader. For the analysis with indicator plants, plant tissue positive to CymMV and ORSV was macerated individually in phosphate buffered saline, in order to mechanically inoculate *Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. virginiana*, *N. rustica*, *Chenopodium quinoa.*, *C. amaranthicolor* and *Datura stramonium* plants. A total of three plants were inoculated for each species per virus, and as a control, a plant from each species was rubbed with water.

During the tour in the MAS orchidarium, plants were found with slight mosaic, with purple spots, or with generalized chlorosis, along with necrotic spots (Figure 1). Only in a few species of the genus *Barkeria* was found also variegated flowers.



de fosfatos para inocular mecánicamente plantas de *Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. virginiana*, *N. rustica*, *Chenopodium quinoa*., *C. amaranthicolor* y *Datura stramonium*. Se inocularon en total tres plantas de cada especie por virus y, como testigo, se tuvo una planta de cada especie frotada con agua.

Durante el recorrido en el Orquideario MAS se encontraron plantas con un ligero mosaico, con coloración moteada púrpura, o con clorosis generalizada, acompañada de manchas necróticas (Figura 1). Solo en pocas especies del género *Barkeria* se observó además variegado en flores.

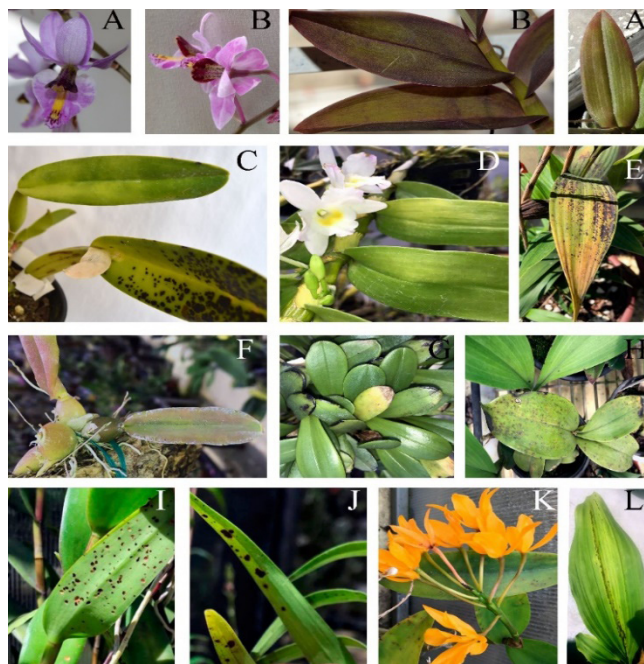
Estos síntomas corresponden a los reportados por virus en orquídeas (mosaico, anillos cloróticos, deformación, variegado y manchas necróticas) (Albouy y Devergne, 2000; López-Hernández *et al.* 2014), pero la expresión de estos es muy variable y su severidad dependerá del aislamiento del virus, el hospedante y las condiciones ambientales (Agrios, 2005). Generalmente una alta temperatura y luminosidad prevaleciente en los invernaderos favorecen la multiplicación de los virus y la mezcla de infección por CymMV y ORSV incrementará la severidad (Yamane *et al.*, 2008). En plantas positivas a ORSV no se observaron anillos cloróticos, pero se sabe que la aparición de éstos depende del tiempo que tengan las plantas con la infección y de las condiciones ambientales (Yamane *et al.*, 2008).

De las retrotranscripciones se obtuvieron amplicones del fragmento esperado con los cebadores para Potexvirus (584 pb) y Tobamovirus (568 pb). Los análisis para Tospovirus y Potyvirus fueron negativos y solo se amplificaron las muestras control (RNA de planta infectada con TSWV y RNA de planta infectada con *Papaya ringspot virus*) (imágenes no mostradas). La secuenciación demostró que el amplicón de 568 pb tuvo una similitud del 99% con *Odontoglossum ringspot virus*

These symptoms match those reported for viruses in orchids (mosaic, chlorotic rings, deformities, variegated and necrotic spots) (Albouy and Devergne, 2000; López-Hernández *et al.* 2014), although their expression is highly variable and their severity will depend on the isolation of the virus, the host and the environmental conditions (Agrios, 2005). High temperatures and luminosity, prevalent in the greenhouses, generally favor the multiplication of the viruses and the mixture of infection by CymMV and ORSV will increase the severity (Yamane *et al.*, 2008). In plants positive for ORSV, no chlorotic rings were observed, although it is known that their appearance depends on how long the plants have been infected for, as well as on the environmental conditions (Yamane *et al.*, 2008).

From the retrotranscriptions, amplicons were obtained from the expected fragment with the primers for *Potexvirus* (584 pb) and *Tobamovirus* (568 pb). The analyses for *Tospovirus* and *Potyvirus* were negative, and only the control samples were amplified (RNA of plants infected with TSWV and RNA of plants infected with the *Papaya ringspot virus*) (images not shown). The sequencing showed that the 568 pb amplicon had a similarity of 99% with *Odontoglossum ringspot virus* (KF85954.1), and it was found in eight of the 12 samples analyzed (Figure 2, left). The sequencing of the 584 pb fragment had a similarity of 98% with the *Cymbidium mosaic virus* (AJ270986.1) and it was found in only two samples (Figure 2, right).

The consensus sequence, isolation M48 (access number MK908224), from CymMV was grouped with a CymMV isolation from the Netherlands (AJ270986.1); it was separated from isolations from Costa Rica, France and Hawaii, and it was related with the isolations from Japan and Korea (Figure 3, right). Two consensus sequences of isolations M10 and M4 (access numbers MK902741 and



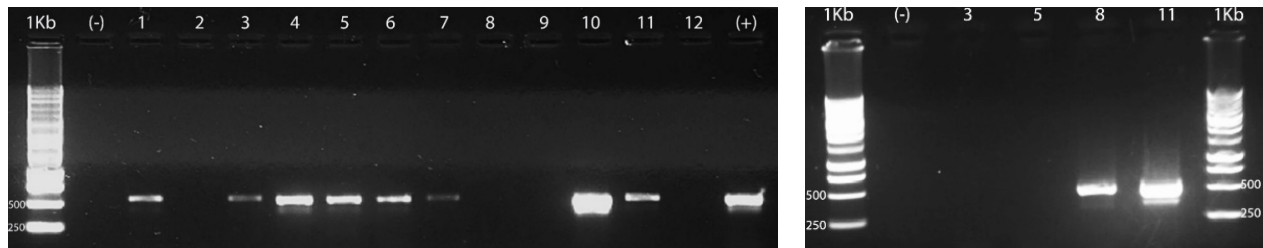
**Figura 1.** Síntomas observados durante el muestreo. Variegado en flores y coloración púrpura en *Barkeria scandens* (A) y *Barkeria whartoni* (B). Mosaico y lesiones necróticas en *Cattleya lobata* (C). Clorosis en *Dendrobium* híbrido tipo nobile (D). Lesiones necróticas coalescentes en *Sobralia macrantha* (E). Coloración púrpura en *Leochilus crocodiliceps* (F), Clorosis en *Masdevalia floribunda* (G). Bandeado clorótico y manchas necróticas en *Rossioglossum* Random Chester (H), Manchas necróticas en *Epidendrum jamiesonis* (I), Manchas necróticas en *Oesrtedella* sec. *Epidendrum macdougallii* (J). Mosaico en *Guarianthe* × *guatemalensis* (K). Bandeado clorótico y manchas necróticas *Lycaste virginalis* (L).

**Figure 1.** Symptoms observed during the sampling. Variegated flowers and a purple color in *Barkeria scandens* (A) and *Barkeria whartoni* (B). Mosaic and necrotic lesions in *Cattleya lobata* (C). Chlorosis in *Dendrobium* nobile-type hybrid (D). Necrotic lesions coalescent in *Sobralia macrantha* (E). Purple coloring in *Leochilus crocodiliceps* (F), Chlorosis in *Masdevalia floribunda* (G). Chlorotic Stripes and necrotic stains in *Rossioglossum* Random Chester (H), Necrotic spots in *Epidendrum jamiesonis* (I), Necrotic spots in *Oesrtedella* sec. *Epidendrum macdougallii* (J). Mosaic in *Guarianthe* × *guatemalensis* (K). Chlorotic stripes and necrotic spots *Lycaste virginalis* (L).

(KF85954.1), y se detectó en ocho de las 12 muestras analizadas (Figura 2, izquierda). La secuenciación del fragmento de 584 pb tuvo una similitud del 98% con *Cymbidium mosaic virus* (AJ270986.1) y se detectó en solo dos muestras (Figura 2, derecha).

La secuencia consenso, aislado M48 (número de acceso: MK908224), de CymMV se agrupó con un aislamiento de CymMV de Holanda (AJ270986.1), se separó de los aislados de Costa Rica, Francia y Hawaii, y se relacionó con los aislamientos de Japón y Corea (Figura 3 derecha). Dos secuencias

MK902742) from ORSV were grouped with ORSV isolations from Korea and Taiwan (Figure 3, left). To date there are no cases of natural infections from viruses in wild orchids, and therefore the origin of these viruses is uncertain (Kull *et al.*, 2009). The group of isolations of CymMV and ORSV of this study with those reported in Korea, Japan and Taiwan, and far from those found in Costa Rica, suggests that the infection could be due to the exchange between common plant material in orchid tourism (Pickering and Ballantyne, 2013),



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR para detectar en plantas al *Odontoglossum ringspot virus* (izquierda) y al *Cymbidium mosaic virus* (derecha). 1 *Barkeria whartonianiana*, 2 *Lycaste* híbrido, 3 *B. skinneri*, 4 *B. scandens*, 5 *Bardendrum tanzanita*, 6 *Laelia anceps*, 7 *Laelia lobata*, 8 *Lycaste virginalis*, 9 *Masdevallia barlaeana*, 10 *Laelia anceps* Mendehell, 11 *Sobralia macrantha*, 12 *Encyclia* spp. 1Kb: marcador molecular de 1 kilobase; (-): agua libre de nucleasas. (+): planta infectada con *Tobacco mosaic virus*.

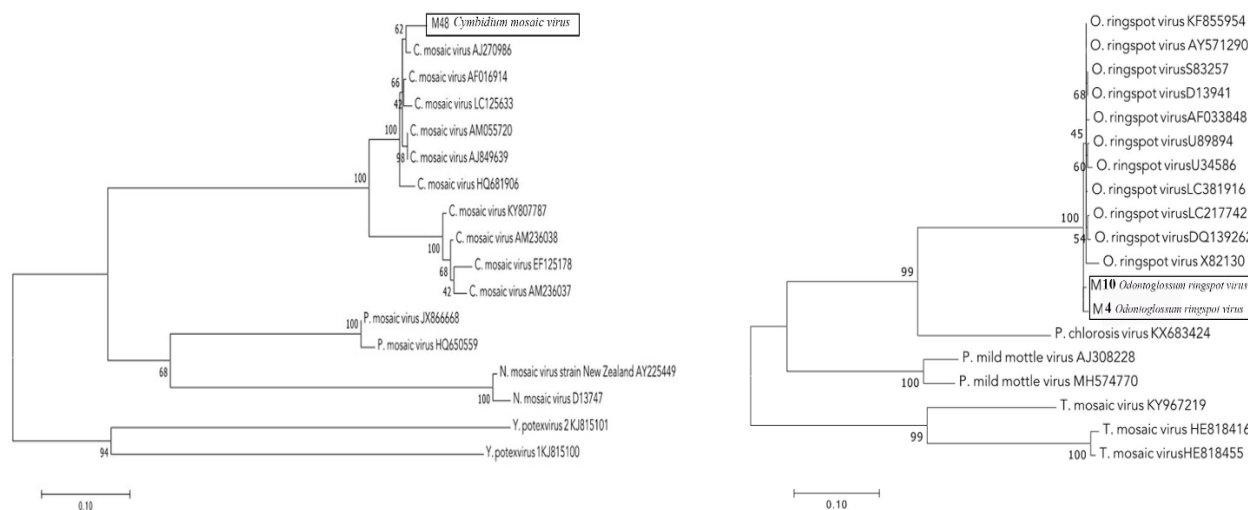
**Figure 2.** Electrophoresis in 1% agarose gel of products of RT-PCR to detect the *Odontoglossum ringspot virus* (left) and al *Cymbidium mosaic virus* (right) in plants. 1 *Barkeria whartonianiana*, 2 *Lycaste* híbrido, 3 *B. skinneri*, 4 *B. scandens*, 5 *Bardendrum tanzanita*, 6 *Laelia anceps*, 7 *Laelia lobata*, 8 *Lycaste virginalis*, 9 *Masdevallia barlaeana*, 10 *Laelia anceps* Mendehell, 11 *Sobralia macrantha*, 12 *Encyclia* spp. 1Kb: molecular marker of 1 kilobase; (-): water, free of nucleasas. (+): plant infected with the *Tobacco mosaic virus*.

consenso de los aislamientos M10 y M4 (números de acceso: MK902741 y MK902742) de ORSV se agruparon con aislamientos de ORSV procedentes de Corea y Taiwán (Figura 3 izquierda). Hasta la fecha no se conocen casos de infecciones naturales de virus en orquídeas silvestres, por lo que el origen de estos virus es incierto (Kull *et al.*, 2009). El agrupamiento de los aislamientos de CymMV y ORSV del presente estudio con aquellos reportados en Corea, Japón y Taiwán y alejados de los encontrados en Costa Rica, sugiere que la infección pudo deberse al intercambio entre material vegetal común en el turismo de orquídeas (Pickering y Ballantyne, 2013) y no a la existencia de estos virus en los ecosistemas mexicanos.

Mediante el análisis por DAS-ELISA, se detectó en 29 plantas al ORSV, en cuatro sólo a CymMV, en nueve se encontraron ambos virus y en cinco no se detectaron estos virus (Cuadro 1). En México el ORSV no se había detectado hasta el momento en especies de los géneros *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria* y *Oerstedella* (*Epidendrum*); y el CymMV en los géneros *Dendrobium*, *Sobralia* y

and not to the existence of these viruses in Mexican ecosystems.

With an analysis using DAS-ELISA, ORSV was found in 29 plants, CymMV in only four, both viruses were found in nine, and no virus was found in five (Table 1). In Mexico, ORSV had not been found until now in species of the genera *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria* and *Oerstedella* (*Epidendrum*); and CymMV in genera *Dendrobium*, *Sobralia* and *Cuitlauzina*. A greater incidence of ORSV was found than for CymMV in sampled plants, and despite all samples coming from plants with symptoms, some were negative, possibly due to the viral concentration of the sample taken was not high enough for any of the viruses to be found by ELISA. In general, CymMV is more stable than ORSV, and it is more prevalent (Khentry *et al.*, 2006); however, similar investigations with *Phalaenopsis* also found a higher proportion of ORSV than of CymMV (Yamane *et al.*, 2008). This can be explained by the origin of the plants, since it is known that the CymMV is not transmitted by seeds, unlike the ORSV (Pradhan *et al.*, 2016); but,



**Figura 3.** Representaciones de las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los fragmentos obtenidos con los iniciadores Potex5/Potex2cr para *Cymbidium mosaic virus* (derecha), y Tob Rtup1/TobRTdo2 para *Odontoglossum ringspot virus* (izquierda), usando el método molecular ML (Maximum Likelihood), basado en el modelo Kimura 2-parámetros y un bootstrap de 1000.

**Figure 3.** Representations of the phylogenetic relationships between the sequences of the fragments obtained with primers Potex5/Potex2cr para *Cymbidium mosaic virus* (right), and Tob Rtup1/TobRTdo2 for *Odontoglossum ringspot virus* (left), using the ML (Maximum Likelihood) molecular method, base on Kimura 2-parameters model and a 1000 bootstrap.

*Cuitlauzina*. Se encontró una mayor incidencia del ORSV que del CymMV en las plantas muestreadas, y a pesar de que todas las muestras provenían de plantas con síntomas, algunas fueron negativas; esto pudo deberse a que la concentración viral de la muestra tomada no fue lo suficientemente alta para que alguno de los virus se detectara por ELISA. En general se dice que el CymMV es más estable que ORSV y es el de mayor prevalencia (Khentry *et al.*, 2006), pero en investigaciones similares con *Phalaenopsis* también detectaron en mayor proporción al ORSV que al CymMV (Yamane *et al.*, 2008). Esto puede explicarse por la procedencia de las plantas ya que se sabe que el CymMV no se transmite por semilla a diferencia del ORSV (Pradhan *et al.*, 2016); pero se desconoce si las plantas muestreadas en la presente investigación fueron generadas o no a partir de semilla.

whether the plants sampled in this investigation were generated from seeds or not, is unknown.

Local necrotic lesions were observed in *Nicotiana tabacum* var. xhanti and local chlorotic lesions in *N. glutinosa*, *C. quinoa*, *C. amaranthicolor* and *Datura stramonium* six days after inoculation (dai) with both viruses (Figure 4A-C). In *Datura stramonium* and *N. occidentalis* leaves inoculated with positive plant material only for CymMV, chlorotic rings were observed, whereas in *N. benthamiana*, it caused consistent systemic infection in leaf deformation and necrosis of nervations (Figure 4D-F). No symptoms were observed in control plants.

The most widely used indicator plants to diagnose CymMV are *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa* and *C. amarticolor* (Brunt *et al.*, 1996), and based

**Cuadro 1. Detección de *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) mediante ELISA, en orquídeas cultivadas en México.****Table 1. Detection of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) by ELISA, in orchids cultivated in Mexico.**

| Especie <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CymMV | ORSV |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|
| <i>Encyclia adenocaula</i> , <i>Laelia dawsonii</i> , <i>Laelia albida</i> (2), <i>Laelia gouldiana</i> y <i>Trichopilia tortilis</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | -     | -    |
| <i>Cattleya</i> × <i>Beatriz</i> , <i>Cuitlauzina pendula</i> , <i>Cymbidium</i> híbrido (1), <i>Dendrobium</i> híbrido tipo nobile, <i>Guarianthe</i> × <i>guatemalensis</i> , <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Masdevallia</i> híbrida, <i>Sobralia macrantha</i> (1) y <i>Sobralia macrantha</i> (2).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | +     | +    |
| <i>Epidendrum jamiesonis</i> , <i>Epidendrum radicans</i> , <i>Laelia furfuracea</i> var. <i>alba</i> y <i>Lycaste virginalis</i> (2).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | +     | -    |
| <i>Bardendrum tanzanita</i> , <i>Barkeria scandens</i> , <i>Barkeria skinneri</i> , <i>Barkeria whartonia</i> , <i>Cattleya lobata</i> var. <i>concolor</i> , <i>Cymbidium</i> híbrido (2), <i>Encyclia cordigera</i> (1), <i>Encyclia cordigera</i> (2), <i>Encyclia fucata</i> , <i>Encyclia garciae-esquivelii</i> , <i>Epidendrum macdougallii</i> , <i>Epidendrum magnificum</i> Schltr., <i>Laelia albida</i> (1), <i>Laelia anceps</i> var. <i>Mendelhall</i> , <i>Leochilus crocodiliceps</i> , <i>Lycaste</i> híbrido, <i>Lycaste virginalis</i> (1), <i>Masdevallia barlaeana</i> , <i>Masdevallia floribunda</i> ., <i>Maxillaria molitor</i> , <i>Odontocidium</i> híbrido no identificado, <i>Oncidium oliganthum</i> , <i>Oncidium reichenheimii</i> , <i>Oncidium tigrinum</i> × <i>Odontocidium</i> , <i>Rhynchostele bictoniensis</i> × <i>Oncidium alexandrae</i> , <i>Rossioglossum</i> (1), <i>Rossioglossum</i> (2), <i>Stanhopea tigrina</i> y <i>Vanilla planifolia</i> . | -     | +    |

<sup>a</sup>Las especies con resultados similares fueron agrupadas / Species with similar results were grouped.

+ Muestras positivas; - muestras negativas. Se consideraron como positivas si los valores de DO eran iguales o mayores a tres veces el promedio de los valores del control negativo / Positive samples; - negative samples. Samples were considered positive if the values for DO were equal to, or greater than, three times the average of the values of the negative control.

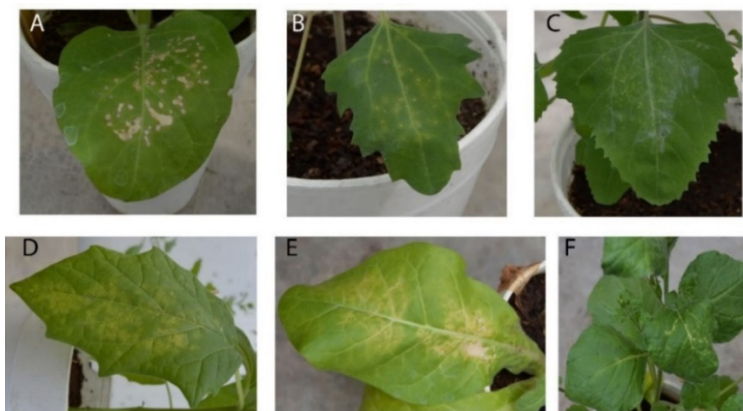
Lugar y Fecha de recolecta: Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas, de la Facultad de Ciencias UNAM. Del 22-24 de abril de 2018 / Place and date of collection: Orchuidarium Miguel Ángel Soto Arenas, of the UNAM School of Science. April 22-24, 2018.

En las plantas indicadoras se observaron lesiones locales necróticas en *Nicotiana tabacum* var. *xhanti* y lesiones locales cloróticas en *N. glutinosa*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y *Datura stramonium* seis días después de la inoculación (ddi) con ambos virus (Figura 4A-C). En hojas de *Datura stramonium* y *N. occidentalis* inoculadas con material vegetal positivo solo para CymMV se observaron anillos cloróticos mientras que en *N. benthamiana* ocasionó infección sistémica consistente en deformación de hojas y necrosis de nervaduras (Figura 4D-F). En las plantas testigo no se observaron síntomas.

Las plantas indicadoras más usadas para diagnosticar al CymMV son *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa*

on the results of this study, it is also possible to use *N. glutinosa* and *N. occidentalis*. It has been corroborated that *C. quinoa* and *C. amaranticolor* are better hosts for ORSV and *Datura stramonium* for CymMV, although there is no selectivity (Cánovas *et al.*, 2016). However, this investigation found differences in the symptoms caused by CymMV and ORSV in *D. stramonium*, since the first caused smaller chlorotic lesions. The isolation of CymMV caused a systemic infection in *N. benthamiana* and it is known that there are isolations of this viruses capable of systemically infecting this plant, or not (Hsiang-Chia *et al.*, 2009).

This investigation reports, for the first time in Mexico, the presence of ORSV and CymMV in diverse genera of orchids with Mesoamerican



**Figura 4.** Plantas inoculadas con ORSV a los 6 días después de la inoculación (ddi): lesiones locales necróticas en *N. tabacum* var. *xhanti* (A); lesiones locales cloróticas en *C. quinoa* (B) y *C. amaranticolor* (C). Plantas inoculadas con CymMV a los 17 ddi: anillos cloróticos en *D. stramonium* (D) y *N. occidentalis* (E), infección sistémica en *N. benthamiana* (F).

**Figure 4.** Plants inoculated with ORSV 6 days after inoculation (dai): local necrotic lesions in *N. tabacum* var. *xhanti* (A); local chlorotic lesions in *C. quinoa* (B) and *C. amaranticolor* (C). Plants inoculated with CymMV 17 dai: chlorotic rings in *D. stramonium* (D) and *N. occidentalis* (E), systemic infection in *N. benthamiana* (F).

y *C. amaranticolor* (Brunt *et al.*, 1996) y, con base en los resultados del presente estudio, es posible utilizar también a *N. glutinosa* y *N. occidentalis*. Se ha corroborado que *C. quinoa* y *C. amaranticolor* son mejores hospedantes para ORSV y *Datura stramonium* para CymMV, aunque no hay selectividad (Cánovas *et al.*, 2016); sin embargo, en esta investigación se observó diferencia en los síntomas ocasionados por CymMV y ORSV en *D. stramonium*, ya que el primero provocó lesiones cloróticas anilladas mientras que el segundo ocasionó lesiones cloróticas de menor tamaño. El aislamiento de CymMV ocasionó infección sistémica en *N. benthamiana* y se sabe que existen aislamientos de este virus que son capaces de infectar o no sistémicamente a esta planta (Hsiang-Chia *et al.*, 2009).

En este trabajo se reporta por primera vez en México la presencia de ORSV y CymMV en diversos géneros de orquídeas con especies mesoamericanas. Algunas especies están amenazadas según la NOM-ECOL-059-2010, como *Barkeria scandens*,

species. Some species are under threat, according to the NOM-ECOL-059-2010, such as *Barkeria scandens*, *B. skinneri*, *B. whartonianiana*, *C. pendula*, *E. adenocaula*, *L. dawsonii*, *L. gouldiana*, *L. virginalis* (= *L. skinneri*), *S. tigrina* and *V. planifolia*; and others are rare species, or under a high rate of illegal picking, and may soon be included in list of species in extinction, such as *B. spectabilis*, *E. magnificum*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *O. reicheinheimii*, *O. Oliganthum*, among others (Damon, 2017).

Thanks to S. in M. Patricia Olguín and undergraduate student Cekouat León for their assistance in the maintenance of the orchid collection. To the DGAPA UNAM for the funding (PAPIIT IN227319).

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

*B. skinneri*, *B. whartonianana*, *C. pendula*, *E. adeno-caula*, *L. dawsonii*, *L. gouldiana*, *L. virginialis* (= *L. skinneri*), *S. tigrina* y *V. planifolia*; y otras son especies raras o que están sujetas a una alta tasa de recolecta ilegal, y pronto pueden figurar en las listas de especies en riesgo de extinción, como *B. spectabilis*, *E. magnificum*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *O. reicheinheimii*, *O. Oliganthum*, entre otras (Damon, 2017).

Se agradece a la M. en C. Patricia Olguín y al estudiante de licenciatura Cekouat León por su asistencia en el mantenimiento de la colección de orquídeas. A la DGAPA UNAM por el financiamiento (PAPIIT IN227319).

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5ª Ed. Academic Press. E.U.A. 922 p.
- Albouy J y Devergne JC. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Mundi-prensa libros S.A. ISBN: 9788471148889. 480 p.
- Arauz CLF. 1998. Fitopatología. Un enfoque agroecológico. Ed. de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 443 p.
- Beutelspacher CR. 2012. Esplendor de las orquídeas de Chiapas. Conaculta. México, D.F.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database (11.07.2018). <http://sdb.im.ac.cn/videde/descr274.htm#Range>
- Cánovas SE, Ballari MC and Nome CF. 2016. First report of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ring spot virus* in Argentina. Australasian Plant Dis. Notes, 11: 2. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-015-0189-7>.
- Damon A. 2017. Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (Orchidaceae) en el sureste de México. Agroproductividad. 10(6): 25-30.
- Dovas CI, Efthimiou K and Katis NI. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. Journal of Virological Methods. 117: 137-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.004>.
- Dressler RL. 1981. The Orchids, Natural History and Classification. Harvard University Press. Cambridge. 332 pp.
- Eiras M, Resende OR, Missiaggia AA, De Ávila CA. 2001. Rtpcr and dot blot hybridization methods for a universal detection of Tospoviruses. Fitopatol. bras. vol.26 no.2 Brasília. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582001000200009>
- Freitas-Astúa J. 2003. The Bulletin of the American Orchid Society. Copyright American Orchid Society. <http://www.aos.org/orchids/orchid-pests-diseases/virus.aspx>.
- Hágsater E, Soto-Arenas MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA y Dressler RL. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F. 304 p.
- Hsiang-Chia L, Cheng-En C, Meng-Hsiun T, Hsiang-iu W, Hong-Ji S and Hsin-Hung Y. 2009. *Cymbidium mosaic potexvirus* isolate-dependent host movement systems reveal two movement control determinants and the coat protein is the dominant. Virology. 388: 147-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.049>.
- Khentry Y, Paradornuwat A, Tantiwiwat S, Phansiri S, Thaveechai N. 2006. Incidence of *Cymbidium Mosaic Virus* and *Odontoglossum Ringspot Virus* on Invitro Thai Native Orchid Seedlings and Cultivated Orchid Mericlones. Kasetsart J. (Nat Sci.) 40: 49-57.
- Kull T, Arditti J and Wong SM. 2009. Orchid Biology: Reviews and Perspectives X. APPENDIX Orchid Viruses - A Compendium, 508 Appendix England. Springer Science. 446 p.
- Lawson HR. 2002. Virus and their control. In: James Watson. Guide: Orchid, Pests, Diseases. American Orchid Society. 74-122 pp.
- López-Hernández MS, Palacios-Popo PE y De La Torre-Almaraz R. 2014. Detección de *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en orquídeas en México. Agrociencia, 48(5): 525-536.
- Pickering CM and Ballantyne M. 2013. Orchids: An example of charismatic megafloora tourism? In: Holden, A. and Fennell, D. The Routledge Handbook of Tourism and the Environment. Routledge London, 192-199 p.
- Pradhan S, Tripti R, Mukunda R, Bijaya P. 2016. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques. Elsevier, Heliyon (2): 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176>.
- Sambrook J and Rusell D. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3.17-3.32 pp.
- Van der Vlugt RAA and Berendesen M. 2002. Development of a general Potexvirus detection method. European Journal of Plant Pathology. 108: 367-371. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015644409484>.
- Yamane K, Oyama K, Iuchi E, Ogawa H, Suzuki T and Nat-suaki T. 2008. RT-PCR Detection of *Odontoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus* and Tospoviruses and Association of Infections with Leaf-Yellowing symptoms in *Phalaenopsis*. Journal of Phytopathology 156: 268-273. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01352.x>
- Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ, Gibbs AJ. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology, 59: 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>

# Host suitability of five populations of wild tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) for nematode *Nacobbus aberrans sensu lato*

## Aptitud de cinco poblaciones de jitomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) como hospedante del nematodo *Nacobbus aberrans sensu lato*

**Estefanía Elizabeth Cazares-Álvarez, Carlos Méndez-Inocencio**, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, Jiquilpan, Michoacán, México, C.P. 59510; **Isaac Zepeda-Jazo**, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Avenida Universidad 3000, Lomas de la Universidad, Sahuayo, Michoacán, México, C.P. 59103; **Ernesto Fernández-Herrera**, Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera Bahía de Kino Km 21, Hermosillo, Sonora, México, C.P. 83340; **José Roberto Medina-Medrano, Edgar Villar-Luna\***, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, Jiquilpan, Michoacán, México, C. P. 59510. \*Autor para correspondencia: evillarlu@conacyt.mx

Recibido: 03 de Mayo, 2019.

Aceptado: 03 de Julio, 2019.

Cazares-Álvarez EE, Méndez-Inocencio C, Zepeda-Jazo I, Fernández-Herrera E, Medina-Medrano JR and Villar-Luna E. 2019. Host suitability of five populations of wild tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) for nematode *Nacobbus aberrans sensu lato*. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 432-443.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-1

Primera publicación DOI: 27 de Julio, 2019.

First DOI publication: July 27, 2019.

**Resumen.** *Nacobbus aberrans sensu lato* es uno de los nematodos más importantes en el cultivo de jitomate. Para su manejo, es de importancia el estudio de estrategias sostenibles como la resistencia genética, comúnmente encontrada en parientes silvestres de los cultivos. Al respecto, surgió

**Abstract.** *Nacobbus aberrans sensu lato* is one of the most important plant parasitic nematodes (PPN) in tomato crop. For the management of this PPN, it is important to study sustainable strategies such as genetic resistance, commonly found in crop wild relatives. In this regard, there was interest in knowing the response of local populations (Michoacán, Mexico) of wild tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) to the inoculation with second stage juveniles. Three experiments (E1, E2, and E3) were mounted. Five wild genotypes and one cultivated genotype (cv. Rio Grande) were evaluated. At 7 and 21 days after the inoculation (dai), the number of nematodes within the root was evaluated, and at the 45 and 60 dai root galling was recorded. In the E1 and E2 experiments, at 7 and 21 dai, the J2 and J3-J4 stages were found. In all three experiments, there was root galling, and at



el interés por conocer la respuesta de poblaciones locales (Michoacán, México) de jitomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) a la inoculación con juveniles de segundo estadio de *N. aberrans* s.l. Se montaron tres experimentos (E1, E2, y E3). Se evaluaron cinco genotipos silvestres y uno cultivado (cv. Río grande). A los 7 y 21 días posteriores a la inoculación (dpi) se evaluó el número de nematodos dentro de la raíz, y a los 45 y 60 dpi el agallamiento de raíces. En E1 y E2, a 7 y 21 dpi se encontraron los estadios J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub>-J<sub>4</sub>. En los tres experimentos ocurrió agallamiento, y a 60 dpi la producción de huevos fue evidente. *N. aberrans* s.l. invadió las raíces, y completó su desarrollo y reproducción. Estos resultados revelan la aptitud de las cinco poblaciones mexicanas de jitomate silvestre como hospedantes del nematodo, y sugieren la necesidad de explorar otras solanáceas silvestres como posibles fuentes de resistencia al nematodo.

**Palabras clave:** fitoparásito, falso agallador, tinguaraque, susceptibilidad.

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor relevancia económica y agroalimenticia (Blancard, 2012). México es el noveno productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2017), sin embargo, la producción es comprometida por enfermedades inducidas por hongos, bacterias, virus y nematodos (Blancard, 2012). Los nematodos más problemáticos en el cultivo son los agalladores *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans sensu lato* (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Blancard, 2012). En México, *N. aberrans* s.l. afecta principalmente a cultivos de chile (*Capsicum annuum* L.), jitomate (*S. lycopersicum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003). El nematodo induce el agallamiento de raíces, dificultando la absorción de agua y nutrimentos,

60 dai egg production was evident. *N. aberrans* s.l. invaded the roots and completed its development and reproduction. These results reveal the suitability of the five Mexican populations of wild tomatoes as hosts of the nematode and suggest the need to explore other wild solanaceae as possible sources of resistance to the nematode.

**Key words:** phytoparasite, false root-knot nematode, tinguaraque, susceptibility.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most economically and agri-food important vegetables (Blancard, 2012). Mexico ranks ninth in tomato production worldwide (FAOSTAT, 2017), but its production is compromised by diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes (Blancard, 2012). The most problematic nematodes that affect tomato crops are root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. and *Nacobbus aberrans sensu lato* (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Blancard, 2012). In Mexico, *N. aberrans* s.l. affects mainly chili pepper crops (*Capsicum annuum* L.), tomato (*S. lycopersicum*) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003). The nematode causes root galling, which hinders the absorption of water and nutrients and leads to a reduced root system, chlorosis, stunting and wilt, and, like other nematodes, its management involves the use of synthetic nematicides (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Hallmann and Meressa, 2018).

Therefore, the study of ecological alternatives for management of plant parasitic nematodes is of interest in order to contribute to reducing the use of chemical nematicides, and thus their negative effects on human health and the environment. These alternatives include the use of biological control agents, organic amendments and genetic resistance, among others (Manzanilla-López *et*

lo que deriva en la reducción del sistema radical, clorosis, enanismo y marchitez; y al igual que otros nematodos, su manejo comprende el uso de nematicidas sintéticos (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Hallmann y Meressa, 2018).

El estudio de alternativas ecológicas para el manejo de nematodos fitoparásitos es de interés para contribuir a la reducción del uso de nematicidas químicos y por ende de los efectos negativos que tienen en la salud humana y el entorno ambiental. Estas alternativas comprenden el uso de biocontroladores, enmiendas orgánicas, resistencia genética, entre otros (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Hallmann y Meressa, 2018). El aprovechamiento del fondo genético de parientes silvestres (PS) de cultivos en los sistemas agrícolas está bien documentado (Sánchez-Peña *et al.*, 2006; Hajjar y Hodgkin, 2007). Los PS involucran a los progenitores de los cultivos y a especies más o menos relacionadas, los cuales por sus altos niveles de diversidad genética son promisorios como fuentes de resistencia a plagas y enfermedades (Hajjar y Hodgkin, 2007). Son varios los PS de jitomate que se han reportado como resistentes a fitopatógenos (Grandillo *et al.*, 2011); por ejemplo, la resistencia a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* es principalmente conferida por los genes *Mi*, característica que fue transferida a jitomate desde su pariente silvestre *S. peruvianum* (*L. peruvianum*) (Yaghoobi *et al.*, 1995). Se ha demostrado que los genes *Mi* no son efectivos contra *N. aberrans s.l.*, y en estudios exploratorios no se han encontrado fuentes confiables de resistencia contra este nematodo en jitomate (Veremis *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2017). En México, el jitomate silvestre (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) crece bajo condiciones inhóspitas y comúnmente es considerado como arvense en los cultivos. En Michoacán son localmente conocidos como “tinguaraques”, y algunas poblaciones son tolerantes al estrés hídrico y a ciertas plagas y

*al.*, 2002; Hallmann and Meressa, 2018). The use of the genetic background of crop wild relatives (WR) in agricultural systems is well documented (Sánchez-Peña *et al.*, 2006; Hajjar and Hodgkin, 2007). WRs include the progenitors and species that are more or less related; because of their high levels of genetic diversity, these species could be used as sources of resistance to pests and diseases (Hajjar and Hodgkin, 2007). Several tomato WRs have been reported to be resistant to plant pathogens (Grandillo *et al.*, 2011); for example, the resistance to *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* is conferred mainly by the *Mi* genes, a characteristic that was transferred to tomato from its wild relative *S. peruvianum* (*L. peruvianum*) (Yaghoobi *et al.*, 1995). It has been demonstrated that *Mi* genes are not effective against *N. aberrans s.l.*, and no reliable sources of resistance against this nematode in tomato have been found (Veremis *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2017). In Mexico, wild tomato (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) grows under inhospitable conditions and is commonly considered a crop-weed. In Michoacán, wild tomatoes are locally known as “tinguaraques”, and some populations are tolerant to water stress and certain pests and diseases (Sánchez-Peña *et al.*, 2006; Álvarez-Hernández *et al.*, 2009). So far, no studies have been conducted on the development of *N. aberrans s.l.* in these genotypes in Michoacán. Therefore, the aim of this study was to know the response of five local populations of wild tomato and one cultivated variety to inoculation with second-stage juveniles ( $J_2$ ) of the nematode.

The seeds of wild tomato (WT) were obtained from tomatoes collected in the municipalities of Jiquilpan (19° 59' 5" N, 102° 42' 2" W) and Villamar: Los negritos (20° 03' 28" N, 102° 36' 29" W), El platanal (20° 03' 43" N, 102° 35' 55" W) and Emiliano Zapata (19° 58' 47" N, 102° 37' 12" W) (located in the Ciénega de Chapala

enfermedades (Sánchez-Peña *et al.*, 2006; Álvarez-Hernández *et al.*, 2009). A la fecha, no existen estudios sobre el desarrollo de *N. aberrans s.l.* en estos genotipos michoacanos. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue conocer la respuesta de cinco poblaciones locales de JS y una variedad cultivada a la inoculación con juveniles de segundo estadio de este nematodo.

Las semillas de jitomate silvestre (JS) provinieron de frutos recolectados en los municipios de Jiquilpan (19° 59' 5" N, 102° 42' 2" W), y Villamar: Los negritos (20° 03' 28" N, 102° 36' 29" W), El platanal (20° 03' 43" N, 102° 35' 55" W), y Emiliano Zapata (19° 58' 47" N, 102° 37' 12" W) (ubicados en la Ciénega de Chapala "región Michoacán"), los frutos fueron de tamaño pequeño según la clasificación descrita por Álvarez-Hernández *et al.* (2009). Las poblaciones se denominaron como TGM-J, TGM-N, TGM-P, TGM-B y TGM-Z. Las semillas se desinfectaron superficialmente con NaClO al 1% y se germinaron a 25±1 °C. Como referencia de susceptibilidad a *N. aberrans s.l.* se incluyó al cv. Río grande (cvRG) como control. Las plántulas se trasplantaron en macetas conteniendo arena esterilizada y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 27±1 °C con un fotoperiodo de 14 h luz. El riego se realizó cada 24 h, y la fertilización quincenalmente con Nitrofoska™ 12-12-12 (3.1 g por litro de agua). Para la inoculación de las plantas con *N. aberrans s.l.*, el inóculo se obtuvo de raíces agalladas de jitomate (cultivo monoxénico) (población del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México, México) (Villar-Luna *et al.*, 2017). La extracción de huevos se realizó según Hussey y Barker (1973), y la obtención de J<sub>2</sub> fue con la técnica de Baermann usando placas de Petri e incubando los huevos en agua esteril a 25±1 °C. La inoculación con J<sub>2</sub> se realizó cuando las plantas cumplieron 25 días de edad. Para contabilizar los nematodos en el interior de las raíces, éstas se

"Michoacán region"); the tomatoes were small in size according to the classification described by Álvarez-Hernández *et al.* (2009). The populations were named TGM-J, TGM-N, TGM-P, TGM-B and TGM-Z. The surface of the seeds was disinfected with 1% NaClO and the seeds germinated at 25±1 °C. As a reference of the susceptibility to *N. aberrans s.l.*, cultivar Río Grande (cvRG) was included as the control. The seedlings were transplanted to pots containing sterilized sand and kept in a growth chamber at 27±1 °C and a photoperiod of 14 h light. Irrigation was applied every 24 h, and fertilization using Nitrofoska™ 12-12-12 (3.1 g per liter of water) every two weeks. For the inoculation of the plants with *N. aberrans s.l.*, the inoculum was obtained from galled tomato roots (monoxenic culture) (population from Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, State of Mexico, Mexico) (Villar-Luna *et al.*, 2017). Egg extraction was performed according to Hussey and Barker (1973), and J<sub>2</sub> was obtained by applying Baermann's technique, that is, using Petri dishes and incubating the eggs in sterile water at 25±1 °C. The inoculation with J<sub>2</sub> was carried out when the plants turned 25 days old. To count the nematodes within the roots, the roots were stained using the sodium hypochlorite-acid fuchsin method (Byrd *et al.*, 1983), the number of nematodes per root (NNR) was recorded, and the juvenile and adult stages were observed under an optical microscope (10x) (Zeiss Primo Star, Germany). The galling rate was evaluated using a 0-5 scale: 0: roots without galls; 1: 1-20% galling; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; and 5: 81-100% (Oka *et al.*, 2009). To determine the number of eggs, they were extracted from each root, according to Hussey and Barker (1973), and counted under a stereoscopic microscope (Zeiss, Germany).

Three independent experiments were established using a completely random design. In experiments

tiñeron por el método hipoclorito de sodio-fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983), se registró el número de nematodos por raíz (NNR) y los estadios juveniles y adultos bajo un microscopio óptico (10x) (Zeiss Primo Star, Germany). El índice de agallamiento se evaluó según una escala de 0-5: 0: raíces sin agallas; 1: 1-20 % de agallamiento; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; y 5: 81-100% (Oka *et al.*, 2009). Para determinar el número de huevos, de cada raíz se realizó la extracción según Hussey y Barker (1973), y se contabilizaron bajo un microscopio estereoscopio (Zeiss, Germany).

Se establecieron tres experimentos independientes y el diseño experimental fue completamente al azar. En los experimentos 1 y 2 se evaluaron los tratamientos: 1) JS (TGM-J), y 2) cvRG, ambos inoculados con *N. aberrans s. l.*. El primer experimento (E1) comprendió trece plantas de cada genotipo, las cuales fueron crecidas en macetas con 75 cm<sup>3</sup> de arena e inoculadas (1000 J<sub>2</sub>/planta). A los 21 días posteriores a la inoculación (dpi) se evaluó el NNR (n=5 plantas), y a 45 dpi se registró el índice de agallamiento de raíces (n=8 plantas). El segundo experimento (E2) también comprendió trece plantas de cada genotipo, cada una de ellas se inoculó con 300 J<sub>2</sub>, y las evaluaciones se realizaron a 7 y 21 dpi (NNR) (n=4 plantas), y a 60 dpi (número de agallas y huevos) (n=5 plantas). En E2, las plantas fueron crecidas en macetas con 25 cm<sup>3</sup> de arena y a 21 dpi fueron trasplantadas por segunda vez en macetas con 75 cm<sup>3</sup> (para permitir un mejor desarrollo de raíces). En el experimento 3 (E3), los tratamientos consistieron de cinco genotipos: TGM-J, TGM-N, TGM-P, TGM-B, TGM-Z, y cvRG; las plantas se crecieron en macetas de 25 cm<sup>3</sup>, el nivel de inoculo fue de 500 J<sub>2</sub> por planta, y a 60 dpi se evaluó el número de agallas por gramo de raíz (n=5 plantas). Los datos del número de nematodos, agallas y huevos fueron transformados a log<sub>10</sub> (x + 1), se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y

1 and 2, the following treatments were evaluated: 1) WT (TGM-J) and 2) cvRG, both inoculated with *N. aberrans s. l.* The first experiment (E1) included thirteen plants of each genotype, which were grown in pots containing 75 cm<sup>3</sup> of sand and inoculated (1000 J<sub>2</sub>/plant). Twenty-one days post inoculation (dpi), the NNR (n=5 plants) was evaluated, and at 45 dpi, the rate of root galling (n=8 plants) was recorded. The second experiment (E2) also included thirteen plants of each genotype, which were inoculated with 300 J<sub>2</sub>, and evaluated at 7 and 21 dpi (NNR) (n=4 plants), and at 60 dpi (number of galls and eggs) (n=5 plants). In E2, the plants were grown in pots containing 25 cm<sup>3</sup> of sand, transplanted at 21 dpi for a second time to pots containing 75 cm<sup>3</sup> of sand (to allow better root development). In experiment 3 (E3), the treatments included five genotypes: TGM-J, TGM-N, TGM-P, TGM-B, TGM-Z and cvRG; the plants were grown in 25 cm<sup>3</sup> pots, the level of the inoculum was 500 J<sub>2</sub> per plant, and galls per gram of root (n=5 plants) were evaluated at 60 dpi. Data of the number of nematodes, galls and eggs were converted to log<sub>10</sub> (x + 1), subjected to an analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by applying Tukey's method ( $p \leq 0.05$ ) using the SAS program version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

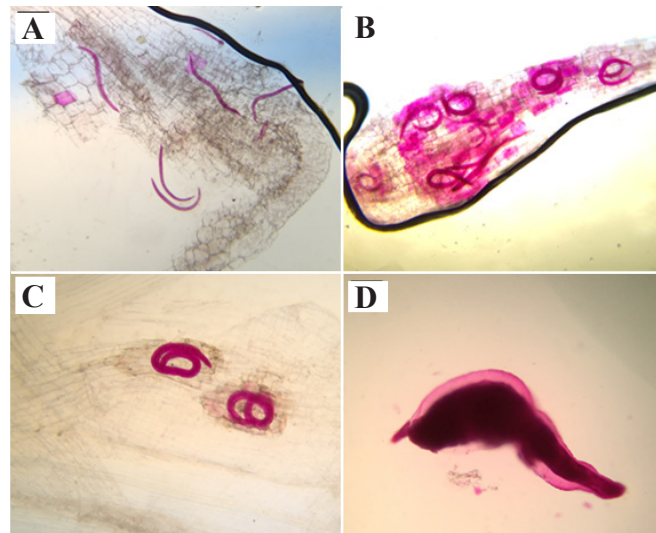
Juveniles observed in roots of all the genotypes corresponded to stages J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> and J<sub>4</sub> at the different evaluation times (Figure 1). Even though there were numerical differences in E1 at 21 dpi, they were not statistically significant, and at this time, stages J<sub>3</sub> and J<sub>4</sub> were evident. In E2, J<sub>3</sub> predominated at 7 dpi, and few J<sub>2</sub> were observed; at 14 dpi, the juveniles corresponded to J<sub>3</sub> and J<sub>4</sub>; and at 21 dpi, J<sub>4</sub> predominated. In E1, at 21 dpi, the average percentage of nematodes within the roots was 5.6% in WT (TGM-J) and 6.7% in cvRG. In E2, at 7 dpi, the TGM-J was 20%, while in cvJRG, it was 24.3%; and at 21 dpi, it was 4.7% and 13.2%,

de comparación de medias con el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

En raíces de todos los genotipos de jitomate, los juveniles observados correspondieron a los estadios  $J_2$ ,  $J_3$  y  $J_4$  en los distintos tiempos de evaluación (Figura 1). En el E1, a 21 dpi, aun cuando numéricamente hubo diferencias, éstas no fueron estadísticamente significativas, a este tiempo fueron evidentes los estadios  $J_3$  y  $J_4$ . En el E2, a 7 dpi predominaron  $J_3$ , también se observaron escasos  $J_2$ ; a 14 dpi, los juveniles correspondieron a  $J_3$  y  $J_4$ ; y a 21 dpi,  $J_4$  fueron los predominantes. En el E1, a 21 dpi el porcentaje promedio de nematodos en el interior de las raíces fue de 5.6% en el JS (TGM-J) y de 6.7% en el cvRG. En el E2, a 7 dpi en TGM-J fue de 20% mientras que en cvJRG fue de 24.3%; y a 21 dpi fue de 4.7% y 13.2%, respectivamente

respectively (Table 1). In the third experiment (E3), all the wild tomato populations showed typical *N. aberrans s. l.* galls in their roots (rosary-type galls). It must be noted that in some wild populations, the nematode caused greater galling than in cvRG, but they were not statistically different (Table 2). In E2, the second transplanting promoted better root development, but the number of galls did not increase at 60 dpi.

All the stages of *N. aberrans s.l.* were evident both in WT TGM-J and cvRG, and their characteristics were in agreement with the results described by Manzanilla-López *et al.* (2002), that is, the  $J_2$  had long and thin bodies,  $J_3$  and  $J_4$  were longer and wider (arranged in the shape of a “C” or rolled up), and the adult female had a spindle-to-globose shape (Figure 1D). As for the NNR, the reduced number at 7 dpi (E2) compared to the



**Figura 1.** Estadios de *Nacobbus aberrans sensu lato* observados en raíces de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. lycopersicum* cv. Río grande. A: juveniles del segundo estadio ( $J_2$ ); B: juveniles del tercer estadio ( $J_3$ ); C: juveniles del cuarto estadio ( $J_4$ ); y D: hembra adulta. Fotos representativas de raíces teñidas por el método hipoclorito de sodio-fucsina-ácida.

**Figure 1.** Stages of *Nacobbus aberrans sensu lato* observed in roots of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* and *S. lycopersicum* cv. Río grande. A: juveniles of the second stage ( $J_2$ ); B: juveniles of the third stage ( $J_3$ ); C: juveniles of the fourth stage ( $J_4$ ); and D: adult female. Representative photos of roots stained using the sodium hypochlorite-acid fuchsin method.

(Cuadro 1). En el tercer experimento (E3), todas las poblaciones de jitomate silvestre mostraron agallas características de *N. aberrans s. l.* en sus raíces (agallamiento tipo rosario). Cabe destacar que, en algunas poblaciones silvestres, el nematodo indujo un mayor agallamiento con respecto al cvRG, no obstante, no fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 2). En E2, el segundo trasplante promovió un mejor desarrollo de raíces, no obstante, el número de agallas no se incrementó a 60 dpi. (Figura 2).

Tanto en el JS TGM-J como en el cvRG fueron evidentes todos los estadios de *N. aberrans s.l.*, y sus características fueron consistentes con lo descrito por Manzanilla-López *et al.* (2002); así, los J<sub>2</sub> fueron de cuerpo alargado y delgado, los J<sub>3</sub> y J<sub>4</sub> fueron más largos y anchos (dispuestos en forma de “C” o enrollados, y la hembra adulta fue en forma de huso tendiendo a globosa (Fig. 1D). En cuanto al NNR, el reducido número a 7 dpi (E2) con respecto

initial inoculum (300 J<sub>2</sub>) may be associated with the juveniles’ migratory habit, and it is possible that a certain proportion of individuals were outside of the root when measurements were taken, and that not all of them succeeded in invading the root. Before reaching the adult stage, *N. aberrans s.l.* nematodes are usually migratory (they enter and leave the root frequently), and this is a common behavior of J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>4</sub> and the immature female, while the adult female has a sessile habit similar to that of *Meloidogyne* spp. (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Similarly, Godínez-Vidal *et al.* (2013) reported that during the compatible *Capsicum annum*-*N. aberrans* interaction, at 7 dpi only 12.3% of the inoculated J<sub>2</sub> were observed inside the roots. The same as in *Meloidogyne* spp., a certain proportion of individuals that enter the root are different, some are female and others are male; males are vermiform and leave the root, while females become wider

**Cuadro 1. Estadios juveniles, agallas y huevos en raíces de tinguaraque (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) inoculadas con *Nacobbus aberrans sensu lato*.**

**Table 1. Juvenile stages, galls and eggs in tinguaraque roots (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) inoculated with *Nacobbus aberrans sensu lato*.**

| Genotipo | Exp | Nematodos <sup>z</sup>                   |  | Agallamiento           |  | Huevos<br>60 <sup>y</sup>                 |
|----------|-----|--|--|------------------------|--|---|
|          |     | 7  | 21                                       | 45 <sup>z</sup>        | 60 <sup>y</sup>                        |   |
| TGM-J    | 1   | nd                                       | 56.40±4.93<br>(1.75±0.04 <sup>a</sup> )  | 1.75±0.16 <sup>a</sup> | nd                                     | nd  |
| RG       |     | nd                                       | 66.80±6.30<br>(1.82±0.04 <sup>a</sup> )  | 2.25±0.31 <sup>a</sup> | nd                                     | nd  |
| TGM-J    | 2   | 60.00±12.68<br>(1.75±0.10 <sup>a</sup> ) | 14.00±5.12<br>(1.09±0.16 <sup>a</sup> )  | nd                     | 2.46±0.37<br>(0.53±0.05 <sup>a</sup> ) | 219.21±21.75<br>(2.33±0.04 <sup>a</sup> ) |
| RG       |     | 73.00±7.12<br>(1.86±0.04 <sup>a</sup> )  | 39.75±11.74<br>(1.56±0.11 <sup>a</sup> ) | nd                     | 0.68±0.12<br>(0.22±0.03 <sup>b</sup> ) | 137.52±28.77<br>(2.10±0.10 <sup>a</sup> ) |

TGM-J: jitomate silvestre; RG: cv. Río grande. 7, 21, 45 y 60: días post-inoculación con *Nacobbus aberrans sensu lato*. <sup>†</sup>Número de nematodos (diferentes estadios) por raíz. <sup>‡</sup>Número de agallas y huevos por g de raíz. <sup>§</sup>Índice de agallamiento evaluado según una escala de 0-5, donde 0: raíces sin agallas; 1: 1-20% de agallamiento; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; y 5: 81-100% (Oka *et al.*, 2009). nd: no determinado. Los valores representan la media ± error estándar. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, *p*<0.05). El ANOVA se realizó utilizando datos transformados [ $\log_{10}(x + 1)$ ] y se muestran entre paréntesis / TGM-J: wild tomato; RG: cv. Río grande. 7, 21, 45 and 60: days post inoculation with *Nacobbus aberrans sensu lato*. <sup>†</sup>Number of nematodes (different stages) per root. <sup>‡</sup>Number of galls and eggs per g of root. <sup>§</sup>Gall index according to a 0-5 scale, where 0: roots without galls; 1: 1-20% galling; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; and 5: 81-100% (Oka *et al.*, 2009). nd: not determined. The values represent the means ± standard error. Means with the same letter are not statistically different (Tukey, *p*<0.05). The ANOVA was conducted using converted data [ $\log_{10}(x + 1)$ ] and are shown in parentheses.

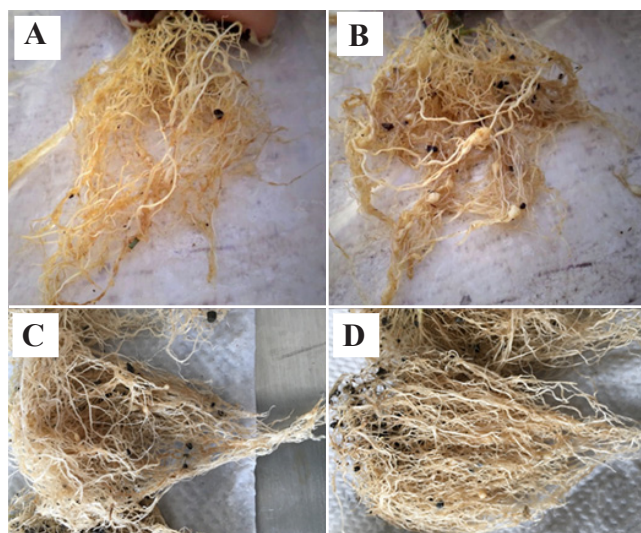
**Cuadro 2. Agallamiento inducido por *Nacobbus aberrans sensu lato* en raíces de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (tinguaraque).****Table 2. Galls caused by *Nacobbus aberrans sensu lato* in roots of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (tinguaraque).**

| Tratamiento | Agallas/g de raíz                     |
|-------------|---------------------------------------|
| TGM-J       | 98.38±7.64 (1.99±0.03 <sup>a</sup> )  |
| TGM-N       | 65.18±12.53 (1.79±0.08 <sup>a</sup> ) |
| TGM-P       | 90.42±18.76 (1.92±0.10 <sup>a</sup> ) |
| TGM-B       | 57.22±5.79 (1.76±0.04 <sup>a</sup> )  |
| TGM-Z       | 59.77±4.27 (1.78±0.03 <sup>a</sup> )  |
| RG          | 58.32±2.02 (1.77±0.01 <sup>a</sup> )  |

Los valores representan la media ± error estándar. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ). RG: cv. Río grande. El ANOVA se realizó utilizando datos transformados [ $\log_{10}(x + 1)$ ] y se muestran entre paréntesis / The values represent the media ± standard error. Means with the same letter are not significantly different (Tukey,  $p < 0.05$ ). RG: cv. Río Grande. The ANOVA was conducted using converted data [ $\log_{10}(x + 1)$ ] and they are shown in parentheses.

al inoculo inicial (300 J<sub>2</sub>), se asocia con el hábito migratorio de los juveniles, es posible que cierta

and adopt a sessile stage (Manzanilla-López *et al.*, 2002). This explains what happened in E2, where the NNR at 21 dpi was lower than at 7 dpi. Regarding root galling and egg production, all the WT populations in E2 and E3 were susceptible, because the nematode completed its life cycle, the same as in cvRG. The opposite occurs in resistant plants, since the nematode's life cycle is usually interrupted at any of its juvenile stages. This blockage is conditioned by a hypersensitive response, a mechanism characterized by local necrosis at the infection site, which confines and eliminates the pathogen (Williamson and Kumar, 2006). The resistance to root-knot nematodes is characterized by the inability of the individuals to establish a specialized feeding site, females do not complete their development, and there is minimum formation of galls and eggs, which sometimes cannot even be observed (Williamson and Kumar, 2006). The data on galling and eggs in this study are similar to those reported by Veremis



**Figura 2. Raíces agalladas por *Nacobbus aberrans sensu lato* (población Montecillo) a 45 (A-B) y 60 (C-D) días post-inoculación. A y C) *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*; B y D) *S. lycopersicum* cv. Río grande.**

**Figure 2. Galls caused by *Nacobbus aberrans sensu lato* in roots (Montecillo population) at 45 (A-B) and 60 (C-D) days post inoculation. A and C) *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*; B and D) *S. lycopersicum* cv. Río grande.**

proporción de individuos estuvieran fuera de la raíz al momento de realizar el registro, aunado al hecho de que no todos tienen éxito en invadir la raíz. *N. aberrans s.l.*, previo a su etapa adulta, es generalmente migratorio (ingreso y egreso frecuente de la raíz), este comportamiento es común de los J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>4</sub> y la hembra inmadura; mientras que la hembra adulta exhibe un hábito sésil parecido a *Meloidogyne* spp. (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Similarmente, Godínez-Vidal *et al.* (2013) reportaron que en la interacción compatible *Capsicum annuum*-*N. aberrans*, a 7 dpi solo el 12.3% de los J<sub>2</sub> inoculados fueron observados dentro de las raíces. Al igual que en *Meloidogyne* spp., cierta proporción de individuos que ingresan a la raíz se diferencian en hembras y otros en machos, los machos son vermiformes y abandonan la raíz, mientras que las hembras se ensanchan y adoptan el estado sésil (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Lo anterior explica lo ocurrido en el E2, donde a 21 dpi hubo un decremento en el NNR con respecto a los 7 dpi. Con relación al agallamiento de raíces y producción de huevos, en los E2 y E3, todas las poblaciones de JS fueron susceptibles, debido a que el nematodo completó su ciclo de vida al igual que en el cvRG. En plantas resistentes ocurre lo opuesto, usualmente el ciclo de vida es interrumpido en cualquiera de los estadios juveniles del nematodo, este bloqueo es condicionado por una respuesta hipersensitiva, mecanismo que se caracteriza por una necrosis local en el sitio de infección, la cual confina y elimina al patógeno (Williamson y Kumar, 2006). La resistencia a nematodos agalladores se caracteriza por el fracaso de los individuos para formar un sitio especializado de alimentación, las hembras no completan su desarrollo, y la formación de agallas y huevos es mínima e incluso no observables (Williamson y Kumar, 2006). Los datos de agallamiento y huevos en este trabajo son similares a los reportados por Veremis *et al.* (1997), quienes confrontaron un

*et al.* (1997), who confronted an *L. esculentum* var. *cerasiforme* genotype against an Argentinian *N. aberrans s.l.* population; although the number of eggs and galls was lower than that on cv. Rutgers (susceptible), the genotype was considered susceptible. Different *N. aberrans s.l.* populations can induce a different response in their hosts and vice versa. For example, Toledo *et al.* (1993) revealed the great parasitic ability of *N. aberrans s.l.* in 10 hosts: tomato, chili, purslane (*Portulaca oleracea*), sugar beet (*Beta vulgaris*), chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*), potato (*Solanum tuberosum*), cucumber (*Cucumis sativus*), radish (*Raphanus sativus*), squash (*Cucurbita pepo*) and bean; six of them were susceptible to four population of the nematode. This also suggested that *N. aberrans s.l.* races are present in Mexico.

The susceptibility of wild plants to phytoparasitic nematodes is not unusual. For example, Veremis *et al.* (1997) found that several wild accessions of *L. chmielewskii*, *L. peruvianum*, *L. peruvianum* var. *glandulosum*, *L. hirsutum* and *L. pimpinellifolium* were susceptible to *N. aberrans s.l.* A study conducted by Ruiz de Galarreta *et al.* (1998), who evaluated 90 wild species of *Solanum* (98 accessions) against *Globodera pallida*, also revealed that only 12 accessions were resistant. However, several of the susceptible ones showed resistance to the *Phytophthora infestans* oomycete and to four phytopathogenic viruses. Under another scenario, the wild relative of *L. pimpinellifolium* (= *S. pimpinellifolium*) was susceptible to *M. javanica*; this genotype had a galling rate similar to that of susceptible tomato lines but was catalogued as tolerant because its fruit production was not altered (Udo *et al.*, 2008). The results reveal that local collections of *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* are able to host the *N. aberrans* population used in this study. *N. aberrans s.l.* invaded the roots and completed its development and reproduction cycle.



genotipo de *L. esculentum* var. *cerasiforme* contra una población argentina de *N. aberrans* s.l.; aun cuando el número de huevos y de agallas fue inferior al del cv. Rutgers (susceptible), el genotipo fue considerado susceptible. Diferentes poblaciones de *N. aberrans* s. l. pueden inducir una respuesta distinta en sus hospedantes y viceversa. Por ejemplo, Toledo *et al.* (1993) revelaron la gran capacidad parasítica de *N. aberrans* s.l. sobre diez hospedantes jitomate, chile, verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), papa (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), y frijol, seis de ellos fueron susceptibles a cuatro poblaciones del nematodo, lo anterior también sugirió la presencia de razas de *N. aberrans* s.l. en México.

La susceptibilidad de plantas silvestres a nematodos fitoparásitos no es inusual, por ejemplo, Veremis *et al.* (1997) encontraron que varias accesiones silvestres de *L. chmielewskii*, *L. peruvianum*, *L. peruvianum* var. *glandulosum*, *L. hirsutum*, y *L. pimpinellifolium* resultaron susceptibles a *N. aberrans* s.l. También, un trabajo desarrollado por Ruiz de Galarreta *et al.* (1998) quienes evaluaron 90 especies silvestres de *Solanum* (98 accesiones) contra *Globodera pallida*, reveló que solo doce accesiones resultaron resistentes; sin embargo, varias de aquellas que resultaron susceptibles, mostraron resistencia al oomiceto *Phytophthora infestans* y a cuatro virus fitopatógenos. En otro escenario, el pariente silvestre *L. pimpinellifolium* (= *S. pimpinellifolium*) fue susceptible a *M. javanica*, este genotipo presentó un índice de agallamiento similar al de líneas susceptibles de jitomate, no obstante, fue catalogado como tolerante debido a que su producción de frutos no fue alterada (Udo *et al.*, 2008). Los resultados revelan la capacidad de las colectas locales de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* de ser hospedantes de la población de *N. aberrans* utilizada

The above suggests the need to explore other wild native solanaceous plants as possible sources of resistance, because this information is currently scarce. We do not recommend including tinguaraque in *N. aberrans* s.l. management programs (in the region where samples were taken), for example, those that are used as rootstocks in soils infested with the nematode. In addition to its phytosanitary use, tinguaraque is a resource valued by the rural population in western Mexico, because it has food (in sauces) and medicinal uses for humans and animals. Therefore, it is essential to promote its conservation. However, when it grows as a weed in crop fields, it is at risk because herbicides are used and grasses are burned (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2009).

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

en este trabajo. *N. aberrans* s.l. invadió las raíces, y completó su desarrollo y reproducción. Lo anterior sugiere la necesidad de explorar otras solanáceas silvestres nativas como posibles fuentes de resistencia, información que a la fecha es escasa. No se recomienda la inclusión del tinguaraque en programas de manejo de *N. aberrans* s.l. (en la región donde se realizaron las colectas), por ejemplo, aquellos que involucren su uso como portainjertos en suelos infestados con este nematodo. Aunado al aprovechamiento fitosanitario del tinguaraque, este material constituye un recurso valorado por la población rural en el occidente de México, tiene usos alimenticios -como la elaboración de salsas- y medicinales para humanos y animales; por tanto, es crucial promover su conservación, sin embargo, al crecer como arvense en los cultivos, enfrenta riesgos por el uso de herbicidas y quemas de pastizales (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2009).

## LITERATURA CITADA

- Álvarez-Hernández JC, Cortez-Madrigal H, García-Ruiz I, Ceja-Torres LF y Pérez-Domínguez JF. 2009. Incidencia de plagas en injertos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) sobre parientes silvestres. Revista Colombiana de Entomología 35: 150-155. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882009000200007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882009000200007)
- Blancard D. 2012. Tomato diseases, identification, biology and control: a colour handbook. Second edition. Manson Publishing Ltd. London, UK. 688 p. <http://dx.doi.org/10.1201/b15145>
- Byrd Jr DW, Kirkpatrick T and Barker KR. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology 15:142-143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/pdf/142.pdf>
- Cabrera VA, Dottori N and Doucet ME. 2017. Histopathology of roots of three tomato cultivars infected with two separate isolates of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. European Journal of Plant Pathology 148: 393-403. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-1097-1>
- Cristóbal-Alejo J, Mora-Aguilera G, Manzanilla-López RH, Marbán-Néndoza N, Sánchez-García P, Cid del Prado-Vera I and Evans K. 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. Nematology 8: 727-737. <http://dx.doi.org/10.1163/156854106778877929>
- FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT Database. Available online at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Godínez-Vidal D, Rocha-Sosa M, Sepúlveda-García EB, Lozoya-Gloria E, Rojas-Martínez RI, Guevara-Olvera L and Zavaleta-Mejía E. 2013. Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGC<sub>o</sub>A-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Plant and Soil 372: 339-348. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1743-8>
- Grandillo S, Chetelat R, Knapp S, Spooner D, Peralta I, Camareri M, Perez O, Termolino P, Tripodi P, Chiusano ML, Ercolano MR, Frusciant L, Monti L and Pignone D. 2011. *Solanum* sect. *Lycopersicon*. Pp: 129-215. In: Kole C (ed.). Wild crop relatives: genomic and breeding resources, vegetables. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 282 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-20450-0>
- Hajjar R and Hodgkin T. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. Euphytica 156:1-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9363-0>
- Hallmann J and Meressa BH. 2018. Nematode parasites of vegetables. Pp: 346-410. In: Sikora RA, Coyne D, Hallmann J and Timper P. (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Third edition. CABI International. Oxfordshire, UK. 876 p. <http://dx.doi.org/10.1079/9781786391247.0346>
- Hussey RS and Barker KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. The Plant Disease Reporter 57: 1025-1028. <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.31175001263642;view=1up;seq=491>
- Manzanilla-López RH, Costilla MA, Doucet M, Franco J, Inserra RN, Lehman PS, Cid del Prado-Vera I, Souza RM, and Evans K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227. <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69655>
- Oka Y, Shuker S and Tkachi N. 2009. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Pest Management Science 65: 1082-1089. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1796>
- Reid A, Manzanilla-López RH and Hunt DJ. 2003. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae); a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. Nematology 5: 441-451.
- Rodríguez-Guzmán E, Vargas-Canela D, Sánchez-González JJ, Lépiz-Ildefonso R, Rodríguez-Contreras A, Ruiz-Corral JA, Puente-Ovalle P y Miranda-Medrano R. 2009.-Etnotánica de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* en el occidente de México. Naturaleza y Desarrollo 7:45-57. [https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol7num2/NatyDes\\_Vol-7-2-Art4.pdf](https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol7num2/NatyDes_Vol-7-2-Art4.pdf)
- Ruiz de Galarreta JI, Carrasco A, Salazar A, Barrena I, Iturritxa E, Marquinez R, Legorburu FJ and Ritter E. 1998. Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. Potato Research 41: 57-68. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02360262>
- Sánchez-Peña P, Oyama K, Núñez-Farfán J, Fornoni J, Hernández-Verdugo S, Márquez-Guzmán J and Garzón-Tiznado JA. 2006. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia spp.*) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) spooner G.J. Anderson et R.K. Jansen in Northwestern Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 711-719. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-004-3943-9>
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Toledo RJC, Sosa-Moss C y Zavaleta-Mejía E. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. Nematropica 23: 105-108. <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64066>
- Udo IA, Uguru MI, Ogbuji RO and Ukeh DA. 2008. Sources of tolerance to root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in cultivated and wild tomato species. Plant Pathology Journal 7: 40-44. <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2008.40.44>
- Veremis JC, Cap GB and Roberts PA. 1997. A search for resistance in *Lycopersicon* spp. to *Nacobbus aberrans*. Plant Disease 81: 217-221. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.217>
- Villar-Luna E, Rojas-Martínez RI, Reyes-Trejo B, Gómez-Rodríguez O and Zavaleta-Mejía E. 2017. Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. European Journal of Plant Pathology 148:867-881. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1142-0>
- Williamson VM and Kumar A. 2006. Nematode resistance in plants: the battle underground. Trends in Genetics 22: 396-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.05.003>

Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen Y and Williamson VM. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. Theoretical and Applied Genetics 91: 457-464. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00222973>

# Phyllody of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) associated to *Candidatus* phytoplasma asteris

## Filodia de la margarita (*Dimorphotheca sinuata*) asociada a *Candidatus* phytoplasma asteris

Candelario Ortega-Acosta, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Reyna Isabel Rojas-Martínez\*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México, Jorge A. Gutiérrez-Gallegos, Herbario JES, Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, 56230, Estado de México.\*Autor para correspondencia: rojas@colpos.mx

Recibido: 17 de Mayo, 2019.

Aceptado: 31 de Julio, 2019.

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI and Gutiérrez-Gallegos JA. 2019. Phyllody of the margarita (*Dimorphotheca sinuata*) associated to *Candidatus* phytoplasma asteris. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 444-453.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-3

Primera publicación DOI: 14 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 14, 2019.

**Resumen.** En Montecillo Texcoco, Estado de México se observaron plantas de margarita (*Dimorphotheca sinuata*) exhibiendo síntomas de filodia, virescencia y proliferación de ramas axilares putativos a los inducidos por fitoplasmas. Por lo que el objetivo de esta investigación fue detectar el fitoplasma asociado a estos síntomas mediante PCR con los iniciadores P1/P7 y R16F2n/R2. Se detectó la presencia de fitoplasmas en tejido foliar sintomático. El producto de PCR de 1200 pb obtenido de la PCR se secuenció y sometió a digestión con las

**Abstract.** In Montecillo Texcoco, State of Mexico we observed daisy plants (*Dimorphotheca sinuata*) showing symptoms of phyllody, virescence and proliferation of axillary branches, all those induced by phytoplasmas. Therefore, the objective of this investigation was to detect the phytoplasma associated with these symptoms by PCR with primers P1/P7 and R16F2n/R2 (nested PCR). The 1200 bp PCR product was obtained from the PCR and it was digested with the restriction enzymes MseI (Tru91), AluI, KpnI and HaIII and restriction maps showed that the phytoplasma present in *Dimorphotheca sinuata* is *Candidatus* phytoplasma asteris (16Sr1-B). The sequences were deposited on the NCBI data base and had a similarity of 99% with *Candidatus* phytoplasma asteris group 16Sr1-B from Iran (MH638316.1). A phylogenetic analysis was performed with the Neighbour-Joining method in which the phytoplasm from daisy was grouped with *Candidatus* phytoplasma asteris. According to the symptoms observed in the field, analysis of restriction patterns, sequencing and phylogeny, the

enzimas de restricción *MseI* (*Tru91*), *AluI*, *Kpn1* y *HaIII*, los patrones de restricción evidenciaron que el fitoplasma presente en *Dimorphotheca sinuata* es *Candidatus* phytoplasma asteris (16SrI). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del NCBI y tuvieron una similitud del 99% con *Candidatus* phytoplasm asteris grupo 16SrI-B de Irán (MH638316.1). Se realizó un análisis filogenético con el método de Neighbour-Joining, en el cual el aislamiento detectado en margarita, se agrupó con *Candidatus* phytoplasma asteris. De acuerdo con los síntomas observados en campo, análisis de patrones de restricción, secuenciación y filogenia, indican que la filodia en margarita está asociada a *Candidatus* phytoplasma asteris, relacionado filogenéticamente al grupo 16SrI-B.

**Palabras clave:** Reversión floral, RFLP, secuenciación, fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias no cultivables carentes de pared celular pertenecientes a la clase Mollicutes (Weisburg *et al.*, 1989), son responsables de cientos de enfermedades en plantas cultivadas y arvenses en todo el mundo (Lee y Gundersen-Rindal, 2000). Estos patógenos están restringidos al floema, se transmiten por injerto y mediante insectos vectores (Weintraub y Beanland, 2006) y semilla (Rojas-Matínez *et al.*, 2009). Los fitoplasmas infectan sistémicamente a sus hospedantes al moverse a través de los poros de las placas del floema distribuyéndose por todo su sistema vascular (Lee y Gundersen-Rindal, 2000). A la fecha, estos microorganismos no se cultivan en un medio libre de células, lo cual sugiere que tienen un metabolismo más reducido que otros mollicutes como se ha evidenciado en los genomas de fitoplasmas que a la fecha se han secuenciado (Oshima *et al.*, 2004).

Los fitoplasmas inducen una variedad de síntomas entre los que se incluyen, amarillamientos,

phyllody of daisy is associated with *Candidatus* phytoplasma asteris, phylogenetically related to the 16SrI-B group.

**Key words:** Floral reversion, RFLP, sequencing, phytoplasmas.

Phytoplasmas are non-cultivable bacteria with no cell walls, belonging to the class Mollicutes (Weisburg *et al.*, 1989), and are responsible for hundreds of diseases in cultivated plants and weeds around the world (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). These pathogens are restricted to the phloem, are transmitted by grafting and by insects (Weintraub and Beanland, 2006), as well as by seed (Rojas-Matínez *et al.*, 2009). Phytoplasmas systematically infect their hosts by moving through the pores of the plates of the phloem, distributing throughout their vascular system (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). So far, these microorganisms are not cultivated in a free cell medium, which suggests that they have a more reduced metabolism than other mollicutes, as observed in the genomes of phytoplasmas that have been sequenced to date (Oshima *et al.*, 2004).

Phytoplasmas induce a variety of symptoms, including yellowing, delay in growth, sterility of flowers, necrosis, witch's broom, phyllody and virescence, among others (Rojas *et al.*, 2013). The three latter symptoms suggest that phytoplasmas interfere with the metabolism of plant hormones (Weintraub and Bealand, 2006). The severity of symptoms depends of the phytoplasma isolate, the age of the plant and the moment in which the infection occurs.

The interaction of phytoplasmas with their vector insects is complex and implies its intra- and extra-cellular replication in the intestine, salivary glands, epithelial and muscular tissues and other organs. The systemic infection of the

retraso del crecimiento, esterilidad de las flores, necrosis, escoba de bruja, filodia y virescencia entre otros (Rojas *et al.*, 2013). Estos tres últimos síntomas sugieren que los fitoplasmas interfieren con el metabolismo de las hormonas vegetales (Weintraub y Bealand, 2006). La severidad de los síntomas depende del aislamiento, la edad de la planta y el momento en que ocurre la infección.

La interacción de los fitoplasmas con sus insectos vectores es compleja e implica su replicación intra y extracelular en el intestino, glándulas salivales, tejidos epiteliales, musculares y otros órganos. La infección sistémica de los fitoplasmas dentro del insecto puede tomar diez días o más dependiendo del grupo, la especie de insecto y la temperatura (Sugio y Hogenhout, 2012). Considerando que hay evidencia de que algunos fitoplasmas se transmiten verticalmente en sus insectos vectores (Weintraub y Bealand, 2006), los medios predominantes de supervivencia más efectiva es por esta vía. Los insectos que pueden ser vectores de estos patógenos pertenecen principalmente a las familias Cicadellidae, Fulgoridae y Psilidae en menor grado (Weintraub y Bealand, 2006).

A la fecha se tienen totalmente secuenciados cuatro genomas de fitoplasmas entre ellos el causante del amarillamiento del áster (*Candidatus Phytoplasma asteris*) quien tiene una amplia gama de hospedantes y son transmitidos por diferentes insectos polípagos. Diversos factores contribuyen a la reducción del genoma de fitoplasmas, incluidos tamaños poblacionales pequeños, asexualidad, un sesgo mutacional que favorece las eliminaciones frente a las inserciones, un entorno de crecimiento metabólicamente rico y, por último, la ausencia de flujo del genoma de otras fuentes debido tanto el ambiente intracelular restringido como la incapacidad de incorporar ADN extraño por recombinación (Bai *et al.*, 2006). A pesar de que los fitoplasmas están sujetos a la mayoría de estos factores, no están restringidos a un único insecto y las poblaciones pueden consistir en múltiples variantes de

phytoplasmas inside the insect may take ten days or more, depending on the group, the species of the insect, and temperature (Sugio and Hogenhout, 2012). Considering that there is evidence that some phytoplasmas are transmitted vertically in their vector insects (Weintraub and Bealand, 2006), the most effective means of survival is by this way. The insects that can be vectors of these pathogens belong mainly to the families of Cicadellidae, Fulgoridae and Psilidae in smaller numbers. (Weintraub and Bealand, 2006).

So far there are four phytoplasma genomes completely sequenced, including the causal agent of Aster yellows (*Candidatus Phytoplasma asteris*), which has a wide range of hosts and is transmitted by different polyphagous insects. Several factors contribute to the reduction of the phytoplasma genome, including small population sizes, asexuality, a mutational bias that favors eliminations over insertions, an environment metabolically rich of growth, and finally, the absence of a flow of the genome from other sources, due both to the restricted intracellular environment as well as the inability to incorporate foreign DNA by recombination (Bai *et al.*, 2006). Although the phytoplasmas are subjected to most of these factors, they are not restricted to a single insect, and populations can consist of multiple phytoplasma variants (Weintraub and Bealand 2006). In particular, the phytoplasmas that colonize many plants and insects are more prone to find other phytoplasmas and organisms that constitute sources for the acquisition of genetic elements.

Due to the economic importance of these pathogens and to the scarce knowledge on vector insect species in Mexico, it is necessary to know weeds and/or ornamental plants with the potential of becoming reservoirs of these pathogens and contribute to the knowledge on them. Therefore, the aim of this investigation was to identify the phytoplasma that induces phyllody in daisy plants (*Dimorphotheca sinuata*).

fitoplasma (Weintraub y Bealand 2006). En particular, los fitoplasmas que colonizan muchas plantas e insectos son más propensos a encontrar otros fitoplasmas y organismos que constituyen fuentes para la adquisición de elementos genéticos.

Debido a la importancia económica de estos patógenos y al poco conocimiento que se tiene de las especies de insectos vectores en México, es necesario conocer las plantas arvenses y/u ornamentales con potencial para ser reservorios de estos patógenos y contribuir a su conocimiento. Por lo que la presente investigación tuvo como objetivo, identificar el fitoplasma asociado a la filodia en margarita (*Dimorphotheca sinuata*).

**Extracción de ADN.** Se realizó a partir de hojas en cinco plantas con síntomas de filodia, (Figura 1), la toma de muestras fue dirigida a plantas que presentaban este síntoma; así como de dos plantas asintomáticas como testigo. El método que se utilizó para la extracción de ADN fue el reportado por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones.

**Detección de fitoplasmas por PCR.** Se realizó PCR anidada con los iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Kirkpatrick *et al.*, 1994) para fitoplasmas que amplifican un fragmento de 1800 pb (primera amplificación) en un volumen final de 25 µL que contenía: 1 X de amortiguador para PCR (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 10 pmol de cada iniciador (Sigma-Aldrich®), 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen®) y 100 ng de ADN molde. La amplificación fue realizada en un termociclador Techne®. TC-300 con el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 3 min con una extensión final de 72 °C por 5 min. La segunda amplificación (anidada) se

**DNA extraction.** DNA was extracted from leaves in five plants with symptoms of phyllody, (Figure 1); as well as from two asymptomatic plants as a control. The method used for the extraction of DNA was the reported by Dellaporta *et al.* (1983) with some modifications.

**Detection of phytoplasmas by PCR.** Nested PCR was carried out using universal primers P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Kirkpatrick *et al.*, 1994) for phytoplasmas that amplify a fragment of 1800 pb (first amplification) in a final volume of 25 µL that contained 1 X of PCR buffer (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM of every dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 10 pmol of each primer (Sigma-Aldrich®), 1 U of DNA (Invitrogen®) and 100 ng of DNA template. The amplification polymerase was carried out in a Techne® thermocycler TC-300 with the following program: denaturalization at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, 72 °C for 3 min with a final extension of 72 °C for 5 min. The second amplification (nested) was carried out using primers R16F2n / R16R2 (Gundersen and Lee, 1996) that amplify a fragment of 1200 pb of the region 16S rADN of the phytoplasmas. As a template DNA, we used the amplified product of the first reaction of PCR diluted in sterile water, free of nucleases (1:20) using the same concentrations and reactants than in direct amplification, with the following program: denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 58 °C for 2 min, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

**Sequencing and phylogenetic analysis.** The product obtained from PCR was purified and sequenced (Macrogen Inc. Korea) in both directions. The sequences obtained were analyzed, deposited and compared with those included in the

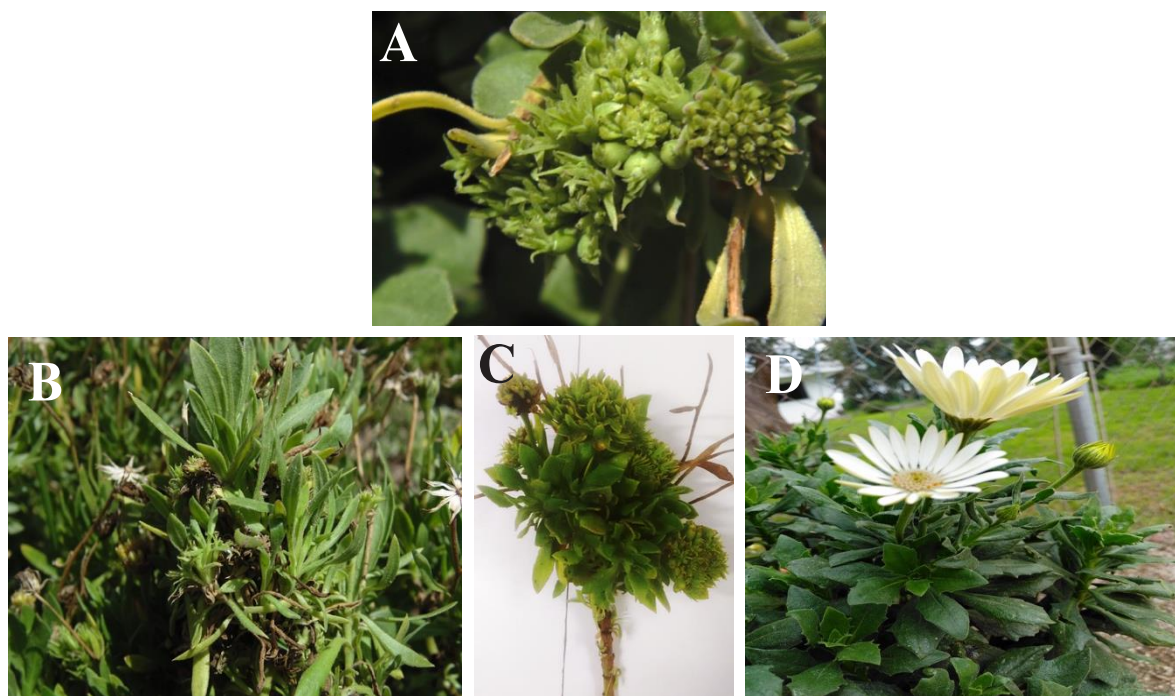


Figura 1. A-C. Plantas de margarita exhibiendo síntomas de filodia y proliferación de brotes, (D) planta asintomática.  
Figure 1. A-C. Daisy plants showing symptoms of phyllody and proliferation of sprouts, (D) asymptomatic plants.

realizó con los iniciadores R16F2n / R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican un fragmento de 1200 pb de la región 16S rADN de los fitoplasmas. Como ADN molde se utilizó el producto amplificado de la primera reacción de PCR diluido en agua estéril libre de nucleasas (1:20) usando las mismas concentraciones y reactivos que en la amplificación directa, con el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 2 min, 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

**Secuenciación y análisis filogenético.** El producto obtenido de PCR se purificó y secuenció (Macrogen Inc. Corea) en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se analizaron, depositaron y compararon en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2016)

National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using the BLAST. With the sequence obtained, we carried out a tool phylogenetic analysis with other species of phytoplasmas (Figure 3).

In all samples with symptoms, we obtained the expected fragment of 1200 pb for phytoplasmas (Figura 2A). The sequences obtained (Access No. MK278895 and MK278896) had a similarity of 99% with *Candidatus* Phytoplasma asteris group 16srI-B obtained from *Vitis vinifera* in Iran (MH638316.1). The analysis of RFLP *in vitro* (Figure 2B) indicated that the phytoplasma of this study belongs to the group of the Aster yellow, now recognized as *Candidatus* Phytoplasma asteris.

The use of restriction enzymes to identify groups of phytoplasmas are still useful, since the electrophoretic profiles generated by each of the



(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando la herramienta BLAST. Con la secuencia obtenida se realizó un análisis filogenético con otras especies de fitoplasmas (Figura 3).

En todas las muestras con síntomas se obtuvo el fragmento esperado de 1200 pb para fitoplasmas (Figura 2A). Las secuencias obtenidas (No. acceso MK278895 y MK278896) tuvieron 99% de similitud con *Candidatus Phytoplasma asteris* grupo 16srI-B obtenido de *Vitis vinifera* en Irán (MH638316.1). El análisis de RFLP *in vitro* (Figura 2B) indicó que el fitoplasma de este estudio pertenece al grupo del amarillamiento del áster, reconocido ahora como *Candidatus Phytoplasma asteris*.

El uso de enzimas de restricción para identificar grupos de fitoplasmas siguen siendo útiles ya que los perfiles electroforéticos que genera cada una de las enzimas son un indicativo de la variación presente en su genoma por lo que estos patrones se convierten en una huella genética. En la mayoría de las investigaciones, las enzimas que más se utilizan con este propósito son *MseI* (*Tru 91*), *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII* y *HpaIII* (De Oliveira *et al.*, 2011). Los fitoplasmas del amarillamiento del áster constituyen un grupo cosmopolita que se encuentra en la mayoría de las plantas en condiciones naturales, debido a su plasticidad para adaptarse a muchos hospedantes, por lo que pueden llegar a constituirse eventualmente en un serio problema (Lee *et al.*, 2000). Se conoce que la mayoría de los síntomas que inducen los fitoplasmas son los mismos en diferentes especies y que en un cultivo o en una planta se puede encontrar más de un fitoplasma. Debido a que la sintomatología es la misma, se puede hacer caso omiso del potencial infectivo que puedan tener algunos de ellos y diseminarse a cultivos de interés agronómico y, por lo tanto, causar un problema económico. En México la mayoría de los estudios están enfocados en la detección de

enzymes are an indicator of the variation present in their genome, and therefore these patterns become a genetic footprint. In many investigations, the enzymes most used for this purpose are *MseI* (*Tru 91*), *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII* and *HpaIII* (De Oliveira *et al.*, 2011). The phytoplasmas of the Aster yellow constitute a cosmopolitan group that is found in most plants in natural conditions, due to its plasticity to adapt to many hosts, and they can therefore eventually become a serious problem (Lee *et al.*, 2000). Most symptoms induced by phytoplasmas are known to be the same in different species, and that a crop or a single plant may contain more than one phytoplasma. Because the symptomatology is the same, one may ignore the infectious potential of some may have and disseminate to crops of agronomical interest, leading to a possible economic problem. In Mexico, most studies are focused on detecting these pathogens, and in a few cases, such as the lethal yellowing of palm, work has been done with genetic breeding and replacements of material in areas seriously affected by the disease. Another disease of economic impact in a field caused by a phytoplasma is the thickening of the cladodes of prickly pear, since it reduces considerably the production of prickly pears in all production areas (Suaste *et al.*, 2012). In recent years, the presence of phytoplasmas has been observed in ornamental plants introduced into Mexico (Rojas *et al.*, 2017), since they showing abundant proliferations, and in some cases, green flowers that consumers find very attractive; this situation may favor the appearance of emerging diseases. On the other hand, the literature indicates that symptoms may appear one week after the inoculation of the phytoplasma; however, this depends on the temperature conditions and the plant species. The severity of the symptoms varies according to the age of the plant, the isolate of phytoplasma and

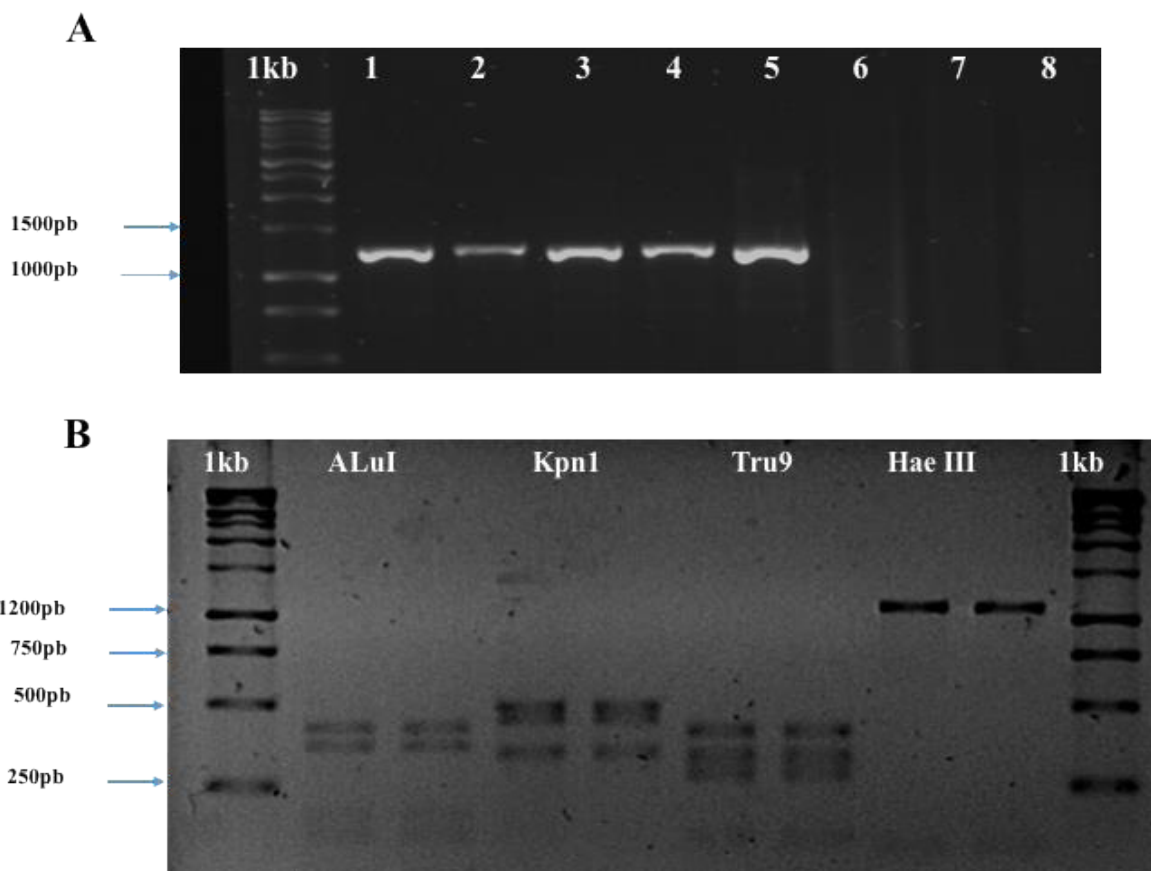
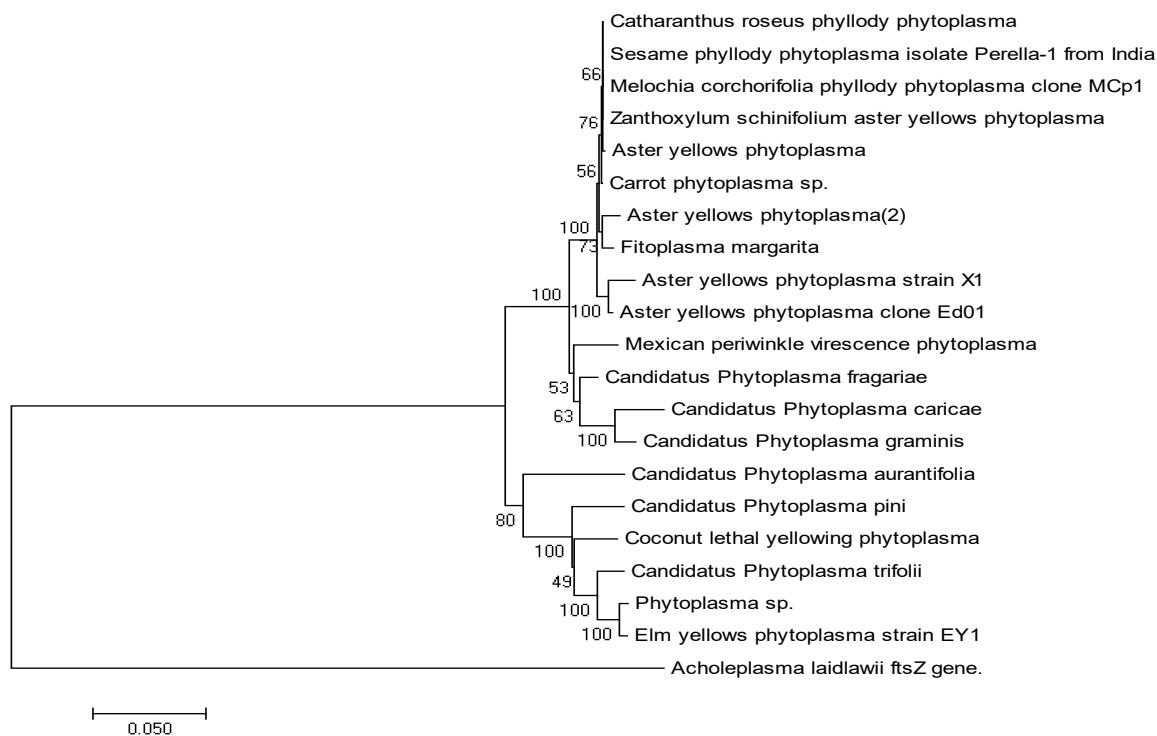


Figura 2. (A) Productos de PCR obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2. Gel de agarosa al 1%. Carril 1-5, muestras de margarita con síntomas de filodia; Carril 6 y 7, muestras asintomáticas; Carril 8, Control negativo (agua); Carril 1kb, Marcador molecular 1kb (Promega®). (B) Digestión de los productos de PCR anidada con enzimas de restricción. Carril 1 y 10 Marcador 1kb (Promega®), Carril 2 y 3 producto de digestión de la enzima *AluI*; Carril 4 y 5 digestión con la enzima *KpnI*; Carril 6 y 7 producto de la digestión con la enzima *Tru9I*; Carril 8 y 9 productos de digestión con la enzima *Hae III*.

Figure 2. (A) Products of PCR obtained with primers R16F2n/R16R2. Agarose gel at 1%. Lanes 1-5, samples of daisies with symptoms of phyllody; Lanes 6 y 7, asymptomatic samples; Lane 8, Negative control (water); Lane 1kb, molecular marker 1kb (Promega®). (B) Digestion of the PCR products with restriction enzymes. Lanes 1 and 10 marker 1kb (Promega®), Lanes 2 and 3 product of digestion with *AluI*; Lanes 4 and 5 digestion with *KpnI*; Lanes 6 and 7 product of the digestion with *Tru9I*; Lanes 8 and 9 products of the digestion with *Hae III*.

estos patógenos y, en pocos casos como el amarillamiento letal del cocotero, se ha trabajado con mejoramiento genético y reemplazo de material en las zonas seriamente afectadas debido al impacto de la enfermedad. Otra enfermedad de impacto económico en un cultivo ocasionada por un fitoplasma es el engrosamiento del cladodio del nopal al reducir

the time of infection (Weintraub and Bealand 2006). Likewise, the phytoplasma is occasionally detected in symptomatic plants that presented no alteration in its period of development (Rojas *et al.*, 1999). Some phytoplasmas are acquired and transmitted exclusively by one species of insects; however, others are transmitted by different insect



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en el DNA ribosomal 16S de secuencias de fitoplasmas, los cuales están disponible en el NCBI. Se consideró como raíz *Acholeplasma laidlawii* micoplasma que puede cultivarse *in vitro* y que genéticamente no está relacionado con fitoplasmas. El árbol se construyó con p CLUSTAL\_X por el método de neighbour-joining con 500 repeticiones.

**Figure 3.** Phylogenetic tree based on ribosomal DNA 16S of phytoplasma sequences available in the NCBI. *Acholeplasma laidlawii*, a that can be cultivated *in vitro* and that is not genetically related to phytoplasmas data base, was considered as a root. The tree was created using p CLUSTAL\_X with the neighbor-joining method with 500 repetitions.

de manera considerable la producción de tuna en todas las zonas productoras (Suaste *et al.*, 2012). En los últimos años se ha observado la presencia de fitoplasmas en plantas de ornato que se introducen a nuestro país (Rojas *et al.*, 2017) debido a que exhiben abundantes proliferaciones y, en algunas ocasiones, flores verdes que resultan muy llamativas para los consumidores; esta situación puede favorecer la aparición de enfermedades emergentes. Por otro lado, la literatura indica que los síntomas pueden aparecer una semana después de la inoculación del fitoplasma; sin embargo, esto depende de las condiciones de temperatura y de la especie

species. From an epidemiological point of view, the transmission of phytoplasmas by insects is particularly important if they are polyphagous, as in the case of cicadellids, which also constitute an important reservoir of these pathogens (Weintraub and Bealand 2006).

Phytoplasmas have a metabolically limited genome with moving elements that contain information to codify different effectors that are transcription factors that modulate diverse responses in the plant (Bai *et al.*, 2006). As a result of this, alterations such as witch's broom are produced, as well as changes in the structure and color of the

vegetal, la severidad de los síntomas varía según la edad de la planta, aislamiento de fitoplasma y el tiempo de infección (Weintraub y Bealand 2006). Asimismo, en ocasiones se detecta al fitoplasma en plantas con síntomas que en su periodo de desarrollo no exhibieron ninguna alteración (Rojas *et al.*, 1999), algunos fitoplasmas son adquiridos y transmitidos exclusivamente por una especie de insectos; sin embargo existen otros que son transmitidos por distintas especies. Desde el punto de vista epidemiológico la transmisión de fitoplasmas por insectos es particularmente importante si éstos son polívoros como es el caso de los cicadélidos quienes constituyen además un importante reservorio de estos patógenos (Weintraub y Bealand 2006).

Los fitoplasmas tienen un genoma metabólicamente limitado con elementos móviles que contienen información para codificar diferentes efectores que son factores de transcripción que modulan diversas respuestas en la planta (Bai *et al.*, 2006). Resultado de lo anterior, se originan alteraciones como la escoba de bruja; así como cambios en la estructura y color de las hojas o la supresión de la respuesta de defensa de la planta a los insectos vectores de estos patógenos (Cettul y Fierrao, 2011). Por último, es conveniente realizar investigación relacionada con los insectos que colonizan esta planta de ornato ya que se encuentra ampliamente distribuida en el país, particularmente aledaña a huertas de durazno, ciruela, nopal, haba, frijol y calabaza entre otros.

Con la detección de *Dimorphotheca sinuata* como un nuevo hospedante de *Candidatus Phytoplasma asteris* se amplía el conocimiento de la gama de hospedante alternos para este grupo de fitoplasmas y lo convierte en una fuente de inóculo potencial para otros cultivos de interés económico hospedantes de este fitoplasma, como lo son la avena donde el subgrupo 16SrI-B induce serios daños a este cultivo como, proliferación anormal

leaves or suppression in the defense response of the plant to vector insects of these pathogens (Cettul and Fierrao, 2011). Finally, it is worth investigating insects that colonize this ornamental plant, since it is widely distributed in Mexico, particularly adjacent to peach, plum, cactus, broadbean, bean and pumpkin crops, among others.

With the detection of *Dimorphotheca sinuata* as a new host of *Candidatus Phytoplasma asteris*, the knowledge on the range of alternate hosts for this group of phytoplasmas broadens, and turns it into a potential source of inoculant for other crops of economic interest that host this phytoplasma, such as oat, where the subgroup 16SrI-B induces serious damage to this crop consisting in an abnormal proliferation and yellowing and sterilization of spikes, delay in growth and the production of sterile seeds (Urbanavičienė *et al.*, 2006). In this ornamental species (*Dimorphotheca sinuata*), one phytoplasma belonging to group 16SrIX, causing phyllody, growth delay and virescence in Italy (Marcone *et al.*, 2001) had been reported.

The symptoms of phyllody and proliferation of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) were associated with *Candidatus Phytoplasma asteris*, phylogenetically related to group 16SrI-B. *Dimorphotheca sinuata* is reported, for the first time, as a new host for *Candidatus Phytoplasma asteris*.

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

y amarillamiento de espigas, estériles, retraso de crecimiento y producción de semillas estériles (Urbanavičienė *et al.*, 2006). En esta especie ornamental (*Dimorphotheca sinuata*), solo se tiene el reporte de un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIX, causando retraso de crecimiento, filodia y virescencia en Italia (Marcone *et al.*, 2001).

Los síntomas de filodia y proliferación de margarita (*Dimorphotheca sinuata*) se asociaron a la infección de *Candidatus Phytoplasma asteris*, relacionado filogenéticamente al grupo 16SrI-B. Se reporta por vez primera a *Dimorphotheca sinuata* como un nuevo hospedante de *Candidatus Phytoplasma asteris*.

## LITERATURA CITADA

- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Jancso RA, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A and Campbell JW. 2006 Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188:3682-3696. DOI:10.1128/JB.188.10.3682-3696.
- Cettul E and Firrao G. 2011. Development of phytoplasma-induced flower symptoms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 76:204-211. DOI:10.1016/j.pmpp.2011.09.001
- De Oliveira AP, Mello A, Eckstein B, Flores D, Fabretti KP and Bedendo IP. 2011. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61: 1454–1461. DOI: 10.1099/ijs.0.019141-0
- Deng SJ and Hiruki, C. 1991. Genetic relatedness between to non culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479. DOI: 10.1094/Phyto-81-1475
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report*. 1:19-21. DOI: 10.1007/BF02712670
- Gundersen DE and Lee I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 35:114-51. <https://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hogenhout SA and Segura-Music, M. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics-What have we learnt? pág. 19-36. eds P.G. Weintraub and P. Jones *In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* <http://ebookcentral.proquest.com/lib/colpos-ebooks/detail.action?docID=476509>
- Kirkpatrick B, Smart C, Gardner S, Gao JL, Ahrens U, Mäurer R, Schneider B, Lorenz, K-H, Seemüller E, Harrison N, Namba S and Daire X. 1994. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters* 3, 228– 9.
- Lee IM, Davis RE and Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54:221–255. DOI:org/10.1146/annurev.micro.
- Marcone C, Ragozzino A, Camele I, Rana GL, Seemüller E. 2001. Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 83, 133–138.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S and Ugaki M. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36:27-29. DOI: 10.1038/ng1277
- Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Trejo LC, and Azpiroz HR. 1999. Some physiological alterations in marigold (*Tagetes erecta* L.) plants infected by phytoplasmas. *Fitopatología*. 34:225--229. [https://www.researchgate.net/profile/Emma\\_Zavaleta-Mejia/publication/295073546\\_Some\\_physiological\\_alterations\\_in\\_marigold\\_Tagetes\\_erecta\\_L\\_plants\\_infected\\_by\\_phytoplasmas/links/56c6d15708ae0d3b1b6179eb/Some-physiological-alterations-in-marigold-Tagetes-erecta-L-plants-infected-by-phytoplasmas.pdf?origin=publication\\_list](https://www.researchgate.net/profile/Emma_Zavaleta-Mejia/publication/295073546_Some_physiological_alterations_in_marigold_Tagetes_erecta_L_plants_infected_by_phytoplasmas/links/56c6d15708ae0d3b1b6179eb/Some-physiological-alterations-in-marigold-Tagetes-erecta-L-plants-infected-by-phytoplasmas.pdf?origin=publication_list)
- Rojas-Martínez RI, Ochoa Martínez D L y Zavaleta Mejía E. 2013. Fitoplasmas y Ca. *Liberibacter* sp. en cultivos agrícolas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo de México. 56p. ISBN 978-607-715-138-8.
- Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E e Ing-Ming L. 2009. Identificación de un aislamiento del grupo 16SrIII *Candidatus Phytoplasma pruni* en plantas y semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* l.) en México. *Agrociencia*. 43:851-860.
- Suaste DA, Rojas MRI, Zavaleta ME y Pérez BD. 2012. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:72-80. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225129007>
- Sugio A and Hogenhout SA. 2012. The genome biology of phytoplasma: modulator of plant and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15:247–254. DOI:10.1016/j.mib.2012.04.002
- Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG and VanEtten J. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*. 171:6455–67. DOI:10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989.
- Weintraub P and Bealand A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111. DOI:10.1146/annurev.ento.51.110104.151039.
- Urbanavičienė L, Jomantienė R, Valiūnas D, Davis RE. 2007. Molecular identification of 16SrIA, 16SrI-B, 16SrI-C, and 16SrI-L subgroups of phytoplasmas in gramineous plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology* 60, 127–128.
- Marcone C, Ragozzino A, Camele I, Rana GL, Seemüller E. 2001. Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 83, 133–138.

# Etiology Strawberry dry wilt (*Fragaria* spp.) in Morelos, Mexico

## Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México

Daniel Bárcenas-Santana, Dagoberto Guillén-Sánchez\*, Cinthia Yazmín-Basaldua, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX) de la UAEM. Avenida Nicolás Bravo S/N, Parque industrial Cuautla, Ayala, Morelos; Margarita de Lorena Ramos-García, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición. Calle Iztaccihuatl S/N, Colonia Los Volcanes, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62350. México; Mairel Valle-de la Paz, Escuela Superior de Ciencias Naturales, UAGro, Avenida Universidad S/N, Ex Rancho El Shalako, Carretera Nacional Chilpancingo-Petaquillas, Guerrero, México. C.P. 39105. \*Autor para correspondencia: dagoguillen@yahoo.com

Recibido: 10 de Abril, 2019.

Aceptado: 03 de Agosto, 2019.

Bárcenas-Santana D, Guillén-Sánchez D, Yazmín-Basaldua C, Ramos-García ML and Valle-de la Paz M. 2019. Etiology Strawberry dry wilt (*Fragaria* spp.) in Morelos, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 454-463.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-5

Primera publicación DOI: 14 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 14, 2019.

**Resumen.** La producción de fresa se ha incrementado en México, por sus cualidades gustativas, nutritivas y por generar altos ingresos económicos, en Morelos la producción se ve afectada por la secadera de la fresa, enfermedad frecuente en este cultivo que causa importantes pérdidas por arriba del 50% de la producción. El objetivo de este trabajo fue identificar el agente causal de la secadera en fresa, realizar pruebas de patogenicidad a partir del aislado y comparar contra una cepa aislada ya identificada, evaluar métodos de inoculación y

**Abstract.** Strawberry production has increased in Mexico, due to its taste, nutrition and high economic income. In Morelos, the production is affected by the strawberry dry wilt, a frequent disease in this crop that causes significant losses above 50% the production. The objective of this work was to identify the causal agent of the strawberry drier, perform pathogenicity tests from the isolate and compare against an isolated strain already identified, evaluate inoculation methods and observe the damage to the roots for this purpose they were analyzed plants with typical symptoms of the disease from a commercial plot were analyzed from June 2018. The identification of the fungus was made by cultural and morphological characteristics and compared with a strain of *Fusarium oxysporum* from Celaya, Guanajuato. The results show that the causal agent of the strawberry drier in Morelos is *Fusarium oxysporum*. The pathogenicity tests showed the damage caused by this fungus in the crop and its direct involvement in the fresh and dry weight of the roots in the plants. The comparison

observar el daño en las raíces, para ello se analizaron plantas con síntomas típicos de la enfermedad provenientes de una parcela comercial a partir de junio de 2018. La identificación del hongo se hizo mediante características culturales y morfológicas, y se comparó con una cepa de *Fusarium oxysporum* proveniente de Celaya, Guanajuato. Los resultados demuestran que el agente causal de la secadera de la fresa en Morelos es *F. oxysporum* las pruebas de patogenicidad demostraron los daños causados por este hongo al cultivo y su implicación directa en el peso fresco y seco de las raíces en las plantas. La comparación entre medias no detectó diferencias significativas en el método de inoculación ni en las cepas evaluadas.

**Palabras clave:** Enfermedad, hongo, raíz, inoculación, infección, patogenicidad.

El fruto de la fresa (*Fragaria* spp.) es de los más consumidos a nivel mundial, debido a su alto contenido de flavonoides, antocianinas, compuestos fenólicos y vitaminas A y C (Cao *et al.*, 2011; Cano, 2013). Para la economía mexicana el cultivo de la fresa constituye una importante fuente de divisas; México se ubica como el tercer país de mayor exportación con 102,631 t anuales, seguido por España y Estados Unidos (FAOSTAT, 2016). En México a mediados del siglo pasado en el estado de Guanajuato y a partir de 1950 cobró mayor importancia por la creciente demanda de los Estados Unidos, lo que ocasionó que el cultivo se extendiera a otros estados como Michoacán y Baja California donde pasaron de cubrir las necesidades del mercado local y ser grandes productores de fresa en México (Ávila y González, 2012). A nivel nacional, la producción de fresa es exponencial, el año pasado se llegaron a cultivar 13,564 ha de la fruta con una producción de 611,780 t, de las cuales destacan los

between means did not detect significant differences in the method of inoculation and the strains evaluated.

**Key words:** Disease, fungus, root, inoculation, infection, pathogenicity.

Strawberries (*Fragaria* spp.) are one of the most widely consumed fruits in the world, due to their high contents of flavonoids, anthocyanins, phenolic compounds and vitamins A and C (Cao *et al.*, 2011; Cano, 2013). For the Mexican economy, cultivating strawberries is an important source of income; Mexico is the country with the third highest export, with 102,631 t a year, only after Spain and the United States (FAOSTAT, 2016). In Mexico, in the state of Guanajuato beginning in 1950, the crop became more important due to the increasing demand from the United States, which led it to expand to other states, such as Michoacán and Baja California, where they went from covering the needs of the local market to being large producers of strawberries in Mexico (Ávila and González, 2012). At a national level, strawberry production is exponential; last year, the fruit was planted in 13,564 ha, with a production of 611,780 t, with the most important states being Michoacán with 9,837 t, Baja California with 1,920 t and Guanajuato with 1,197 t (SIAP, 2018). The state of Morelos is beginning to plant more than 8 ha of the crop, although one of its main problems in the management of the diseases that affect it, which are mostly fungal, followed by some bacterial problems, nematodes and others caused by viruses (Martínez *et al.*, 2010).

Strawberry dry wilt is considered the most destructive disease for this crop, due to its incidence, distribution and difficult control, since it leads to the gradual death of the plant (Ceja *et al.*, 2008).

estados de Michoacán con 9,837 t, Baja California con 1,920 t y Guanajuato con 1,197 t (SIAP, 2018). En el estado de Morelos comienzan a destinarse más de 8 ha al cultivo, pero uno de los principales problemas es el manejo de las enfermedades que afectan a este y que en su gran mayoría son de carácter fungoso; seguido por algunos problemas bacterianos, nematodos y otros pocos ocasionados por virus (Martínez *et al.*, 2010).

La secadera de la fresa se considera la enfermedad más destructiva de este cultivo, debido a su incidencia, distribución y difícil control, ya que origina la muerte gradual de la planta (Ceja *et al.*, 2008). La enfermedad se ha asociado a varias especies de *Fusarium*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora* spp. (Castro y Dávalos, 1990; Quintero *et al.*, 1998). En la región central de México *Fusarium oxysporum* causa la enfermedad y es el hongo más frecuente porque ataca en etapas tempranas del cultivo y causa pérdidas mayores al 50% (Dávalos *et al.*, 1992). Sin embargo, en Guanajuato se han reportado a 14 especies de hongos y *F. oxysporum* es el más frecuente. A pesar de contar con estudios de la enfermedad en la zona central de México, en el estado de Morelos se tienen problemas de secadera de la fresa y no existen reportes del agente causal, de ahí la importancia de realizar la presente investigación con los objetivos de determinar el patógeno por medio de la identificación morfológica, así como realizar pruebas de patogenicidad y comparar con una especie reportada, evaluar métodos de inoculación y determinar los daños ocasionados en la raíz.

En septiembre de 2018, a partir de una selección al azar, fueron colectadas 50 muestras de tallos y raíces con síntomas de secadera en una plantación comercial de la variedad Alexandria, la más predominante, en diferentes etapas del cultivo, ubicada entre las coordenadas 18° 52' 59" Norte, 99° 4' 1" Oeste el predio Chapultepec, municipio de Yautepec,

The disease has been related with several species of *Fusarium*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora* spp. (Castro and Dávalos, 1990; Quintero *et al.*, 1998). In the central area of Mexico, *Fusarium oxysporum* causes the disease, and it is the most frequent fungus, because it attacks in early stages of the crop and it causes losses of above 50% (Dávalos *et al.*, 1992). However, in the state of Guanajuato, 14 species of fungi have been reported, and *F. oxysporum* is the most frequent. Despite having studies on the disease in central Mexico, in the state of Morelos there are problems with strawberry dry wilt, but no reports of the causal agent, hence the importance of this investigation, with the aims of determining the pathogen using morphological identification, as well as carrying out pathogenicity tests and comparing with a reported species, evaluating inoculation methods and determining the damage caused on the root.

In September 2018, using a random selection, 50 samples of stems and roots with symptoms of dry wilt were collected in a commercial plantation of the Alexandria variety, the most predominant, in different stages of the crop, located between coordinates 18° 52' 59" Norte, 99° 4' 1" West in the plot of Chapultepec, municipal area of Yautepec, Morelos. The samples were taken in an ice chest to the Phytopathology laboratory of the Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX). In order to isolate the causal agent, 50 fractions of affected tissue were taken: 0.5 cm<sup>2</sup> of roots and stems. They were disinfested with sodium hypochlorite at 1% for 3 minutes, followed by three washes with sterile distilled water and they were left to dry on sterile paper towels. They were planted in a Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated at a temperature of 25 °C for 7 days. After sporulating, monosporic cultures were carried out, and using the hypha tip technique they were moved to Petri dishes with PDA culture medium. The pathogen



Morelos. Las muestras se trasladaron en una hielera al laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX). Para aislar el agente causal se tomaron 50 fracciones de tejido afectado de 0.5 cm<sup>2</sup> de raíz y tallos. Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril tres veces y se dejaron secar sobre sanitas estériles. Se sembraron en medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a una temperatura de 25 °C por 7 días, una vez esporulados se realizaron cultivos monospóricos y por la técnica de punta de hifa se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA. La identificación del patógeno se realizó mediante la coloración de la colonia, tipo, tamaño y forma de las esporas y se usó como referencia los rasgos descritos por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006), para especies de este género y se comparó con aislados de la cepa (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ) de *F. oxysporum* obtenida del INIFAP y procedente del cultivo de fresa del municipio de Celaya, Guanajuato al presentar los mismos síntomas y las estructuras del patógeno descritos por Mariscal *et al.* (2017).

Para corroborar que el aislado, presente en 95% de las muestras, es el causante de la secadera de la fresa y evaluar su severidad, se realizó las pruebas de patogenicidad, para lo cual se incrementó el aislado del hongo en ocho matraces con 200 g de avena previamente saturada en agua durante 24 horas y esterilizada, en cuatro matraces con avena se colocó discos de PDA con crecimiento micelial del patógeno y en los cuatro matraces restantes se sembró la cepa comparativa de *F. oxysporum* (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ). Los ocho matraces se dejaron incubar a temperatura de 25 °C durante 15 días hasta que el patógeno invadió la avena. Para la inoculación del patógeno fueron tomadas 20 plantas provenientes de estolones de un vivero, se transplantaron en sustrato estéril y al mes de edad, se

was identified by coloring the colony, type, size and shape of the spores, and we used the features described by Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell (2006) for species of this genus and it was compared with isolations of the strain (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ) of *F. oxysporum* obtained from the INIFAP, originating from the municipality of Celaya, Guanajuato, since it presented the same symptoms and structures of the pathogen described by Mariscal *et al.* (2017).

In order to corroborate that the isolation, present in 95% of the samples, is the cause of the strawberry dry wilt, and to evaluate its severity, pathogenicity tests were carried out. For this, the isolation of the fungus was increased in eight flasks with 200 g of oat, previously saturated in water for 24 h and sterilized. In four flasks with oats, we placed PDA discs with mycelial growth of the pathogen and in the four remaining flasks, we planted the comparative strain of *F. oxysporum* (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ). The eight flasks were left to incubate at a temperature of 25°C for 15 days until the pathogen invaded the oat. For the inoculation of the pathogen, we took 20 plants from stolons from a greenhouse, which were grafted in a sterilized substrate, and after one month, they were inoculated using different methods, making up an experimental design totally at random with five treatments and four repetitions: T1= Inoculation of the root with infected oat (100 g plant<sup>-1</sup>) by the Morelos strain at the moment of grafting, T2= Inoculation of the root with infected oat (100 g plant<sup>-1</sup>) by the Celaya strain at the moment of grafting, T3=Immersion of the root a suspension of 1 x 10<sup>-6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> of the Morelos strain before grafting, T4= Immersion of the root in a suspension of 1 x 10<sup>-6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> of the Celaya strain before grafting and T5=Control (inoculation of the root with oat in the absence of the fungus). All plants were grafted into 10-inch plastic pots; they were added the substrate of peat moss +

inocularon bajo diferentes métodos, conformando un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones: T1= Inoculación de la raíz con avena infectada (100 g planta<sup>-1</sup>) por la cepa Morelos al momento del trasplante, T2= Inoculación de la raíz con avena infectada (100 g planta<sup>-1</sup>) por la cepa Celaya al momento del trasplante, T3=Inmersión de la raíz en una suspensión de  $1 \times 10^{-6}$  conidios mL<sup>-1</sup> de la cepa Morelos antes del trasplante, T4= Inmersión de la raíz en una suspensión de  $1 \times 10^{-6}$  conidios mL<sup>-1</sup> de la cepa Celaya antes del trasplante y T5=Testigo (inoculación de la raíz con avena sin presencia de hongo). Todas las plantas fueron trasplantadas a macetas de plástico de 10 pulgadas se les agregó el sustrato peat moss + lombricomposta en una relación 2:1 para dar las condiciones óptimas a la planta y se colocaron en un invernadero. Pasados los 30 días de la inoculación se realizó una evaluación del grado de severidad de la enfermedad en la totalidad de las plantas para lo cual se utilizó una escala arbitraria de cinco clases diseñada por los autores del presente estudio (Cuadro 1). Posteriormente se procedió a tomar muestras de raíz para reaislar al patógeno de cada tratamiento inoculado.

Se encontró variación en los síntomas presentados por las plantas en la parte aérea y se dedujo que algo similar pasaba en la raíz. Por ello, se procedió a analizar las raíces de cada planta que fueron lavadas para eliminar el suelo y posteriormente se determinó el peso fresco de las plantas en una báscula analítica de la marca Scout-Pro, México. Las mismas plantas fueron colocadas en bolsas de papel y se llevaron a la estufa de secado donde se mantuvieron por 24 horas a una temperatura de 80 °C para determinar su peso seco. Los datos de peso fresco y seco de las plantas se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el paquete de análisis estadístico SAS® versión 9 sobre Windows.

worm-compost in a ratio of 2:1 to give the plant the optimal conditions and they were then placed in a greenhouse. Thirty days after inoculation, an evaluation was carried out on the degree of severity of the disease in the entirety of the plants, and for this, we used an arbitrary scale of five types, designed by the authors of the present study (Table 1). Afterwards, root samples were taken to re-isolate the pathogen of each inoculated treatment.

Variation was found in the symptoms displayed by the plants in the aerial section, and we deduced that something similar was taking place in the root. Due to this, the roots of each plant were analyzed after washing to remove the soil from them, and next, the fresh weight of the plants was established using an analytical scale of the brand Scout-Pro, Mexico. The same plants were placed in paper bags and moved into a drying furnace, where they were kept for 24 hours at a temperature of 80 °C to establish their dry weight. The data for fresh and dry weights of the plants underwent an analysis of variance and Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ) using the statistical analysis package SAS® version 9 for Windows.

The Morelos isolation displayed chlamidospores of three cells that were observed in chain, as well as

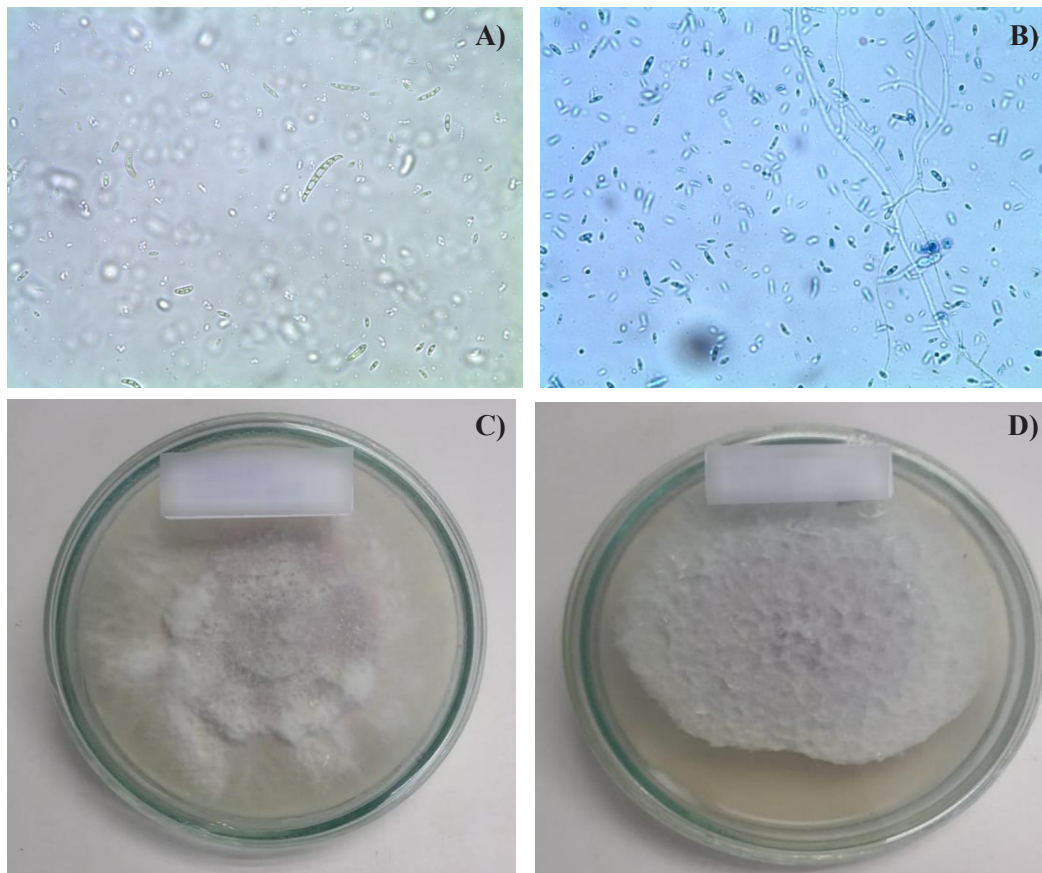
**Cuadro 1. Escala arbitraria de severidad utilizada para evaluar la secadera de la fresa causada por *Fusarium* spp. en Morelos.**

**Table 1. Arbitrary scale of severity used to evaluate strawberry dry wilt caused by *Fusarium* spp. in Morelos.**

| Nivel de la escala | Síntomas observados   |
|--------------------|---|
| 0                  | Planta sana   |
| 1                  | Enanismo y clorosis   |
| 2                  | Clorosis, marchitamiento del follaje y pudrición de la raíz               |
| 3                  | Necrosis interna del tallo, marchitamiento de hojas y pudrición de raíces |
| 4                  | Planta muerta   |

El aislado de Morelos presentó clamidiosporas de tres células que se observaron en cadena, así como la medición de 50 microconidios de forma oval con un tamaño promedio de 9.44  $\mu\text{m}$  de largo y 3.46  $\mu\text{m}$  de ancho, los macroconidios presentaron la célula basal en forma de pie y un tamaño promedio de 24.20  $\mu\text{m}$  de largo y 4.19  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1A y 1B). Estas estructuras coincidieron con las de la cepa comparativa de *Fusarium oxysporum* (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ) y ambas concordaron con las características descritas por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) para el género *Fusarium*. Con respecto a la coloración de la

the measurement of 50 oval-shaped microconidia with an average size of 9.44  $\mu\text{m}$  in length and 3.46  $\mu\text{m}$  wide. The macroconidia presented a foot-shaped basal cell and an average size of 24.20  $\mu\text{m}$  in length and 4.19  $\mu\text{m}$  wide (Figure 1A and 1B). These structures coincided with the comparative strain of *Fusarium oxysporum* (IFO 31180 (8)) (ATCCÒ) and both coincided with the characteristics described by Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell (2006) for the genus *Fusarium*. Regarding the coloring of the colony, both developed initially colored white and a cottonlike appearance, and as they expanded, they



**Figura 1.** Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*. A) microconidios y macroconidios de la cepa de Morelos, B) Microconidios de la cepa de Celaya, C) colonia de la cepa Morelos y D) colonia de la cepa Celaya.

**Figure 1.** Morphological characteristics of *Fusarium oxysporum*. A) microconidia and macroconidia of the Morelos strain, B) Microconidia of the Celaya strain, C) colony of the Morelos strain D) colony of the Celaya strain.

colonia ambas se desarrollaron en un principio de color blanco y apariencia algodonosa y conforme se fueron expandiendo se tornaron a un color lila, similares a las características descritas por Garcés *et al.* (2001) que obtuvieron cepas de *Fusarium* de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar (Figura 1 C y D).

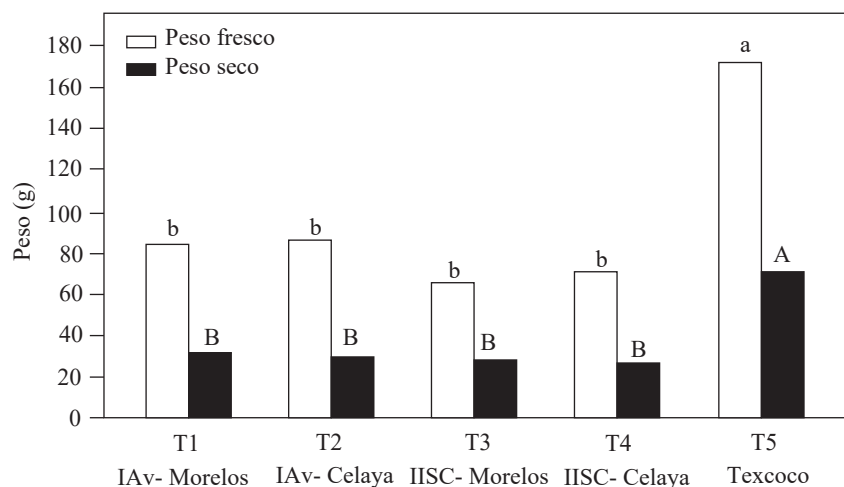
Los dos aislados de *Fusarium* que se utilizaron para inocular las plantas de fresa, tanto por aplicación de avena infectada directamente a la raíz, como por su inmersión en la suspensión de conidios, fueron patogénicos en un 100% a los 30 días de la inoculación donde la totalidad de las plantas infectadas mostró evidencias de daño ubicados en los niveles dos y tres de la escala de severidad del de la enfermedad. Las plantas de fresas inoculadas con ambos aislamientos de *Fusarium*, mostraron síntomas característicos de marchitez vascular, amarillamiento y resecaamiento del follaje. Se observó la disminución y necrosis de raíces en comparación con el testigo que no presentó ninguno de los síntomas típicos de la enfermedad. Estos resultados pueden sugerir el momento de mayor infección de la secadera dentro de la fenología del cultivo y por tanto pueden ser el punto de partida para el programa de control de la enfermedad. Resultados similares al de este estudio fueron obtenidos por Ceja *et al.* (2008), cuando el 100% de las plantas de fresa del cultivar Camarosa iniciaron los síntomas a los 23 días y se marchitaron 30 días después de la inoculación con *F. oxysporum*. Los hongos que causaron la enfermedad y que fueron reaislados y comparados morfológicamente con los inoculados presentaron coincidencia en sus características, cumpliéndose los postulados de Koch.

Los valores de peso fresco y seco de la planta evidenciaron el efecto negativo de la secadera de la fresa sobre el crecimiento del cultivo, tanto en

turned lilac, similar to the characteristics described by Garcés *et al.* (2001), which obtained strains of *Fusarium* with abundant aerial mycelia, cottonlike, with a variable color, from white to peachy-pink, but usually with a more intense purple or violet color on the surface of the agar (Figure 1 C and D). The two *Fusarium* isolations used to inoculate the strawberry plants, both by applying infected oat directly on the root and by its immersion in the suspension of conidia, were 100% pathogenic 30 days after inoculation, where all the infected plants displayed evidence of damage located in levels two and three in the scale of severity of the disease. The strawberry plants inoculated with both isolations of *Fusarium* displayed typical symptoms of vascular wilting, yellowing and drying of the foliage. Reduction and necrosis of roots was observed, in comparison with the control, which presented none of the typical symptoms of the disease. These results may suggest the moment of the greatest infection of dry wilt within the phenology of the crop, and may therefore be the starting point for the control program of the disease. Results similar to those of the present study were obtained by Ceja *et al.* (2008), when 100% of the strawberry plants from the Camarosa cultivar began showing symptoms after 23 days, and wilted 30 days after inoculation with *F. oxysporum*. The fungi that caused the disease and that were re-isolated and compared morphologically displayed coincidences in their characteristics, fulfilling Koch's postulates. The values for fresh weight and dry weight of the plant displayed the negative effect of strawberry dry wilt on the growth of the crop. Both for fresh and dry biomass, there were significant differences between T5 (control) and the treatments under inoculation with the pathogen. The fresh weight of the plants in T5 reached 168.8 g, whereas the weights of the plants in the inoculated treatments (T1, T2, T3 and T4) went no higher than 81.23 g

la biomasa fresca como en la seca existieron diferencias significativas entre el T5 (testigo) y los tratamientos sometidos a la inoculación con el patógeno, el peso fresco de las plantas del T5 alcanzó 168.8 g, mientras que el peso de las plantas de los tratamientos inoculados (T1, T2, T3 y T4) no superó los 81.23 g y la apariencia de la raíz fue completamente necrosada, similar resultado se obtuvo para la biomasa seca, el T5 mostró el mayor peso seco con 65.88 g y el resto de los tratamientos solo llegó a alcanzar los 26.73 g. El aislado de la cepa *F. oxysporum* de Morelos mostró iguales efectos que la cepa de *F. oxysporum* de Celaya en el peso fresco y seco de la planta, tampoco hubo diferencias significativas en estos parámetros con el empleo de uno u otro método de inoculación lo que confirmó la efectividad de ambos métodos (Figura 2). Estos resultados confirman que las plantas infectadas por *Fusarium* muestran crecimiento lento y la producción de biomasa se reduce significativamente; *F. oxysporum* causa clorosis, epinastia,

and the root appeared completely necrotized. A similar result was obtained for dry biomass; T5 displayed the greatest dry weight with 65.88 g and the remaining treatments only reached 26.73 g. The isolation of the Morelos *F. oxysporum* strain showed the same effects than the Celaya *F. oxysporum* strain for fresh and dry weight of the plant. There were no significant differences in these parameters with the use of one or other method of inoculation, either, which confirmed the effectiveness of both methods (Figure 2). These results confirm that the plants infected by *Fusarium* display a slow growth and the production of biomass is reduced significantly; *F. oxysporum* causes chlorosis, epinasty, defoliation and wilting due to damage in the vascular system of the host. Wilting takes place as a consequence of the obstruction of the plant's vascular system due to the production of spores; the destruction of the vascular system due to the action of enzymes; the production of toxins, phenols and polysaccharides by the fungus, and the



**Figura 2.** Efecto de la inoculación de las cepas de *F. oxysporum* sobre el peso fresco y peso seco de la planta. IAv: Inoculación de avena. IISC: Inoculación por inmersión en suspensión de conidios. Letras distintas para una misma variable difieren por Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Effect of the inoculation of the strain of *F. oxysporum* on the fresh weight and the dry weight of the plant. IAv: Inoculation of oat. IISC: Inoculation by immersion in a suspension of conidia. Different letters for a same variable differ by Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

defoliación y marchitamiento debido al daño al sistema vascular del hospedante. El marchitamiento ocurre como consecuencia de la obstrucción del sistema vascular de la planta por la producción de esporas; la destrucción del sistema vascular por acción de enzimas; la producción de toxinas, fenoles y polisacáridos por parte del hongo y el efecto de la formación de tilosas (Agrios, 1997). En casos de severas infecciones las plantas mueren tres y cuatro semanas después de la infección (Lira y Mayek, 2006). Sin embargo, en el presente estudio los síntomas no fueron muy severos en algunas plantas debido a que la planta generó raíces aun cuando la infección fue severa.

Se concluye que las características morfológicas de la cepa aislada de Morelos evidencia a *F. oxysporum* como el agente causal de la secadera de la fresa, las pruebas de patogenicidad mostraron a este hongo como el responsable de los síntomas de marchitez vascular, amarillamiento y necrosis de las raíces, así como disminución de la biomasa fresca y seca de las plantas de fresa. Estos resultados marcan pauta para dirigir un control y para futuras investigaciones dirigidas a la búsqueda de identificación molecular y las relaciones genéticas y patogénicas de sus poblaciones.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 1997. Plant pathology. 4th edition. Academic Press. New York, USA. 635 p.
- Ávila A y González J. 2012. La competitividad de las fresas (*Fragaria* spp.) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. Agricultura, sociedad y desarrollo 9: 17-27. <http://www.scielo.org.mx/pdf/asd/v9n1/v9n1a2.pdf>
- Cano MA. 2013. Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). Revista colombiana de ciencias hortícolas 7: 263-276. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2013v7i2.2240>
- Cao S, Hu Z, Zheng Y, Yang Z and Lu B. 2011. Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. Food Chemistry 125: 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.051>

effect of the formation of tyloses (Agrios, 1997). In cases of severe infections, plants die three and four weeks after infection (Lira and Mayek, 2006). However, in the present study, symptoms were not very severe in some plants, since the plant grew roots, although the infection was severe.

We conclude that the morphological characteristics of the isolated Morelos strain displays *F. oxysporum* as the causal agent of dry wilt in strawberry. Pathogenicity tests pointed at this fungus as the cause of the symptoms of vascular wilting, yellowing and root necrosis, as well as the reduction in fresh and dry biomass in strawberry plants. These results set the standards to guiding a control and for future investigations aimed at the search for molecular identification and the genetic and pathogenic relations of their populations.

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

- Castro FJ y Dávalos G. 1990. Etiología de "la secadera" o pudrición de la raíz y corona de la fresa en Irapuato, Guanajuato. Revista Mexicana de Fitopatología 8: 80-86. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1806-1>
- Ceja LF, Mora G, Téliz D, Mora A, Sánchez P, Muñoz C, Tlapal B y De La Torre R. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. Agrociencia 42: 451-461. <https://doi.org/10.4995/thesis/10251/4326>
- Dávalos GP, Castro F, Redondo J, Rodríguez G, Díaz C y Arévalo A. 1992. Guía para cultivar fresa en Irapuato. INIFAP-CIAPSARH. Folleto para productores No. 1. D. F. México, 52 p.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. <http://faostat.fao.org/site/535/default.aspx#ancor> (Consulta, febrero 2019).
- Garcés E, Orozco M, Bautista G, Valencia H. 2001. *Fusarium oxysporum*. El hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana 6:7-25. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462/pdf>
- Lira K y Mayek N. 2006. Potencial Osmótico Variable en el Crecimiento *in vitro* y la Patogenicidad en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de *Fusarium* spp. Revista Mexicana de Fitopatología 24: 88-97. <https://www.redalyc.org/html/612/61224202/>
- Leslie FJ and Summerell B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First Edition. Blackwell Publishing. Manhattan, USA. 388 p.

- Martínez F, Castillo S, Carmona E and Avilés M. 2010. Dissemination of *Phytophthora cactorum*, cause of crown rot in strawberry, in open and closed soilless growing systems and the potential for control using slow sand filtration. *Scientia Horticulture* 125:756-760. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.010>
- Mariscal LA, Rivera A, Davalos PA y Avila D. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*.51:673-681. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00673-en.pdf>
- Nelson E, Toussoun W and Marasas O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- Quintero JR, García RS, Montoya S y Estrada F. 1998. Etiología de las enfermedades del cultivo de la fresa (*Fragaria* spp.) en Sinaloa. Memorias del XXV Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato. 84 p.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. (Consulta, febrero 2019).

# Distribution, incidence and severity of the dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico

## Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México

**Mairel Valle-De la Paz**, Escuela Superior de Ciencias Naturales, UAGro, Avenida Universidad S/N, Ex Rancho El Shalako, Carretera Nacional Chilpancingo-Petaquillas, Guerrero, México. C.P. 39105; **Dagoberto Guillén-Sánchez\***, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX), UAEM, Av. Nicolás Bravo S/N, Parque industrial Cuautla, Ayala, Morelos; **Daniel Perales-Rosas**, **Víctor López-Martínez**, **Porfirio Juárez-López**, Facultad de Ciencias Agropecuarias. UAEM. Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209; **Edgar Martínez-Fernández**, CIB, UAEM, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209; **Marianguadalupe Hernández-Arenas**, INIFAP, C. E. - Zacatepec, Carretera Zacatepec-Galeana Km 0.5, Zacatepec, Morelos, México; **Rafael Ariza-Flores**, INIFAP, C. E. - Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan Km 2.5, Tuxpan, Iguala de la Independencia, Guerrero, México C.P. 40000; **Adriana Rosalía Gijón-Hernández**, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales-INIFAP, Coyoacán. CDMX.\*Autor para correspondencia: dagoguillen@yahoo.com.

Recibido: 14 de Abril, 2019.

Aceptado: 13 de Agosto, 2019.

Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Perales-Rosas D, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M, Ariza-Flores R and Gijón-Hernán AR. 2019. Distribution, incidence and severity of dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 464-478.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-7

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 30, 2019.

**Resumen.** Se determinó la distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa (*Citrus latifolia*) en 46 huertos de seis años de edad, 25 árboles por huerto en los municipios de Amacuzac (7 huertos), Ayala

**Abstract.** The distribution, incidence and severity damage caused by the dieback complex (*Lasiodiplodia* spp.) in Persian lime (*Citrus latifolia*) was determined in 46 orchards of six average years old, 25 trees per orchard in the municipalities of Amacuzac, Ayala, Coatlan del Rio, Cuautla, Jantetelco, Jonacatepec, Puente de Ixtla, Tepalcingo and Tlaltizapan of Zapata, Morelos State, Mexico. Incidence was evaluated according to the number of plants having symptoms of dieback. There were four levels of severity, where 0= healthy tree, 1= gum exudation, 2= cracking with exposure of internal tissue and 3= well-defined canker and branch dieback. Which were transformed to a percentage of means of a scale of three levels of severity, transforming to a percentage of infection using the Townsend and



(4), Coatlán del Río (9), Cuautla (1), Jantetelco (5), Jonacatepec (1), Puente de Ixtla (5), Tepalcingo (3) y Tlaltizapán de Zapata (11), del estado de Morelos, México. La incidencia fue determinada con base al número de plantas enfermas y la severidad mediante escala de daño de cuatro clases: 0= árbol sano, 1= exudación de goma, 2= agrietamiento con exposición de tejidos internos y 3= cancro bien definido y muerte descendente de ramas. La severidad fue transformada a porcentaje de infección con la fórmula de Townsend y Heuberger, analizados por Kruskal Wallis y separados por la comparación de medias, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y  $p<0.0001$  en incidencia y severidad. La enfermedad se registró en el 78% de los huertos, con incidencias de 31.8 a 100% y severidades de 30.0 al 100%. Los huertos con menor incidencia y severidad fueron los ubicados en Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río y Tlaltizapán de Zapata.

**Palabras clave:** *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Citrus latifolia*.

México ocupa el segundo lugar y participa con el 21% de la producción en el mundo de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y lima persa (*Citrus latifolia*), con una producción de 627.4 miles de t (FAOSFAT, 2018), donde el 70% del total se destina al mercado nacional y el resto al mercado de exportación, principalmente a los Estados Unidos de América. En el 2016 se tuvo una producción de 2'439,477 t de lima persa, destacando Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) y Oaxaca (263,448 t); Morelos ocupa el doceavo lugar con una producción de 3,880 t y actualmente cuenta con 612 ha plantadas en 17 municipios, donde destaca el limón (32%) y la naranja Valencia (66%) de la superficie total establecida y, un rendimiento de 12.1 y 7.7 t ha<sup>-1</sup> respectivamente (SIAP, 2018).

Heuberger equation. Data were analyzed through the Kruskal Wallis test and Tukey ( $\alpha=0.05$ ) and  $p<0.0001$  in incidence and severity. There was a high incidence of dieback on stems 78% of Persian lime trees. The incidence and severity of dieback of Persian trees on different orchards had a range of 31.8 to 100% and 30 to 100%, respectively. By the other hand, municipalities such as Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río and Tlaltizapán, had the lowest levels of incidence and severity of dieback.

**Key words:** *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Citrus latifolia*.

Mexico ranks second in Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) and Persian lime (*Citrus latifolia*) production and accounts for 21% of production worldwide with 627.4 thousand tons (FAOSFAT, 2018), from which 70% of the total production is used to supply the national market and the rest is exported mainly to United States. In 2016, Mexico produced 2'439,477 ton of Persian lime mostly in the states of Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) and Oaxaca (263,448 t); Morelos is in twelfth place with 3,880 ton and currently has 612 ha sown to citrus in 17 municipalities, where lemon (32%) and Valencia orange (66%) prevail on the established area and yield 12.1 and 7.7 ton ha<sup>-1</sup>, respectively (SIAP, 2018).

However, Persian lime trees are affected by fungal diseases that infect roots, trunk, foliage and fruits, and cause production losses (Christensen, 2017). In Morelos, it was thought that the death of trees was caused by gummosis (*Phytophthora parasitica*), since it had been reported in the states of Colima and Tabasco, where symptoms of gum secretion and rot of the foot caused the death of ungrafted and grafted rootstock citrus trees and, consequently, the elimination of orchards (Acosta-

No obstante, los árboles de lima persa presentan enfermedades fungosas en raíces, tronco, follaje y frutos, que causan pérdidas al cultivo (Christensen, 2017). En Morelos se asumía que la muerte de árboles era ocasionada por la gomosis (*Phytophthora parasitica*), debido a que fue reportada en los estados de Colima y Tabasco, causando síntomas de secreción de goma y pudrición del pie, llegando a ocasionar la muerte de árboles de cítricos de pie franco e injertado, provocando la eliminación de huertas (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales 1982). No obstante, existen varios géneros de hongos de la familia Botryosphaeriaceae considerados como patógenos endófitos muy agresivos, que a menudo matan gran parte de su hospedante después del daño físico, generalmente cuando se encuentra en estrés, otros síntomas que causan son manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte descendente, gomosis, canchales perennes y finalmente la muerte en especies económicamente importantes de cultivos perennes leñosas y plantas ornamentales, así como especies de árboles forestales nativas e introducidas (Mohali *et al.*, 2007; Slippers and Wingfield, 2007).

Estudios recientes citan a especies del género *Lasiodiplodia* causando enfermedades en el trópico en cultivos importantes como cacao (*Theobroma cacao*), aguacate (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*), caucho (*Hevea brasiliensis*), chirimoya (*Annona cherimola*), durazno (*Prunus persica*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), uvas (*Vitis vinifera*) y cítricos (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Valle-De la Paz *et al.* (2019) reportan la presencia de al menos tres especies del género *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*), causando gomosis, muerte descendente de ramas y la muerte de árboles de lima persa en Morelos. Sin embargo, se desconoce la distribución e impacto de estos patógenos en huertas comerciales de lima persa en la entidad. Por lo tanto, el ob-

Pérez *et al.*, 2012; Vidales 1982). However, there are several fungi genera of the Botryosphaeriaceae family that are considered to be very aggressive endophyte pathogens that often kill most of their host after causing physical damage, usually when under stress; another symptoms are foliar spots, fruit rot, dieback, gummosis, perennial canker and, finally, the death of economically important species of woody perennial crops and ornamental plants, as well as species of native and introduced forest trees (Mohali *et al.*, 2007; Slippers and Wingfield, 2007).

Recent studies cite species of *Lasiodiplodia* genus in the tropic that cause diseases in important crops such as cocoa (*Theobroma cacao*), avocado (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*), natural rubber (*Hevea brasiliensis*), chirimoya (*Annona cherimola*), peach (*Prunus persica*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), grape (*Vitis vinifera*) and citrus (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Valle-De la Paz *et al.* (2019) reported the presence of at least three species of *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* and *L. pseudotheobromae*) genus that cause gummosis, dieback of branches and the death of Persian lime trees in Morelos. However, the distribution and impact of these pathogens in lime commercial crops in Morelos is unknown. Therefore, the objective of this study was to determine the distribution, the incidence and the severity of dieback caused by the complex of *Lasiodiplodia* spp. in Persian lime orchards in Morelos.

Samples were collected in 46 Persian lime orchards from September 2014 to August 2015 (Figure 1). In order to identify the species, according to Valle-De la Paz *et al.* (2019), 46 samples were taken from primary and secondary branches, as well as from trunks showing disease symptoms; the 15 monosporic isolates obtained from the samples were re-sown in V8-Agar medium. The

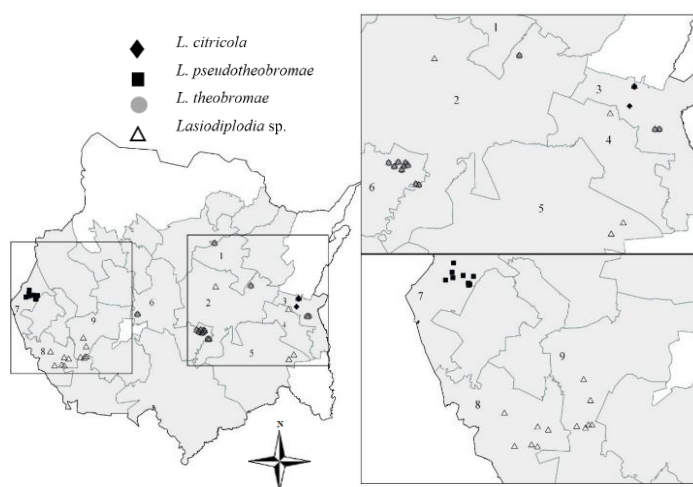
jetivo fue determinar la distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente ocasionada por el complejo de especies de *Lasiodiplodia* spp., en plantaciones de lima persa en Morelos.

Se realizó un muestreo en 46 huertos de lima persa en el período de septiembre de 2014 a agosto del 2015 (Figura 1). Para la identificación de las especies por Valle-De la Paz *et al.* (2019) se tomaron 46 muestras de ramas primarias, secundarias y troncos con síntomas de la enfermedad, de los que se obtuvieron 15 aislamientos monospóricos, los cuales fueron resembrados en medio V8-Agar. La identificación morfológica a nivel de género se realizó con claves y descripciones taxonómicas de Phillips *et al.* (2013).

La identificación molecular se realizó a partir de ADN genómico (ADNg), obtenido de micelio por el método AP descrito por Sambrook y Russell (2012). Los cebadores empleados fueron ITS5 e ITS4 de los genes ribosomales (ADNr). El análisis de las

morphological identification at the genus level was achieved using the keys and taxonomic descriptions of Phillips *et al.* (2013).

The molecular identification was performed using genomic DNA (ADNg) from mycelium following the AP method described by Sambrook and Russell (2012). The primers used were ITS5 and ITS4 from ribosomal genes (ADNr). The results of the sample analysis were corroborated through traditional PCR according to the protocol described by Ahrens and Seemüller (1992), with modifications to the components, according to Sambrook and Russell (2012). The quality was evaluated through horizontal electrophoresis in 1% agarose gel (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized using a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The concentration of DNA was quantified using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). The DNA fragments amplified by PCR were purified with the Wizard (Promega®),



**Figura 1.** Distribución de especies de *Lasiodiplodia* en huertas de lima persa (*Citrus latifolia*) cultivadas en Morelos, México. Municipios muestreados= 1: Cuautla; 2: Ayala; 3: Jantetelco; 4: Jonacatepec; 5: Tepalcingo; 6: Tlaltizapán de Zapata; 7: Coatlán del Río; 8: Amacuzac; 9: Puente de Ixtla. Polígonos en blanco no registran superficie de cítricos.

**Figure 1.** Distribution of *Lasiodiplodia* species in Persian lime (*Citrus latifolia*) orchards in Morelos, Mexico. Municipalities where samples were collected = 1: Cuautla; 2: Ayala; 3: Jantetelco; 4: Jonacatepec; 5: Tepalcingo; 6: Tlaltizapan de Zapata; 7: Coatlán del Río; 8: Amacuzac; 9: Puente de Ixtla. White polygons do not include a citrus area.

muestras fue corroborado mediante PCR tradicional de acuerdo al protocolo descrito por Ahrens y Seemüller (1992), con modificaciones en los componentes según Sambrook y Russell (2012). La calidad se evaluó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados con el kit Wizard (Promega®, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. El producto de PCR purificado fue secuenciado en ambas direcciones por MacroGen Inc. (Seoul, Korea del Sur). Las secuencias fueron ensambladas y editadas con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1. Las secuencias de hongos fueron comparadas y depositadas en la base de datos del GenBank. Los árboles filogenéticos fueron construidos con los datos de las terminaciones de ITS5 e ITS4, además se analizaron con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.0.14 (Tamura *et al.*, 2007), alineadas con ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) y comparados con las secuencias de genes homólogos depositados en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information. Después de analizar la congruencia entre los conjuntos de datos, se hizo un análisis de máxima parsimonia (MP), se realizaron los análisis filogenéticos en PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versión 4.0b10 (Swofford, 2003). Los árboles filogenéticos se obtuvieron con la función de búsqueda heurística con 1,000 repeticiones de adición aleatoria, bisección y reconstrucción de árboles (TBR) como algoritmo de intercambio de ramas y los espacios o datos faltantes fueron considerados deleciones completas (Kimura, 1980; Hillis y Bull, 1993). La secuencia HQ231345 de *Phoma tracheiphila* de GenBank se utilizó como el taxón fuera de grupo.

USA) kit, following the manufacturer's protocol. The purified PCR product was sequenced in both directions by MacroGen Inc. (Seoul, South Korea). The sequences were assembled and edited using the CAP option (Contig Assembly Program) in the BioEdit software v7.0.9.1. The fungi sequences were compared and deposited in the GenBank's database. The phylogenetic trees were built using data from the ITS5 and ITS4 ends and analyzed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 7.0.14 (Tamura *et al.*, 2007), aligned using ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) and compared to sequences of homologous genes in the database of the National Center for Biotechnology Information. After analyzing the congruence among data sets, an analysis of maximum parsimony (MP) was conducted, and phylogenetic analyses were done by using the Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) software version 4.0b10 (Swofford, 2003). The phylogenetic trees were found using the heuristic search function with 1,000 random addition replicates, tree bisection and reconstruction (TBR) selected as branch-swapping algorithm, and the missing spaces or data were considered complete deletions (Kimura, 1980; Hillis and Bull, 1993). The HQ231345 sequence of *Phoma tracheiphila* from the GenBank was used as a taxon external to the group.

The incidence was evaluated following the methodology proposed by Acosta-Pérez *et al.* (2012), that is, by selecting five rows from each orchard, 4 to 21 trees per row, and a total of 21 to 50 trees per orchard. The percentage of incidence was determined by dividing the number of infected plants by the total of plants evaluated and then multiplied by 100. The disease severity was evaluated using the scale proposed by Orozco-Santos (1995) and modified by Valle-De la Paz, which consists of four classes, where 0= healthy tree, 1= presence of gum exudation on the main

La incidencia se evaluó con la metodología propuesta por Acosta-Pérez *et al.* (2012), seleccionando cinco hileras de cada huerto, 4 a 21 árboles por hilera y un total de 21 a 50 árboles por huerto. El porcentaje de incidencia se determinó dividiendo el número de plantas enfermas entre el total de plantas evaluadas y multiplicadas por 100. La severidad se evaluó mediante escala propuesta por Orozco-Santos (1995) y modificada por Valle-De la Paz, que consta de cuatro clases, donde 0= árbol sano, 1= presencia de exudaciones de goma en tronco principal o en ramas primarias y secundarias, 2= agrietamiento visible, exposición de tejidos internos, en tronco principal o en ramas primarias y secundarias y 3= presencia de cancro bien definido y muerte descendente de ramas (Figura 2). La severidad se transformó a porcentaje de infección (% PI) con la fórmula de Townsend y Heuberger (1943). A los datos se les aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene y Bartlett) y como no se ajustaron a dichos principios, el análisis se realizó con estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Kruskal Wallis y la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) y  $p < 0.0001$ .

Los síntomas observados en árboles de lima persa en Morelos son rajaduras en tallo, exudaciones de goma (Figura 2 B), canchros en la base del tallo (Figura 2 E), agrietamiento visible con exposición de tejidos internos (Figura 2 C), amarillamiento del follaje, muerte descendente de ramas y necrosis descendente en ramas con presencia de puntos negros (Figura 2 D), que corresponden a los cuerpos fructíferos (picnidios) del patógeno (Figura 3 E y F). La enfermedad descendió a la base de la rama anual e invadió las ramas secundarias, lo cual coincide con Khazada *et al.* (2004), quienes reportan que en plantas afectadas las ramas nuevas comienzan con una marchitez, posteriormente las hojas se tornan de color marrón y sus márgenes se doblan

trunk or on the primary and secondary branches, 2= visible cracks, exposure of internal tissue, on the main trunk or on the primary and secondary branches, and 3= presence of well-defined canker and dieback of branches (Figure 2). The severity was converted to percentage of infection (% PI) using the formula of Townsend and Heuberger (1943). The resulting data were subjected to tests of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Levene and Bartlett), but since the principles were not fulfilled, a nonparametric statistics analysis was done using the Kruskal Wallis test and a mean comparison using Tukey's test ( $\alpha= 0.05$ ) and  $p < 0.0001$ .

The symptoms observed in Persian lime trees in Morelos were stem cracks, gum exudation (Figure 2 B), cankers at the stem base (Figure 2 E), visible cracking with internal tissue exposure (Figure 2 C), canopy yellowing, dieback of branches, descending necrosis and black spots on the branches (Figure 2 D), which correspond to the pathogen's fructiferous bodies (pycnidia) (Figure 3 E and F). The disease advanced to the base of the annual branch and invaded the secondary branches, a fact that is in agreement with the results obtained by Khazada *et al.* (2004), who reported that new branches of infected plants start to wilt, and then the leaves become brown, their margins fold up, dry and fall off. Under severe conditions, the branches dry one after another in sequence until the entire tree dies.

Some of the symptoms are similar to those caused by *P. parasitica*, particularly gum secretion and the formation of cankers (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales, 1982), while *Lasiodiplodia* spp. causes dieback of branches, formation of pycnidia, as well as browning of the vascular tissue of dead branches (Figure 2). Valle-De la Paz *et al.* (2019), based on morphological traits, identified the *Lasiodiplodia* sp. genus. The molecular analysis determined groups of four clades: one for 11



**Figura 2.** Síntomas y niveles de daño de muerte descendente en árboles de lima persa en Morelos. A) 0: Árbol sano; B) 1: Presencia de exudaciones de goma en tronco principal o en ramas primarias y secundarias; C) 2: Agrietamiento visible con exposición de tejidos internos; D y E) 3: Muerte descendente de ramas y cancro bien definido.  
**Figure 2.** Symptoms and levels of damage caused by dieback of Persian lime trees in Morelos. A) 0: Healthy tree; B) 1: Presence of gum exudation on the main trunk or on the primary and secondary branches; C) 2: Visible cracks, exposure of internal tissue, on the main trunk or on the primary and secondary branches; D and E) 3: Dieback of branches and well-defined canker.

hacia arriba, se secan y caen. En condiciones severas las ramas se secan una tras otra en secuencia, resultando en la muerte de todo el árbol.

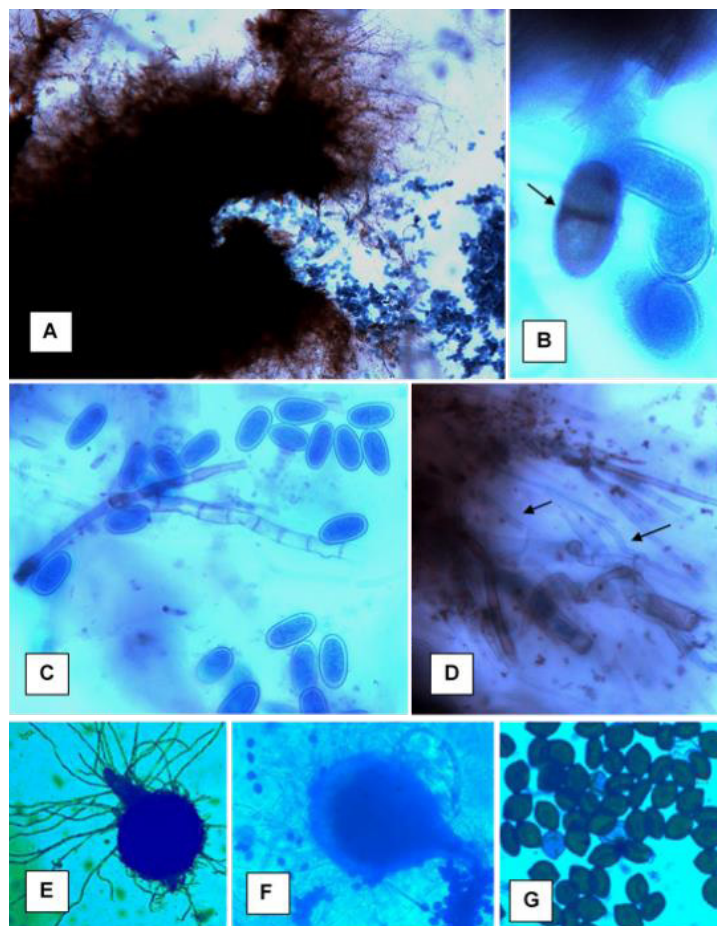
Algunos de estos síntomas son similares a los que ocasiona *P. parasitica*, particularmente la secreción de goma y formación de canchales (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales, 1982), mientras que *Lasiodiplodia* spp. causa muerte descendente de ramas y la formación de picnidios, adicionalmente los tejidos vasculares de ramas muertas se tornan de color marrón (Figura 2). Valle-De la Paz *et al.* (2019) con base a caracteres morfológicos identificaron el género *Lasiodiplodia* sp. El análisis molecular determinó agrupamiento de cuatro clados; uno con 11 aislamientos a género *Lasiodiplodia* sp. y tres clados a especies, un aislado alineó para *Lasiodiplodia citricola*, otro para *L. pseudotheobromae* y dos para *L. theobromae* (Figura 3).

En la Figura 1 se presenta la distribución de las especies de *Lasiodiplodia*, describiéndose por municipio muestreado: Cuautla (*Lasiodiplodia* sp., y *L. theobromae*), Tlaltizapán de Zapata (*Lasiodiplodia* sp. y *L. theobromae*) y Jantetelco (*Lasiodiplodia* sp., *L. citricola* y *L. theobromae*). Mientras que

isolates of the *Lasiodiplodia* sp. genus, three clades for species, one isolate aligned for *Lasiodiplodia citricola*, another for *L. pseudotheobromae* and two for *L. theobromae* (Figure 3).

Figure 1 shows the distribution of *Lasiodiplodia* species by municipality where the samples were collected: Cuautla (*Lasiodiplodia* sp., and *L. theobromae*), Tlaltizapan de Zapata (*Lasiodiplodia* sp. and *L. theobromae*) and Jantetelco (*Lasiodiplodia* sp., *L. citricola* and *L. theobromae*). *L. pseudotheobromae* was found only in Coatlan del Rio, *Lasiodiplodia* sp. in Ayala, Jonacatepec, Tepalcingo, Amacuzac and Puente de Ixtla. *L. theobromae* was the prevailing species (28.57%), followed by *L. pseudotheobromae* (16.07%) and *L. citricola* (3.57%). *Lasiodiplodia* sp. was found in 51.78% of the sampled orchards, which indicates that new species are likely present.

The mean tests of dieback incidence were separated in 18 groups with statistical differences among them. In the group A were the orchards with the highest percentage of incidence (96.7-100%), located in the municipalities of Jonacatepec (1 orchard), Coatlan del Rio (2 orchards), Tlaltizapan



**Figura 3.** Estructuras de *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *L. citricola* en medio PDA. A) Conidio de *L. theobromae*; B) didimospora madura y amersporas inmaduras de *L. theobromae*; C) conidios inmaduras (amersporas) de *L. pseudotheobromae*; D) paráfisis de *L. pseudotheobromae*; E y F) picnidios y conidios de *L. citricola*; G) conidios de *L. citricola*. Fotografías tomadas en Microscopio óptico (A, F y E) 10 X; B, C, D y G) 100 X.

**Figure 3.** *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* and *L. citricola* structures in a PDA medium. A) *L. theobromae* conidium; B) *L. theobromae* mature didymospore and immature amersporas; C) *L. pseudotheobromae* immature conidia (amersporas); D) *L. pseudotheobromae* paraphyses; E and F) *L. citricola* pycnidia and conidia; G) *L. citricola* conidia. Photographs taken under an optical microscope (A, F and E) 10 X; B, C, D and G) 100 X.

en Coatlán del Río sólo se encontró a *L. pseudotheobromae*; en Ayala, Jonacatepec, Tepalcingo, Amacuzac y Puente de Ixtla se identificó a *Lasiodiplodia* sp. La especie predominante fue *L. theobromae* con 28.57 %, seguido de *L. pseudotheobromae* con 16.07% y finalmente *L. citricola* con 3.57%. En el 51.78% de los huertos muestreados se encontró a *Lasiodiplodia* sp. lo cual indica la probable presencia de especies nuevas.

de Zapata (2 orchards) and Cuautla (1 orchard). The following 10 groups included the orchards with intermediate-high incidence (55.4-88.1%), located in the municipalities of Jantetelco (2 orchards), Coatlán del Río (4 orchards), Amacuzac (3 orchards), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Puente de Ixtla (4 orchards), Tepalcingo (3 orchards) and Ayala (1 orchard). In the group EDHIGCF were the orchards with intermediate incidence (48.1-49.2%), located

Las pruebas de medias de la incidencia de la muerte descendente se separaron en 18 grupos, con diferencias estadísticas entre ellos. En el grupo A se ubicaron huertos con mayor porcentaje de incidencia, que fue de 96.7 a 100 %, estos se ubicaron en los municipios de Jonacatepec (1 huerto), Coatlán del Río (2), Tlaltizapán de Zapata (2) y Cuautla (1). En los siguientes 10 agruparon los huertos que presentaron una incidencia de media a alta, con porcentajes de 55.4 a 88.1%, ubicándose en los municipios de Jantetelco (2 huertos), Coatlán del Río (4), Amacuzac (3), Tlaltizapán de Zapata (3), Puente de Ixtla (4), Tepalcingo (3) y Ayala (1). En el grupo EDHIGCF se agruparon huertos donde la incidencia fue media de 48.1 a 49.2%, con ubicación en los municipios de Amacuzac (1), Puente de Ixtla (1 huerto) y Jantetelco (2). Seguido de cinco grupos donde la incidencia se presentó de media a baja de 44.3 a 23.8%, ubicándose en los municipios de Coatlán del Río (2), Jantetelco (1), Tlaltizapán de Zapata (3) y Ayala (1). Finalmente, en el grupo I se tuvieron los huertos que presentaron la menor incidencia de la enfermedad con 11.9 a 25.4% y se ubicaron en los municipios de Tlaltizapán de Zapata (3 huertos), Ayala (2), Amacuzac (3) y Coatlán del Río (1) (Figura 6).

La enfermedad presentó porcentajes de incidencia de 49 a 100%, en 37 de los 46 huertos evaluados, de los cuales el 78% de huertos presenta incidencias que oscilan del 31.8 al 100% (Figura 6), es decir que se observa en todas las áreas productoras de lima persa del estado de Morelos, donde se detectaron factores como la edad de la planta, manejo agronómico, podas, fertilización, etc., que predisponen su presencia; sin embargo es importante destacar que los municipios de Coatlán del Río y Tlaltizapán de Zapata están localizados en la parte sur-poniente del estado de Morelos, donde predomina un clima cálido, integrado por la prolongación de la zona de pie de monte. El centro

in the municipalities of Amacuzac (1 orchard), Puente de Ixtla (1 orchard) and Jantetelco (2 orchards). Then there were five groups of orchards with low-to-intermediate incidence (44.3-23.8%), located in the municipalities of Coatlan del Rio (2 orchards), Jantetelco (1 orchard), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards) and Ayala (1 orchard). Finally, in the group I were the orchards with the lowest disease incidence (11.9-25.4%), located in the municipalities of Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Ayala (2 orchards), Amacuzac (3 orchards) and Coatlan del Rio (1 orchard) (Figure 6).

The percentage of incidence ranged from 49 to 100% in 37 out of the 46 orchards evaluated, from which 78% showed a level of incidence ranging from 31.8 to 100% (Figure 6), which means that the disease was observed in all the Persian lime producing areas in the state of Morelos, where factors that favor the disease were observed, including age of the plant, agronomic management, pruning and use of fertilizers, among others. However, it is important to highlight that the municipalities of Coatlan del Rio and Tlaltizapan de Zapata are located in southern-western Morelos, integrated by the extension of the foothills area where the weather is warmer. The center of the location along with the southern mountain accounts for 60% of the state surface, with 22-26°C annual average temperature, 34°C maximum temperature and summer and winter rains up to 900 mm (INEGI, 2018).

The municipality with a lower percentage of disease incidence was Coatlan del Rio (11.97%), located in southern-western Morelos, and area adjacent to Guerrero and the State of Mexico, which is characterized by a prevailing sub-humid weather with summer and winter rains A (W). There are also humid subtropical and hot tropical microclimates with indefinite winter periods. The average rainfall



de la entidad conjuntamente con la montaña sur constituye el 60% de la superficie estatal, donde se logran temperaturas medias anuales de 22 a 26°C, temperaturas máximas de 34°C y lluvias predominantes en los meses de verano e invierno hasta de 900 mm (INEGI, 2018).

El municipio con menor porcentaje de incidencia de la enfermedad fue Coatlán del Río (11.97 %) y se localiza al sur poniente del estado, colindando con Guerrero y el Estado de México, caracterizado por un clima subhúmedo con lluvias en verano y en invierno A (W) es el predominante. También se tienen microclimas como el subtropical húmedo y el caluroso tropical con invierno indefinido. La precipitación promedio es de 1,000 milímetros anuales, con temperaturas máximas de 34 °C, la media 24 °C y la mínima 14 °C. (Enciclopedias municipios y delegaciones de México, 2018). Estas condiciones meteorológicas influyen en la infección y desarrollo de la enfermedad. En este sentido, Picos-Muñoz *et al.* (2015) manifestaron que humedades relativas y temperaturas altas favorecen la aparición de este hongo. Además, plantearon que puede causar importantes pérdidas económicas sobre todo en frutales. Reportan que la fuente de infección son la presencia de plantas enfermas y restos de poda que quedan tirados en el campo, además, es favorecida por altas temperaturas, lluvias y humedad proporcionada por el riego, este factor favorece la expulsión de las esporas de los picnidios y se acumulen en la atmósfera que rodea el cultivo y suelo (Muhammad, 2009).

La muerte descendente de árboles frutales susceptibles a la enfermedad puede resultar de la interacción de este patógeno con estrés hídrico, suelos arcillosos, escasa materia orgánica, elevada cantidad de caliza activa, fertilización inadecuada, exceso de riego, alta humedad por sombra excesiva, quemadura de sol, presencia de heridas por causas naturales o por el uso de herramientas de

is 1,000 annual millimeters, 34 °C maximum temperature, 24 °C average and 14 °C minimum (Enciclopedias Municipios y Delegaciones de México, 2018). The meteorological conditions have an impact on infection and disease development. In this regard, Picos-Muñoz *et al.* (2015) indicated that relative humidity and high temperatures favor the development of the fungus. The authors also stated that the fungus can cause important economic losses, especially in fruit orchards. It has also been reported that a source of spreading are infected plants and pruning debris left in the field, and that high temperatures and moisture provided by irrigation also favor the disease, because the latter promotes the release of spores from pycnidia that then accumulate in the atmosphere surrounding the crop and the soil (Muhammad, 2009).

Dieback of fruit trees susceptible to the disease can cause the interaction of the pathogen with water stress, clay soils, low organic matter, a large amount of active limestone, inadequate fertilization, excess irrigation, high moisture caused by excessive shade, sunburn, wounds from natural causes or caused by the use of crop cutting tools, pruning and compacted alkaline soils that hinder root development, nutrition and airing (Agustí, 2003; Ko *et al.*, 2004).

The mean tests of dieback severity were separated in 30 groups with statistical differences among them (Figure 6). The highest level of severity (100%) was found in orchards located in the municipalities of Tlaltizapan de Zapata (1 orchard) and Coatlan del Rio (1 orchard), which were significantly different from all the orchards from the group A. The following 14 groups included the municipalities with 55.5-95%: Tepalcingo (1 orchard), Puente de Ixtla (3 orchards), Ayala (1 orchard), Coatlan del Rio (5 orchards), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Amacuzac (3 orchards), Jonacatepec (1 orchard), Jantetelco (2 orchards)

corte en la cosecha, podas y suelos compactados alcalinos que complican el desarrollo radicular, nutrición y aireación (Agustí, 2003; Ko *et al.*, 2004).

Las pruebas de medias de la severidad de la muerte descendente se separaron en 30 grupos, con diferencias estadísticas entre ellos (Figura 6). La severidad más alta (100%), se encontró en huertos ubicados en los municipios de Tlaltizapán de Zapata (1 huerto) y Coatlán del Río (1), los cuales fueron significativamente diferentes a todos los huertos, correspondiendo al grupo A. En los siguientes 14 grupos se agruparon los municipios con porcentajes que van de 55.5 a 95% en los siguientes municipios Tepalcingo (1 huerto), Puente de Ixtla (3), Ayala (1), Coatlán del Río (5), Tlaltizapán de Zapata (3), Amacuzac (3), Jonacatepec (1), Jantetelco (2) y Cuautla (1) (Figura 4). Enseguida se presenta el grupo KEJMIHLGN con una severidad medias de 50.5 con un huerto del municipio de Tepalcingo (1), en seguida con 13 grupos presentaron porcentajes de infección de 9.8 a 43.3% en municipios de Jantetelco (2 huertos), Puente de Ixtla (2), Coatlán del Río (2), Amacuzac (4), Tlaltizapán de Zapata (5) y Amayuca (1) (Figura 5). Por último, en el grupo Q se agruparon dos huertos del municipio de Tlaltizapán de Zapata, los cuales fueron significativamente diferentes con un porcentaje de severidad de 3.7 a 5.08 %. Las agrupaciones anteriores, indica que más del 71 % de los huertos evaluados, presentan severidades que van del 30.0 al 100% de porcentaje de infección de la enfermedad (Figura 6).

Rodríguez (2010) señala que la actividad del hongo se ve favorecida por temperaturas de  $24 \pm 26$  °C. Mientras que Almaguer *et al.* (2015) coinciden en que especies de *Lasiodiplodia* son comunes en los trópicos y causan varias enfermedades en etapas de cultivo como en postcosecha, como *L. theobromae* que afecta a principalmente frutales, donde las lluvias y el viento son factores que

and Cuautla (1 orchard) (Figure 4). Then was the group KEJMIHLGN with 50.5 mean severity in an orchard in the municipality of Tepalcingo (1), followed by 13 groups with 9.8-43.3% of infection in the municipalities of Jantetelco (2 orchards), Puente de Ixtla (2 orchards), Coatlán del Río (2 orchards), Amacuzac (4 orchards), Tlaltizapán de Zapata (5 orchards) and Amayuca (1 orchard) (Figure 5). Finally, the group Q included two orchards in the municipality of Tlaltizapán de Zapata, which were significantly different with a level of disease severity of 3.7-5.08%. The above-mentioned groups indicate that the level of infection severity ranged from 30.0 to 100% in more than 71% of the evaluated orchards (Figure 6).

Rodríguez (2010) points out that the fungus activity is favored by temperatures of  $24 \pm 26$  °C. While Almaguer *et al.* (2015) agrees that *Lasiodiplodia* species are common in the tropics and cause several diseases at crop stages, for example, postharvest, *L. theobromae* affects mainly fruit trees in sites where the rain and the wind are the factors that determine spore spreading within a cropping area.

The results of this study corroborate that the highest level of damage produced by *Lasiodiplodia* spp. was observed in the municipalities located in southeast Morelos (Figure 1), a region characterized by a semi-warm weather with 800 mm rainfall and 24°C annual average temperature, where the soils are abundantly irrigated with underground water, a factor that can be decisive for the fast spreading of the pathogen, as in the case of other pathogens in clay soils. Prior to this study, Acosta-Pérez *et al.* (2012) pointed out that there was a new disease in *C. latifolia* plantations with external symptoms similar to those of gummosis and that producers were mistakenly managing it as such. The disease was found in 44% of *C. latifolia* plantations with an average incidence of 10.2% and 1.7-25.0% interval.

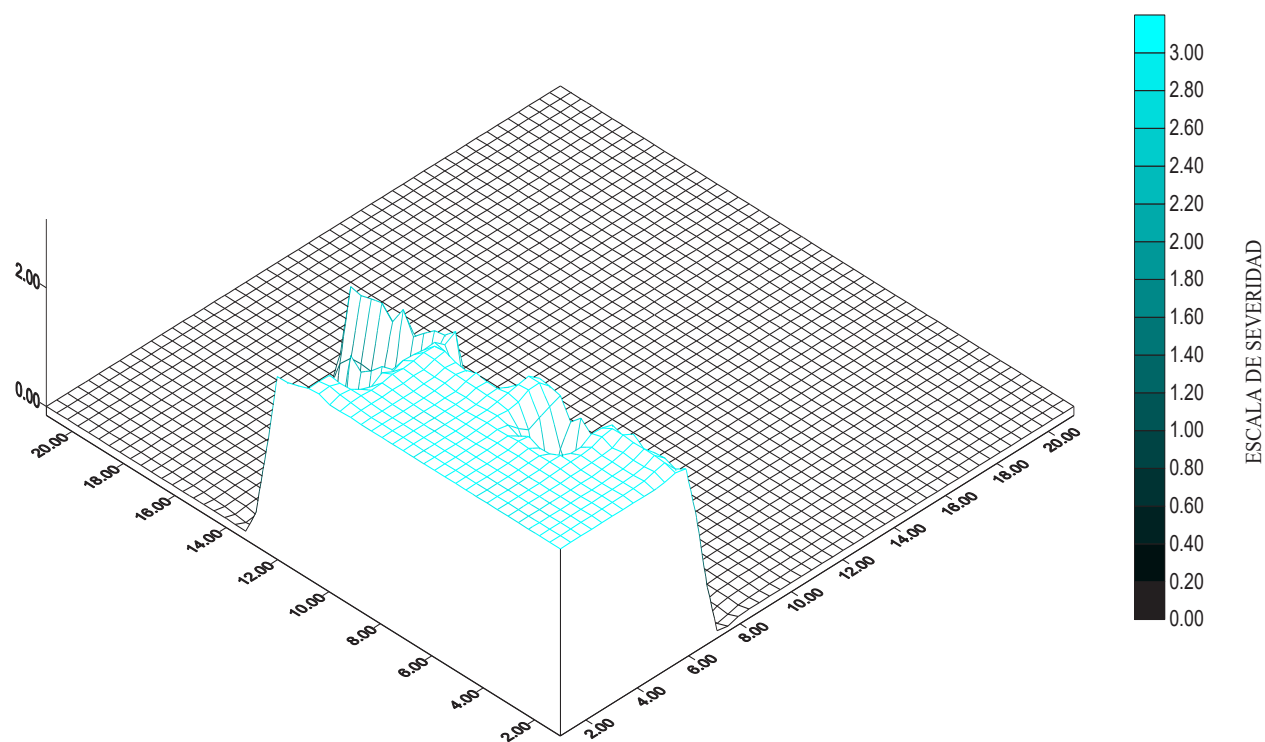


Figura 4. Severidad (2.4) de muerte descendente en lima persa (*Citrus latifolia*) en un huerto de Coatlán del Río, Morelos.  
Figure 4. Severity (2.4) of die back in Persian lime (*Citrus latifolia*) in an orchard in Coatlán del Río, Morelos.

determinan la dispersión de las esporas dentro de las áreas de cultivo.

Los resultados del estudio corroboran que la mayor severidad de daños producidos por *Lasiodiplodia* spp, ocurren en los municipios ubicados en el Sureste del estado (Figura 1), caracterizado por un clima semicálido, con precipitaciones de 800 mm y temperatura media anual de 24°C, donde los suelos tienen una gran afluencia de aguas subterráneas lo que puede ser determinante para la diseminación rápida de este patógeno, como ocurre con otros patógenos en suelos arcillosos. Previo a este estudio Acosta-Pérez *et al.* (2012) señalaron, que, en plantaciones de *C. latifolia*, existía una nueva enfermedad con síntomas externos similares a la gomosis y que los productores equivocadamente estaban manejando como tal. Esta enfermedad estuvo presente en el 44% de las plantaciones de *C.*

The decrease in citrus area has been attributed to damage caused by *Phytophthora*, among other factors (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015; Vidales, 1982). However, the preliminary results of this study show a growing effect with damage up to level 3, canker and dieback of branches, which are attributed to several *Lasiodiplodia* species. The intensity of dieback varies in the state of Morelos and within the same municipalities, which shows that Morelos has the adequate temperature and moisture conditions, which are ideal for the disease, in addition to an inefficient management control by the producers, and that these factors promote the development and spread of the disease.

The conclusion is that dieback is a disease associated with several *Lasiodiplodia* species, such as *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*, which cause serious damage

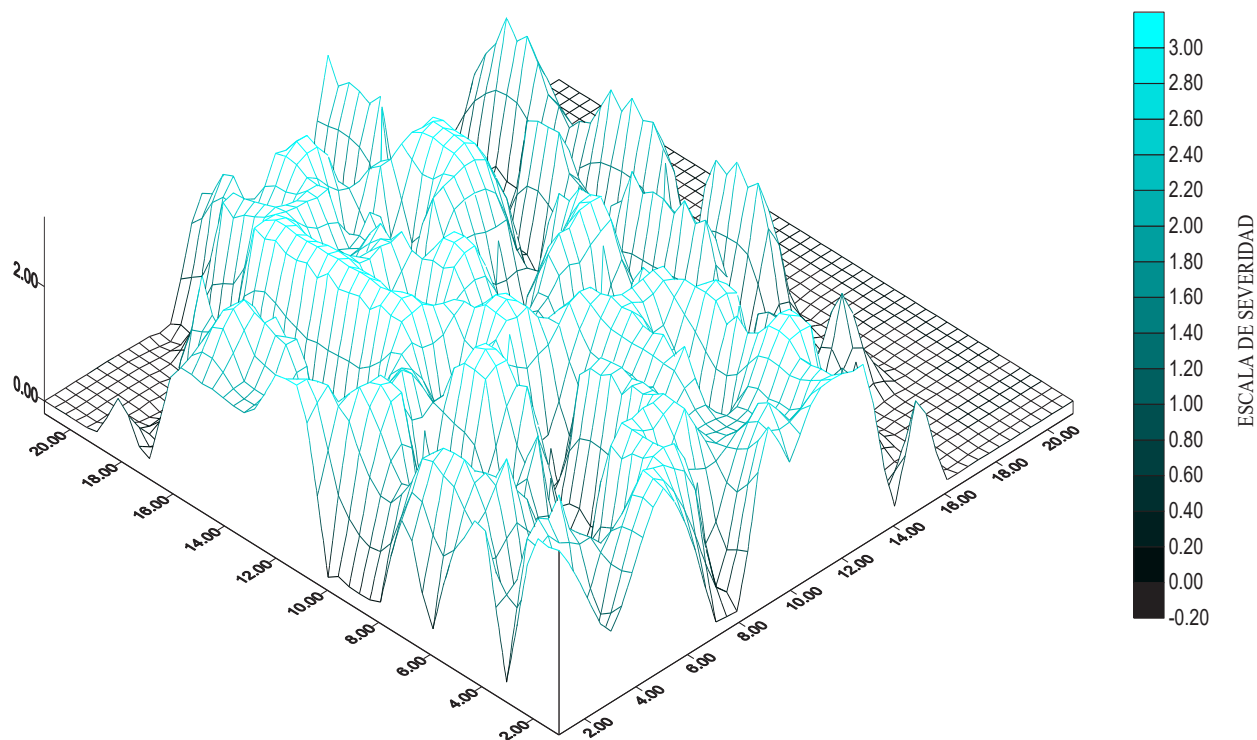


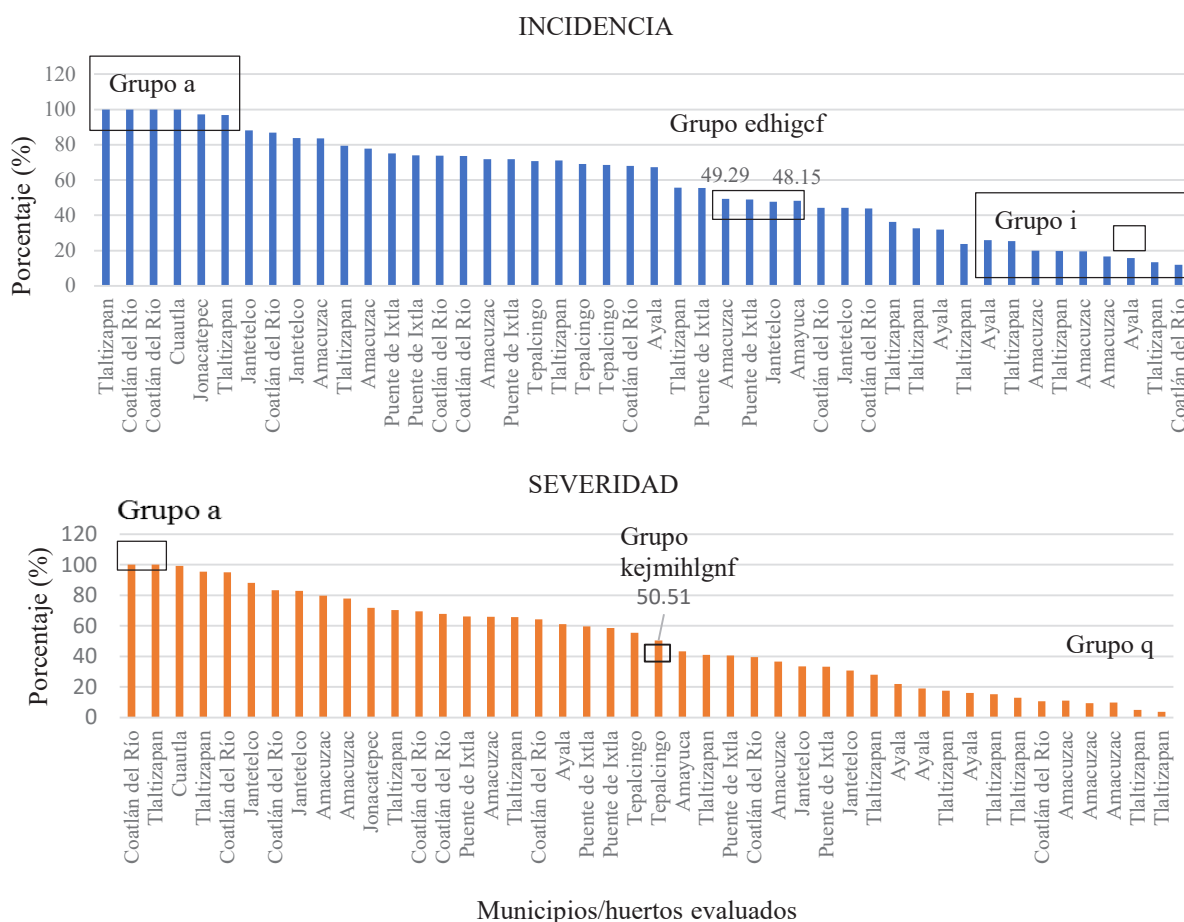
Figura 5. Severidad (1.6) de muerte descendente en lima persa (*Citrus latifolia*) en un huerto del municipio de Puente de Ixtla, Morelos.  
Figure 5. Severity (1.6) of die back in Persian lime (*Citrus latifolia*) in an orchard in the municipality of Puente de Ixtla, Morelos.

*latifolia* con una incidencia promedio de 10.2% e intervalo de 1.7 a 25.0%. La disminución de la superficie de cítricos ha sido atribuida entre otros factores a los daños por *Phytophthora* (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015; Vidales, 1982). Sin embargo, estos resultados preliminares, exponen una afectación creciente, con daños hasta grado 3, con presencia de cancro y muerte descendente de ramas, atribuibles a varias especies de *Lasiodiplodia*. La muerte descendente se presenta con diferentes intensidades en el estado de Morelos y dentro de los mismos municipios, lo que demuestra que Morelos cuenta con las condiciones adecuadas tanto de temperatura y humedad, idóneas para el desarrollo de esta enfermedad, aunado al mal manejo por parte del productor, lo que desencadena el desarrollo y la propagación de la enfermedad.

to Persian lime trees given the high levels of incidence and severity in citrus orchards in the state of Morelos. It was found in 100% of the orchards evaluated and this shows the importance of the disease in reducing the crop profitability.

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

Se concluye que la muerte descendente es una enfermedad que se encuentra asociada a varias especies de *Lasiodiplodia* tales como: *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, las cuales atacan seriamente a los árboles de lima persa, presentando incidencias y severidades altas en los huertos de cítricos del estado de Morelos, encontrándose presente en el 100% de las huertas



**Figura 6. Incidencia y severidad de la muerte descendente asociado al género *Lasiodiplodia* spp. en huertos de Lima Persa (*Citrus latifolia*) en el estado de Morelos.**

**Figure 6. Level of incidence and severity of dieback associated with *Lasiodiplodia* spp. genus in Persian lime (*Citrus latifolia*) orchards in the state of Morelos.**

evaluadas, lo cual refleja la importancia de esta enfermedad en la reducción de la rentabilidad del cultivo.

## LITERATURA CITADA

Acosta-Pérez JA, Ortiz-García CF, Zaldívar-Cruz JM, Rodríguez-Cuevas M, Bautista-Muñoz CC y Castillo ACC. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 28(3): 245-258. <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n3/v28n3a4.pdf>

Agustí M. 2003. *Citricultura*. Mundi-Prensa. Madrid, España. 422 p.

Ahrens U. and Seemüller E. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08\\_828.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.pdf)

Almaguer CM, Sánchez EKC and Díaz VL. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* in the atmosphere of Havana. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 4 (2):130-134. <http://www.rcub.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/138>

Christensen J. 2017. Common Diseases of Lime Trees. <https://www.gardeningchannel.com/common-diseases-of-lime-trees/>.

FAOSFAT. 2018. *Citrus Fruit Fresh and Processed*. Statistical Bulletin 2016. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>.

- Hillis DM and Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192. DOI:10.1093/sysbio/42.2.182
- INEGI. 2018. Clima morelos. [www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/clima.aspx?tema=me&e=17](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/clima.aspx?tema=me&e=17).
- Khanzada MA, Lodhi AM and Shahzad S. 2004. Mango dieback and gummosis in Sindh, Pakistan caused by *Lasiodiplodia theobromae*. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2004/mango/>. Plant Health Progress. DOI:10.1094/PHP-2004-0302-01-DG.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120. DOI:10.1007/BF01731581
- Ko WH, Wang IT and Ann PJ. 2004. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal agent of Kumquat dieback in Taiwan. *Plant Dis*. 88: 1383. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30795207>
- Mohali S, Slippers B and Wingfield, MJ. 2007. Identification of Botryosphaeriaceae species from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 143-65. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/25-7.pdf>
- Muhammad, S, Zafar, I, Ahmad, S and Muhammad, A. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.) Pak. *J. Bot.* 41(1):359-368.
- Orozco-Santos M. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 150 p.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, and Crous PW. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51-167. DOI: 10.3114/sim0021
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 33, núm. 1, pp. 54-74. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S018533092015000100054&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S018533092015000100054&lng=es&nrm=iso)
- Rodríguez GE. 2010. *Lasiodiplodia theobromae*: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas S.A.C.
- Sambrook J and Russell DW. 2012. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third Edition. 1. 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8265?lang=es&region=MX>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Producción Anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10&Itemid=15](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15).
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews* 21 (2007) 90–106. DOI:10.1016/j.fbr.2007.06.002.
- Sosa A, Ruíz G, Muro J y Gordillo G. 2015. Control de gomosis de los cítricos (*Phytophthora parasitica*) en mandarina cv. royal en el Petacal, Jalisco, México. XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología 2015, Nutrilite-Amway. DOI:10.13140/RG.2.1.3909.8008
- Swofford DL. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738>
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22), 4673–4680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/>
- Townsend GR. and Heuberger JV. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*. 24: 340-343.
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón- Hernández AR, Alía- Tejacal I, López- Martínez V, Juárez- López P, Martínez- Fernández V, Hernández- Arenas M y Ariza- Flores F. 2019. Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6 e595. DOI: 10.15741/revbio.06.01.35
- Vidales FJA. 1982. Etiología de la Gomosis de los Cítricos en Tecmán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. Tesis de Maestría. Chapingo, México.

# First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico

## Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México

**Miguel Contreras-Pérez, Gustavo Santoyo-Pizano\***, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Universidad S/N, Edificio A1', Morelia, Michoacán, C.P. 58030, México. **Sergio de los Santos-Villalobos**, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. **Ma. Angélica Gutiérrez-García, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma. del Carmen Rocha-Granados**, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Uruapan, Michoacán, C.P. 60170, México. \*Autor para correspondencia: gsantoyo@umich.mx

Recibido: 16 de Mayo, 2019.

Aceptado: 01 de Julio, 2019.

Contreras-Pérez M, Santoyo-Pizano G, de los Santos-Villalobos S, Gutiérrez-García MA, Orozco-Mosqueda MC and Rocha-Granados MC. 2019. First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 479-485.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-4

Primera publicación DOI: 12 de julio, 2019.

First DOI publication: July 12, 2019.

**Resumen.** En el año 2017 se presentaron diversos brotes de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de zarzamora variedad "Tupi" (*Rubus* subgénero *Eubatus*) de la región de Los Reyes-Peribán, Michoacán. De las plantas afectadas se realizaron varios cultivos para el aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos. En este trabajo, se caracterizó morfológica y molecularmente la cepa fúngica AB1, mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 18S

**Abstract.** In 2017, there were several outbreaks of diseases caused by phytopathogenic fungi in blackberry of the "Tupi" variety (*Rubus* subgenus *Eubatus*) crops in Los Reyes-Periban region, Michoacán. Fungal isolates were obtained from symptomatic plants. In this work, the pathogen AB1 was morphological and molecularly characterized. Through BLAST homology searches of the 18S rRNA marker and the rDNA internal transcribed spacer region (ITS), the fungi AB1 had a high identity with fungus of *Lasiodiplodia* genus (*Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva*), additionally, infection of *Lasiodiplodia* sp. AB1 in blackberry plants was corroborated *in vitro*. This is the first report of the isolation of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia* sp. in blackberry crops.

**Key words:** Infection, Tupi, Stem rot, Molecular characterization.

y la región intergénica (ITS). Los análisis BLAST mostraron que el aislado fúngico AB1 tuvo una alta identidad con hongos del género *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*), adicionalmente se corroboró *in vitro* la infección de *Lasiodiplodia* sp. AB1 en plántulas de zarzamora. Este es el primer reporte de la presencia de *Lasiodiplodia* sp. en cultivos de zarzamora de la variedad "Tupi".

**Palabras clave:** Infección, Tupi, Pudrición del tallo, caracterización molecular.

El municipio de Los Reyes, Michoacán, México, es el principal productor de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el país, aportando más del 80% de la producción nacional anual, la cual asciende a más de 260 mil toneladas (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). El cultivo de zarzamora es afectado por diversas especies de hongos fitopatógenos, causando pérdidas en la producción y económicas significativas, hasta un 25% equivalente a 2,540 millones de pesos anuales. Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo de zarzamora se han reportado el moho gris (*Botrytis cinerea*), la roya anaranjada (*Arthuriomyces peckianus*), la mancha de la hoja (*Cercospora* sp.), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el mildiú (*Peronospora sparsa*), y la pudrición de la raíz (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). Sin embargo, las condiciones edafo-climáticas cambiantes, como consecuencia de las prácticas agrícolas intensivas y el cambio climático, han inducido la aparición de diversos fitopatógenos emergentes con impactos negativos en la producción de cultivos agrícolas de interés económico, social y cultural. Por lo tanto, la correcta identificación y caracterización de dichos fitopatógenos emergentes es importante para proponer estrategias de control eficientes.

The municipality of Los Reyes, Michoacán, Mexico is the main producer of blackberries (*Rubus* subgénero *Eubatus*) in the country, providing over 80% of the national yearly production, which amounts to over 260 thousand tons (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). Blackberry production is affected by several species of fungi, causing losses in production, as well as economic losses of up to 25%, equal to 2,540 million pesos per year. Among the main diseases that impact blackberry crops are the gray mould (*Botrytis cinerea*), orange rust (*Arthuriomyces peckianus*), leaf spot (*Cercospora* sp.), anthracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), mildew (*Peronospora sparsa*), and root rot (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). However, soil and weather conditions that are changing as a consequence of the intensive agricultural practices and climate change, have exerted an influence on the appearance of diverse emerging phytopathogens with negative impacts on the production of agricultural crops of economic, social and cultural interest. Therefore, the correct identification and characterization of said emerging phytopathogens is important to propose efficient control strategies.

In 2017, blackberry farms located in the municipalities of Los Reyes and Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N and 102° 31' 12.503" W) presented plants in a vegetative state, diseases with leaf, branch and stem necrosis (with a basipetal progression), followed by defoliation and the death of the plant (Figure 1A). These symptoms had not been described by causal pathogens normally reported for blackberry crops, therefore affected plant tissue was gathered, mainly necrotic stems from 5 plants. The samples gathered were kept in humid chambers at 4 °C and later transported to the lab for their immediate analysis in order to identify the biological agent that caused such symptoms. For the isolation of the pathogen, the samples



En 2017, predios comerciales de zarzamora ubicados en los municipios de Los Reyes y Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N y 102° 31' 12.503" O) mostraron plantas en etapa vegetativa, enfermas con necrosis de hojas, ramas y tallos (con una progresión basipétala), seguido por defoliación y muerte de la planta (Figura 1A). Estos síntomas no habían sido descritos para patógenos comúnmente reportados en el cultivo de zarzamora, por lo que se procedió a la colecta de tejido vegetal afectado, principalmente tallos necróticos de 5 plantas. Las muestras colectadas fueron preservadas en cámaras húmedas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio para su análisis inmediato, con el fin de identificar el agente biológico causal de dichos síntomas. Para el aislamiento del patógeno, las muestras se desinfectaron superficialmente con 3 lavados de cloro al 2% y lavados con agua destilada estéril, posteriormente se trituro el tejido en un mortero estéril. Secciones de 0.5 cm fueron sembradas en cajas de Petri con Agar Dextrosa Papa (PDA), para favorecer el crecimiento de hongos. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 30 °C en obscuridad durante 48 horas. Las colonias fúngicas observadas fueron sembradas bajo las mismas condiciones de cultivo para la purificación de los aislados. Los aislados mostraron un rápido crecimiento micelial (1.5 cm en 6 h) de color blanco (24 h) (Figura 1B), posteriormente tornándose color negro ( $\geq 48$  h) (Figura 1C). Adicionalmente, se realizaron preparaciones, utilizando azul de bromofenol (observadas en un microscopio óptico) para determinar las estructuras de reproducción reportadas para el género *Lasiodiplodia*, tales como: abundante crecimiento micelial conformado por hifas y conidios septados maduros (Figura 1D y 1E), ovoides a elipsoides con contenido granular y ápice redondo (Alves *et al.*, 2008). Un aislado fúngico monospórico, AB1, fue preservado con el código ZPQ1 en la Colección de Microorganismos

were disinfected superficially, washing with 2% chlorine 3 times, and rinsing with sterile distilled water; later, the tissue was grinded in a sterilized mortar. Sections measuring 0.5 cm were planted in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) to promote fungal growth. The inoculated Petri dishes were incubated at 30 °C in the dark for 48 hours. The fungal isolates observed were cultured under the same growing conditions in order to purify the isolations, which showed a rapid mycelial growth (1.5 cm in 6 h), white in color (24 h) (Figure 1B), and later turning black ( $\geq 48$  h) (Figure 1C). In addition, preparations were carried out, using bromophenol blue (observed under an optic microscope) to determine the reproductive structures reported for the genus *Lasiodiplodia*, such as abundant mycelial growth, composed of mature septated hyphae and conidia (Figure 1D and 1E), ovoidal to elliptical in shape, with a grainy content and an round apex (Alves *et al.*, 2008). A monosporic fungal isolation, AB1, was stored with the code ZPQ1 in the Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

The molecular identification of AB1 began with the extraction of the deoxyribonucleic acid (DNA) from the mycelium of the fungus (1 mg), which was placed in 0.2 mL of TES buffer, mixing the suspension vigorously; next, 5 mg mL<sup>-1</sup> of K proteinase were added, along with ammonium acetate, and it was washed with ethanol at 70% and isopropanol in ice. Finally, the residual ethanol was evaporated from the pellet and the DNA was resuspended in deionized water. The quality and concentration of the extracted DNA were verified using an agarose-TAE gel at 1 % and a Thermo Scientific NanoDrop 2000c spectrophotometer. The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene using the universal oligonucleotides

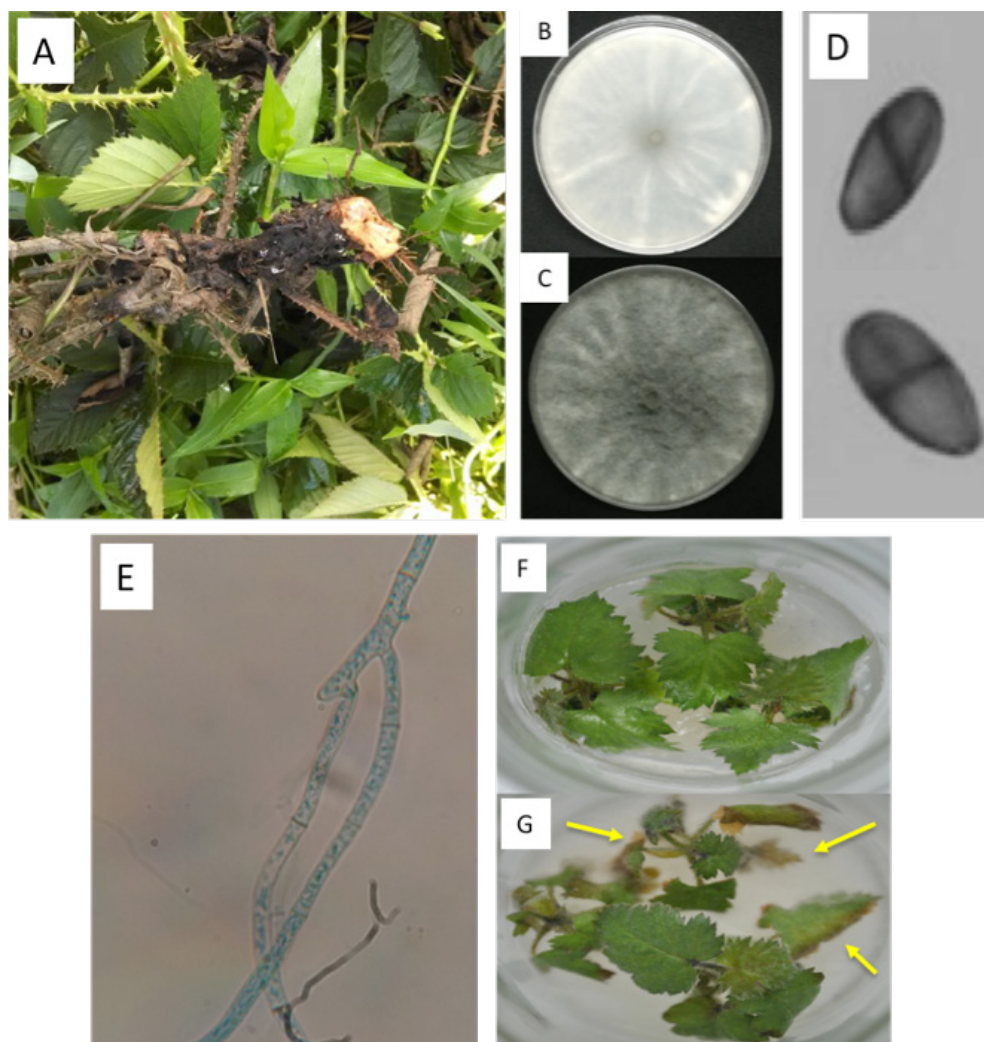


Figura 1. Aislamiento y caracterización morfológica y de infección del fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Tejido de zarzamora necrosado, material del que se obtuvo el aislamiento de *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) Micelio de *Lasiodiplodia* sp. AB1 a los 5 días de crecimiento. C) Micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1 a los 10 días de crecimiento. D) Conidios maduros. E) Porción del micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, teñido con azul de bromofenol. F) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' crecida *in vitro*. G) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' infectada con *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, las flechas indican zonas necróticas.

Figure 1. Isolation and morphological and infection characterization of the phytopathogen *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Necrotized blackberry tissue, material obtained from the isolation of *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) *Lasiodiplodia* sp. AB1 mycelium at 5 days of growth. C) *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium after 10 days of growth. D) Mature conidia. E) Portion of the *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium, stained with bromophenol blue. F) Blackberry var. 'Tupi' seedling planted *in vitro*. G) Blackberry var. 'Tupi' seedling infected with *Lasiodiplodia* sp., strain AB1; arrows indicate necrotized areas.

Edáficos y Endófitos Nativos-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Para la identificación molecular de AB1, se partió de la extracción del ácido desoxirribonucleico

NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) and NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA); as well as the intergenic region (ITS) with oligos ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS5

(ADN) a partir del micelio del hongo (1 mg), el cual se colocó en 0.2 mL de buffer TES, mezclando vigorosamente la suspensión; posteriormente se adicionaron 5 mg mL<sup>-1</sup> de proteinasa K, acetato de amonio y se realizó el lavado con etanol al 70% e isopropanol en frío. Finalmente, el etanol residual se evaporó de la pastilla y el ADN se resuspendió en agua desionizada. La calidad y concentración del ADN extraído fue verificada mediante un gel de agarosa-TAE al 1% y un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de la marca Thermo Scientific. El ADN fúngico extraído se utilizó para la amplificación del gen 18S RNA ribosomal usando los oligonucleótidos universales NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) y NS8 (TCCGCAGGTTACC-TACGGA); así como, la región intergénica (ITS) con los oligos ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS5 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE al 1%; posteriormente fueron purificados usando el kit The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, para ser secuenciados por una compañía comercial (Macrogen, Korea). Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtener la identidad/afiliación taxonómica del aislado fúngico. La secuencia del gen 18S RNAr del aislado AB1 obtenida fue de 1,050 pares de bases (pb) (No. de acceso NCBI: MG757345.1), dicha secuencia mostró una alta cobertura (100%) y similitud (99.52%) con *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*. La secuencia ITS tuvo una longitud de 539 pb (No. de acceso NCBI: MK841036.1), exhibiendo una identidad del 99.81% con múltiples aislados de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva* (Cuadro 1). *Lasiodiplodia* es un género fúngico que comprende, al menos, 30 especies (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), las cuales han sido asociadas a

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). The resulting amplicons were analyzed by electrophoresis in an agarose-TAE gel at 1% and later purified using the kit The Wizard® SV Gel and Promega PCR Clean-Up System, to then sequenced by a commercial company (Macrogen, Korea). The DNA sequences obtained were analyzed using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to obtain the taxonomic identity/affiliation of the fungal isolate. The sequence of gene 18S RNAr of the isolation AB1 obtained was 1,050 base pairs (bp) (NCBI Access num.: MG757345.1). This sequence displayed a high coverage (100%) and similarity (99.52%) with *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva*. The ITS sequence has a length of 539 bp (NCBI Access num: MK841036.1), displaying an identity of 99.81% with multiple *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva* isolations (Table 1). *Lasiodiplodia* is a fungal genus that comprises at least 30 species (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), which have been related to several economically important diseases in agricultural crops, where the causal agent is found as a latent endophyte. Based on the molecular identification of the gene 18S RNAr and the ITS region ADNr, the AB1 isolation has been affiliated to the genus *Lasiodiplodia* sp., until further studies are carried out to classify this isolation at a species level.

In addition, pathogenicity tests were carried out in the isolation AB1 to corroborate its role as a causal agent of the symptoms observed in blackberry plants. To confirm the Koch postulates, an *in vitro* infection test was carried out, in which blackberry seedlings of the “Tupi” variety were micropropagated, placing three plants per jar, which were then inoculated 1x10<sup>6</sup> spores of the isolation AB1 (control plants were sprayed with sterile distilled water). The plants were incubated for 5 days in a Percival AR66L growth chamber at a

**Cuadro 1. Identidad máxima encontrada de las secuencias ribosomales 18S e ITS de la cepa AB1 en el GenBank.**  
**Table 1. Maximum identity found for sequences 18S and ITS of strain AB1 in the GenBank.**

| Especie/Cepa                 | Máxima identidad por 18S RNAr<br>(ID GenBank)              | Máxima identidad por ITS<br>(ID GenBank)                  |
|------------------------------|--|---|
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. AB1 | 99.52%<br><i>Lasiodiplodia theobromae</i><br>(NG_062745.1) | 99.81%<br><i>Lasiodiplodia theobromae</i><br>(MK530050.1) |
|                              | 99.52%<br><i>Lasiodiplodia parva</i><br>(GQ469913.1)       | 99.81%<br><i>Lasiodiplodia parva</i> (KX227559.1)         |

diversas enfermedades de cultivos agrícolas de importancia económica, en donde dicho agente causal se encuentra como un endófito latente. Con base en la identificación molecular del gen 18S RNAr y la región ITS ADNr, el aislado AB1 ha sido afiliado al género *Lasiodiplodia* sp., hasta realizar más estudios para clasificar este aislado a nivel de especie.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de patogenicidad del aislado AB1 para corroborar su papel como agente causal de los síntomas observados en las plantas de zarzamora. Para confirmar los postulados de Koch, se realizó un ensayo de infección *in vitro*, en el cual, se micropropagaron plántulas de zarzamora de la variedad “Tupi”, colocando tres plantas por frasco, a las que posteriormente se les inocularon  $1 \times 10^6$  esporas del aislado AB1 (plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril). Las plantas se incubaron por 5 días en una cámara de crecimiento Percival AR66L, bajo una temperatura constante de 22 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Posterior al tiempo de inoculación del aislado AB1, todas las plantas inoculadas mostraron síntomas similares a los observados en los predios comerciales, clorosis, así como zonas con necrosis en hoja y tallo. Además, la cepa AB1 fue re-aislada y caracterizada de dichas plantas sintomáticas. Lo anterior demuestra

constant temperature of 22 °C and a light period of 16 hours and 8 hours of darkness. After the time of inoculation of isolation AB1, all inoculated plants displayed similar symptoms to those observed in commercial farms, chlorosis, as well as areas with leaf and stem necrosis. Also, strain AB1 was re-isolated and characterized from the symptomatic plants. This shows that *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 has the ability to infect blackberry var. “Tupi” plants, the crop it was isolated from (Figures 1F and 1G). Additional studies are in process to determine the pathogenicity in older plants in greenhouses and its biocontrol with antagonistic bacteria.

In conclusion, based on morphological observations, the molecular characterizations and the compliance with the Koch postulates, it was possible to identify, for the first time in Mexico – as far as we know – according to the revision of technical literature, that the isolation AB1 belongs to the genus *Lasiodiplodia*, and is the causal agent of the symptoms observed in blackberry plants in commercial farms located in the municipality of Los Reyes, Michoacán. This information will provide important information for the integrated management of this disease, in order to avoid possible epidemiological outbreaks in the crop, and economic losses.

que *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, tiene la capacidad de infectar plantas de zarzamora var. "Tupi", cultivo del que fue aislado (Figura 1F y 1G). Estudios adicionales están en proceso para determinar la patogenicidad en plantas de mayor edad en invernadero y su biocontrol con bacterias antagonistas.

En conclusión, con base en observaciones morfológicas, la caracterización molecular y el cumplimiento de los postulados de Koch, se identificó por primera vez en México -hasta donde sabemos-, según la revisión de literatura técnica, que el aislado AB1 perteneciente al género *Lasiodiplodia* es el agente causal de los síntomas observados en plantas de zarzamora en predios comerciales ubicados en el municipio de Los Reyes, Michoacán. Dicha identificación proveerá información de importancia para el manejo integrado de esta enfermedad, con el fin de evitar posibles brotes epidemiológicos en el cultivo y pérdidas económicas.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana por el apoyo a nuestros proyectos de investigación (2018-2019).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Coordination of Scientific Research of the Universidad Michoacana for the support provided to our research projects (2018-2019).

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

#### LITERATURA CITADA

- Alves A, Crows PW, Correia A and Philips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B y Estrada-Mora JC. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9: 191-202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado GR, Gómez-Dorantes N, Gregorio-Cipriano MR y Fernández-Pavía YL. 2012. Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. Biológicas, 14(2): 75-89. <https://biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=140&path%5B%5D=139>
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. Fungal Biology. 121:452-465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S and Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. PloS one 7(7): e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- SIAP-SAGARPA (2012-2018). Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca. (Consultado en 2019) [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)