

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

**VOLUMEN 38, NÚMERO 2, Mayo 2020**



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

**Eitor 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, LANREF, COLPOS

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

**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. Josefina Casas Solis, UDG

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-X

Dra. Elizabeth García León, INIFAP

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Reyna I. Rojas Martínez, COLPOS

Dra. Erika Janet Zamora Macorra, UACH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, CIATEJ

Dr. Alberto Uc Várguez, CIATEJ

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Raúl Allende Molar, Universidad Veracruzana

Dr. Luis Pérez Moreno, UGto

Dr. Alfonso Vásquez López, IPN

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, TecNM

Dr. Hipólito Cortez Madrigal, IPN

Dr. Mario Orozco Santos, INIFAP

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCOL

Dr. Misael Martínez Bolaños, INIFAP

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM

Dr. Ismael Fernando Chávez Díaz, INIFAP

Dr. Luis Antonio Mariscal Amaro, INIFAP

---

**Portada:** Síntomas de pudrición escamosa en plantas de mandacaru sin espinas (*Cereus hildmannianus*) (Izquierda), galerías causados por *Scytalidium lignicola* (Superior derecha) y estructuras de conidios de *S. lignicola* (Inferior derecha). Plantas colectadas de Prata, estado de Paraíba, Brasil.

**Original:** dos Santos Siqueira-Gomes R, Aires-Souza JT, Ginane-Barreto G and Cordeiro-do Nascimento L. Pág. 256.

**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS \* SCIENTIFIC ARTICLES**

**Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions** \* Evaluación de antagonistas microbianos y aceites esenciales en el control de *Sclerotium cepivorum* en ajo en condiciones controladas. Zapata-Narváez YA, Gómez-Marroquín MR and Botina-Azain BL. 182

**Pathogenic fungi associated to commercial seed of mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*** \* Hongos patógenos asociados a semilla comercial de variedades mexicanas de *Bouteloua curtipendula*. 198  
Quero-Carrillo AR, Zárate-Ramos A, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Miranda-Jiménez L and González-Muñoz S.

**NOTAS FITOPATOLÓGICAS \* PHYTOPATHOLOGICAL NOTES**

**Wilt incidence in tomato genotypes (*Solanum lycopersicum*) in different production systems under shade mesh** \* Incidencia de marchitez en genotipos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en diferentes sistemas de producción bajo malla sombra. 215  
Montiel-Peralta E, Ávila-Alistac N, Montiel-Peralta E, Chamú-Baranda JA.

**Graft response of *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to Begomovirus in field** \* Respuesta del injerto de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* a Begomovirus en campo. 226  
Navarrete-Mapen RZ, Cristóbal-Alejo J, Uc-Vázquez A, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM and Alvarado-López CJ.

**Chemical treatment to wheat seed to reduce the incidence of bacteria** \* Tratamiento químico en la semilla de trigo para disminuir la incidencia de bacterias. 239  
Rodríguez-García MF, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, Rivas-Valencia P, González-González M, Hortelano-Santa Rosa R, Robles-Yerena L and Aranda-Ocampo S.

**Identification of associated fungi to diseases in *Cereus jamacaru* and *Cereus hildmannianus*** \* Identificación de hongos asociados a las enfermedades de *Cereus jamacaru* y *Cereus hildmannianus*. 250  
dos Santos Siqueira-Gomes R, Aires-Souza JT, Ginane-Barreto G and Cordeiro-do Nascimento L.

- Fungicides, biocontrollers and resistance inducers in commercial bell pepper hybrids inoculated with *Phytophthora capsici*** \* Fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia en híbridos comerciales de pimiento morrón inoculados con *Phytophthora capsici*. 258  
Godínez-Paoli R, Leyva-Mir SG, García-Mateos MR, Magdaleno-Villar J, Cruz-Álvarez O and Martínez-Damián MT.
- Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*)** \* Aislamiento e identificación de patógenos causantes de la pudrición del tallo de la higuera (*Ficus carica*). 269  
Jahén-Rivera SN, Gómez-Rodríguez O and Espinosa-Victoria D.
- Radial graphics to characterize PRSV-P symptoms in *Carica papaya*** \* Gráficos radiales para caracterizar síntomas de PRSV-P en *Carica papaya*. 280  
Sósol-Reyes D, Villanueva-Jiménez JA, Osorio-Acosta F and Noa-Carrazana JC.
- Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control** \* Evaluación de biofungicidas en dos variedades de café para el control de *Hemileia vastatrix*. 293  
Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M and Guzmán-Plazola RA.
- Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*)** \* Diversidad de bacterias endófitas asociadas a plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) 307  
Longoria-Espinoza RM, Félix-Gastélum R and Cordero-Ramírez JD.

# Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions

## Evaluación de antagonistas microbianos y aceites esenciales en el control de *Sclerotium cepivorum* en ajo en condiciones controladas

Yimmy Alexander Zapata-Narváez\*, Magda Rocío Gómez-Marroquín, Blanca Lucia Botina-Azain. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá Km 14 Vía Mosquera, Cundinamarca-Colombia. \*Autor para correspondencia: jzapatan@agrosavia.co

Recibido: 04 de Febrero, 2020.

Aceptado: 31 de Marzo, 2020.

Zapata-Narváez YA, Gómez-Marroquín MR and Botina-Azain BL. 2020. Evaluation of microbial antagonists and essential oils to control *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 182-197.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-2

Primera publicación DOI: 08 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 08, 2020.

**Resumen.** La pudrición blanca producida por *Sclerotium cepivorum* es la principal limitante del cultivo de ajo en Colombia, causando pérdidas superiores al 50%. La ausencia de semilla de calidad contribuye a su diseminación e infestación en áreas de siembra, siendo la principal estrategia de control la aplicación de fungicidas, por ende, es necesario integrar alternativas de manejo orientadas a su sostenibilidad. Así, el objetivo de este estudio fue determinar bajo condiciones controladas el potencial de control de *S. cepivorum* con antagonistas

**Abstract.** White rot produced by *Sclerotium cepivorum* is the main limitation to garlic production in Colombia causing losses that exceed 50%. The absence of quality seed contributes to its dissemination and infestation in sowing areas, the main control strategy is the application of fungicides; therefore, it is necessary to integrate management alternatives that promote its sustainability. Thus, the objective of this study was to determine under controlled conditions the potential of control for *S. cepivorum* with microbial antagonists and essential oils. The effect on the pathogen's growth was determined in PDA supplemented with each oil and for the antagonists its ability to degrade sclerotia. In soil infested with sclerotia was determined the effect on incidence and mortality reduction with the applications of the antagonists and selected oils. The results showed that exposure to eucalyptus (10,000 ppm) and oregano (200; 250 ppm) oils inhibited by 92% growth of the pathogen, while antagonists colonized more than 95% of sclerotia, causing their degradation. While in infested soil



microbianos y aceites esenciales. Se determinó en PDA suplementado con cada aceite el efecto sobre el crecimiento del patógeno y para los antagonistas su capacidad para degradar esclerocios. Igualmente, en suelo infestado con esclerocios se determinó el efecto de las aplicaciones de los antagonistas y aceites seleccionados sobre la reducción de incidencia y mortalidad. Los resultados mostraron que la exposición al aceite de eucalipto (10000 ppm) y orégano (200; 250 ppm) inhibió en un 92% el crecimiento del patógeno; en tanto, que los antagonistas colonizaron más del 95% de los esclerocios, provocando su degradación. Mientras que en suelo infestado presentaron un control entre 30 al 70%, siendo *Trichoderma asperellum* Th034 el que presentó la menor incidencia y mortalidad (21%).

**Palabras clave:** Esclerocio, parasitismo, crecimiento, incidencia, mortalidad.

El ajo (*Allium sativum*) es una hortaliza de gran importancia en el mundo, utilizada principalmente como condimento, pero en medicina por su contenido de adenosina y ajoeno se usa como antioxidante, así como para reducir el bloqueo de las arterias, la presión arterial y el colesterol (Ramírez *et al.*, 2016), y en el control de plagas se usa como insecticida por su acción repelente (Plata *et al.*, 2017). A pesar de esto, en Colombia en la última década su cultivo ha disminuido pasando en 2013 de 527 ha a 231 ha en 2018 con una reducción en la producción de 9.309 t a 2.991 t (AGRONET, 2019), comportamiento que se asocia a la diseminación e incremento de problemas fitosanitarios, siendo la mayor limitante la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* (Prato, 2016).

Este patógeno exclusivamente afecta a las especies del género *Allium*, distribuyéndose en todas las regiones donde éstas se cultivan, disminuyendo

they showed a control between 30 and 70%, being *Trichoderma asperellum* Th034 which presented the lowest incidence and mortality (21%).

**Key words:** Sclerotia, parasitism, growth, incidence, mortality.

Garlic (*Allium sativum*) is a greatly important vegetable around the world that is most commonly used as a condiment or seasoning. However, because of its adenosine and ajoene content, garlic is used in medical treatments as an antioxidant and to reduce arterial blockages, blood pressure and cholesterol (Ramírez *et al.*, 2016); it is also used for controlling plant pests because of its repellent action (Plata *et al.*, 2017). However, in Colombia garlic production has decreased in the last decade from 527 ha in 2013 to 231 ha in 2018, and production decreased from 9,309 tons to 2,991 tons (AGRONET, 2019). This result is associated with disease and phytosanitary issues, with white rot caused by the *Sclerotium cepivorum* fungus (Prato, 2016) being the greatest constraint.

This pathogen affects only species of the *Allium* genus in all the regions where they are cultivated and reduces production and causes losses of more than 50%, thus being the greatest limitation of this genus (Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). *Sclerotium cepivorum* produces sclerotia, which are resistance structures that can remain viable for more than 20 years in the soil, as well as its primary inoculum; as a result, infested fields are not suitable for cultivating garlic or any other susceptible alliaceous species (Velásquez *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). White rot is mainly controlled using chemical synthesis fungicides such as Benomyl and Tebuconazole, whose continuous use can cause resistance problems, reduce soil microbiota, and

su producción, ya que puede causar pérdidas superiores al 50%, siendo así la mayor limitante de este género (Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). *Sclerotium cepivorum* produce esclerocios, estructuras de resistencia que pueden permanecer viables en el suelo por más de 20 años, así como su inóculo primario, de esta manera los campos infestados quedan arruinados para el cultivo de ajo o cualquier otra aliacea susceptible (Velásquez *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2018). El manejo de la pudrición blanca se realiza principalmente con fungicidas de síntesis química como Benomil y Tebuconazol, cuyo uso continuo puede generar problemas de resistencia, reducción de la microbiota del suelo, además de ser un riesgo para la salud humana (Pérez *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2017). De acuerdo con esto y con una visión sostenible del cultivo, es prioritario evaluar e integrar al manejo de la enfermedad, alternativas eficientes que tengan un bajo impacto ambiental, en este sentido, el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas o aceites esenciales pueden constituirse como herramientas en estrategias de manejo integrado de la pudrición blanca (Lourenço *et al.*, 2018).

Especies de los géneros *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. o *Pseudomonas* sp., se destacan en el control biológico de fitopatógenos por su amplia distribución y sus diferentes mecanismos de acción. En el mercado se encuentran diferentes bioplaguicidas con registro de uso, los cuales, son utilizados para el control de patógenos del suelo o foliares, adicionalmente, algunas cepas tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, influyendo en el desarrollo y producción de las plantas (Schuster y Schmoll, 2010; Santoyo *et al.*, 2012), por lo cual pueden ser considerados en el desarrollo de estrategias de manejo integrado previa evaluación y selección.

put human health at risk (Pérez *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2017). Based on the above and with a view to achieving sustainable garlic production, evaluating and integrating effective and low-environmental impact alternatives for disease management is a priority. In this regard, biological control using antagonistic microorganisms or essential oils can be included as a tool in integrated management strategies for controlling white rot (Lourenço *et al.*, 2018).

Species of the *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. or *Pseudomonas* sp., genera are considered to be effective for biological control of phytopathogens because of their wide distribution and different control mechanisms. Soil or foliar pathogens are controlled using commercial biopesticides registered for use; some of these strains are also able to promote plant growth by influencing plant development and production (Schuster and Schmoll, 2010; Santoyo *et al.*, 2012). For this reason, after being evaluated and selected, they can be used in the development of integrated management strategies.

Essential oils can also be obtained from cinnamon, eucalyptus and oregano plants that are known to have antimicrobial properties against pathogens, including *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, particularly because they produce compounds based on phenols, tannins or terpenes that act upon the pathogens' growth or metabolism (Gurjar *et al.*, 2012; Kottarachchia *et al.*, 2012). In view of this, the objective of this study was to determine, under controlled conditions, the potential use of *Trichoderma koningiopsis* (Th003) and *T. asperellum* (Th034) fungi; *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) and *Pseudomonas fluorescens* (Pf014) bacteria; and essential cinnamon, clove, eucalyptus, lemon, oregano and thyme oils to control *S. cepivorum*.

En el mismo sentido se encuentran aceites esenciales obtenidos de plantas como canela, eucalipto y orégano, los cuales presentan propiedades antimicrobianas contra patógenos como *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum*, particularmente por presentar compuestos a base de fenoles, taninos o terpenos los cuales presentan acción sobre el crecimiento o el metabolismo de los patógenos (Gurjar *et al.*, 2012; Kottarachchia *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, el objetivo de este estudio fue determinar bajo condiciones controladas el potencial de uso en el control de *S. cepivorum* para el cultivo de ajo de los hongos *Trichoderma koningiopsis* (Th003), *T. asperellum* (Th034), las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* (Bs006) y *Pseudomonas fluorescens* (Pf014) y de los aceites esenciales de canela, clavo, eucalipto, limón, orégano y tomillo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.

**Material vegetal.** Se usaron bulbillos sanos de ajo morado obtenida de un cultivo comercial, previó a su uso, la semilla se desinfectó mediante lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 2% (NaCl) por tres min y tres lavados con agua estéril.

**Microorganismos.** El patógeno utilizado correspondió al aislamiento S10 de *S. cepivorum*, aislado de una planta de ajo con signos de la enfermedad colectada de un foco de plantas enfermas en un cultivo del municipio de Sopo (departamento de Cundinamarca), obteniendo su inóculo a partir de la producción y cosecha de esclerocios en cultivos del hongo en Agar Papa Dextrosa (PDA Oxoid®), incubados a 18 °C durante 24 días. Los esclerocios

## MATERIALS AND METHODS

This research was conducted in the Agricultural Microbiology Laboratory of Tibaitatá Research Center of the Colombian Corporation for Agricultural Research (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA).

**Plant material.** Healthy purple garlic bulbils obtained from a commercial crop were used. Before using the seed, it was washed with a 2% sodium hypochlorite (NaCl) solution for three min and then washed three times with sterile water.

**Microorganisms.** The pathogen used in the experiment was an *S. cepivorum* S10 isolate obtained from a garlic plant with disease signs collected from a plot of infected plants in a garlic field in Sopo municipality (Department of Cundinamarca). The pathogen's inoculum was obtained from sclerotia produced in and harvested from a potato-dextrose-agar (PDA Oxoid®) culture medium incubated at 18 °C for 24 days. Sclerotia were harvested by scraping the culture medium and stored in Falcon tubes; when used, they were washed with 2% NaCl and dried at 30 °C for 24 h. Regarding the antagonistic microorganisms, AGROSAVIA's Microorganism Germplasm Bank provided *T. asperellum* Th034 and *P. fluorescens* Pf014 strains, which were then sown in a PDA culture medium and Luria Bertani (LB) broth, respectively. Tricotec® biofungicide based on *T. koningiopsis* Th003 strain and one formulation prototype based on the *B. amyloliquefaciens* Bs006 strain (developed by Agrosavia) were also used. The inoculum consisted of suspensions in water at concentrations of  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> for fungi, and  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup> for bacteria.

**Essential oils.** Based on a literature review, essential cinnamon, clove, eucalyptus, lemon,



se cosecharon mediante el raspado del medio, se almacenaron en tubos Falcon y cuando se utilizaron fueron desinfectados mediante lavado con NaCl al 2%, secándolos a 30 °C por 24 horas. En cuanto a los microorganismos antagonistas, el Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA proporcionó la cepa Th034 de *T. asperellum* y la cepa Pf014 de *P. fluorescens*, cuya producción se realizó en PDA y caldo Luria Bertani (LB), respectivamente. Igualmente se utilizó el biofungicida Tricotec® a base de *T. koningiopsis* cepa Th003 y un prototipo de formulación a base de *B. amyloliquifaciens* cepa Bs006 (desarrollados por Agrosavia). El inóculo consistió en suspensiones en agua a concentraciones de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  para hongos y  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para bacterias.

**Aceites esenciales.** De acuerdo con una revisión de literatura se seleccionaron por su potencial de control sobre *S. cepivorum* los aceites esenciales de canela, clavo, eucalipto, limón, orégano y tomillo. El aceite de orégano fue producido en Agrosavia (anteriormente Corpoica) por Betancourt *et al.* (2012), mientras que el resto de los aceites se obtuvo de concentrados comerciales.

**Actividad sobre la degradación de esclerocios.** Para determinar la capacidad de los antagonistas para degradar los esclerocios de *S. cepivorum*, se modificó la metodología descrita por Clarkson *et al.* (2002), para lo cual se dispusieron 100 esclerocios en bolsas de muselina de 1  $\text{cm}^2$ , ubicándolos posteriormente a una profundidad de 2 cm en recipientes plásticos de 6 onzas que contenían una mezcla estéril de suelo y arena (3:1), inmediatamente se realizó la inoculación del sustrato mediante la aplicación de 10 mL de las suspensiones de cada microorganismo en las concentraciones ya descritas. Durante el período de evaluación se realizó el riego de los recipientes cada tres días para conservar su humedad.

oregano and thyme oils were selected because of their potential to control *S. cepivorum*. Essential oregano oil was produced in Agrosavia (previously known as Corpoica) by Betancourt *et al.* (2012), and the other oils were obtained from commercial concentrates.

**Activity on sclerotia degradation.** To determine the ability of antagonistic microorganisms to degrade *S. cepivorum* sclerotia, a modified version of the methodology described by Clarkson *et al.* (2002), was used, by placing 100 sclerotia in 1  $\text{cm}^2$  muslin bags, which were later placed at a depth of 2 cm in 6-ounce plastic containers filled with a sterile mixture of soil and sand (3:1). This substrate was immediately inoculated with 10 mL of the suspension of each microorganism at the previously described concentrations. During the evaluation period, the containers were irrigated every other day to keep the soil moist.

After 30 days, the muslin bags were collected; 30 sclerotia were taken from each and sown in petri dishes containing PDA medium culture or Luria Bertani (LB) agar, according to the treatment that was used. Then, the petri dishes were incubated at 18 °C for six days in order to determine their viability or parasitism. The remaining sclerotia were observed under a stereoscope to identify any damage in their structure. The trial was conducted in a greenhouse at 23 °C using a completely randomized design where the experiment unit consisted of one container with one bag with three replications; sclerotia with no treatment were used as a control.

**Effect of essential oils on *S. cepivorum* in vitro growth.** Essential oils were evaluated at three concentrations (Table 1) with Tebuconazole (1 L /200 L) as a chemical control and one absolute control. For this, the PDA was supplemented with each oil at the specified concentration, placed in

Después de 30 días se colectaron las bolsas de muselina, tomando de cada una, 30 esclerocios, los cuales se sembraron en cajas Petri con PDA o agar Luria Bertani (LB) de acuerdo con el tratamiento aplicado. Posteriormente, las cajas Petri fueron incubadas a 18 °C durante seis días para determinar su viabilidad o parasitismo; los esclerocios restantes se observaron al estereoscopio para identificar daños en su estructura. El ensayo se realizó en un invernadero a 23 °C bajo un diseño completamente al azar donde la unidad experimental consistió en un recipiente con una bolsa teniendo tres repeticiones, como control se utilizaron esclerocios sin tratamiento.

**Efecto de aceites esenciales sobre el crecimiento de *S. cepivorum* in vitro.** Se evaluaron los aceites esenciales en tres concentraciones (Cuadro 1) con el fungicida Tebuconazol (1 L / 200 L) como control químico y un testigo absoluto. Para esto, se suplementó el PDA con cada aceite en la concentración determinada sirviéndolos en cajas Petri, posteriormente se realizó la siembra de un disco de agar de 5 mm con micelio de *S. cepivorum* (obtenido de un cultivo en PDA de 12 días) en el centro de la caja, se incubó a 18 °C durante 12 días, período en el que se registró el crecimiento y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de colonias en presencia de los aceites, calculado en relación al control, una vez el hongo cubrió la totalidad de la caja Petri, aplicando la fórmula de Philippe *et al.* (2012) citado por Gakuubi *et al.* (2017),  $ICM(\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$ ; donde: *dc*= Diámetro de la colonia del patógeno en el control, y *dt*= Diámetro de la colonia del patógeno en el tratamiento.

**Control de *S. cepivorum* en condiciones controladas.** La evaluación se desarrolló en macetas plásticas de 0.5 L de capacidad en la que se sembró un

petri dishes, and then sown in a 5-mm agar disk with *S. cepivorum* mycelium (obtained from a 12-day PDA culture medium) in the middle of the dish, incubated at 18 °C for 12 days, a period during which the percent inhibition of the mycelial growth (ICM) of the colonies in the presence of oils was recorded. The percentage was calculated in relation to the control once the fungus completely covered the petri dish. The calculation was made using the formula of Philippe *et al.* (2012) cited by Gakuubi *et al.* (2017),  $ICM(\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$ ; where: *dc*= diameter of the pathogen's colony in the control, and *dt*= diameter of the pathogen's colony in the treatment.

**Control of *S. cepivorum* under controlled conditions.** The evaluation was performed in 0.5-L plastic pots in which one garlic bulbil was sown. The concentration of *S. cepivorum* used was 200 sclerotia per gram of soil (selected from previous unpublished studies because the level of mortality obtained was 83%). The bulbils were immersed in the suspensions of microorganisms, essential oils and Tebuconazole for 10 min, and then sown in pots to which 20 mL of each suspension were added in drench, according to the treatment. Two

**Cuadro 1. Aceites esenciales y concentraciones evaluadas en la inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum* in vitro.**

**Table 1. Essential oils and concentrations evaluated to inhibit *Sclerotium cepivorum* in vitro growth.**

Aceites esenciales	Concentración (ppm)		
	1	2	3
Canela ( <i>Cinnamomum verum</i> )	150	200	250
Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	250	500	750
Eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> sp.)	7000	10000	15000
Limón ( <i>Citrus limon</i> )	200	400	600
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	150	200	250
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	200	400	800

bulbillo de ajo, la concentración de *S. cepivorum* utilizada correspondió a 200 esclerocios por gramo de suelo (seleccionada en estudios previos no publicados por obtener una mortalidad del 83%). Se realizó la inmersión de los bulbillos durante 10 min en las suspensiones de microorganismos, aceites esenciales y Tebuconazol, posteriormente se sembraron en las macetas y en cada una se aplicó en drench 20 mL de las suspensiones según el tratamiento. Se efectuaron dos aplicaciones más en drench con una frecuencia de 15 días, manteniendo el ensayo por 90 días (aunque el ciclo del cultivo esta entre los cinco y seis meses, la enfermedad puede presentarse en cualquier momento). El ensayo se estableció mediante un diseño completo al azar, la unidad experimental constó de ocho macetas con tres repeticiones; se contó con un testigo inoculado con el patógeno y un control sin inocular, las cuales se mantuvieron en una casa de malla con riego diario a una temperatura promedio en el día de 20 °C, las variables evaluadas fueron la incidencia de la enfermedad (número de plantas con síntomas sobre el número total de plantas multiplicado por 100) y la mortalidad de la enfermedad (número de plantas muertas sobre el número total de plantas multiplicado por 100).

**Análisis estadístico.** Para cada bioensayo los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ), empleando el software estadístico Statistix 10.0.

## RESULTADOS

**Actividad sobre la degradación de esclerocios.** A partir de los esclerocios recuperados y sembrados en los medios de cultivo se obtuvieron colonias de los antagonistas, para las cepas de *Trichoderma* se

more applications in drench were applied every 15 days and the experiment was continued for 90 days (although the crop cycle lasts between five and six months, the disease may occur at any time). The experiment was established using a completely randomized design and the experiment unit consisted of eight pots with three replications. A control inoculated with the pathogen and one non-inoculated control were kept in a mesh house and irrigated daily at an average temperature of 20 °C. The evaluated variables were disease incidence (number of plants with symptoms over the total number of plants multiplied x 100) and the disease mortality (number of dead plants over the total number of plants multiplied x 100).

**Statistical analysis.** The data of each bioassay were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) and the Statistix 10.0 statistical software.

## RESULTS

**Activity on sclerotia degradation.** Using the sclerotia that were recovered and sown in culture medium, colonies of the antagonists were obtained. In the *Trichoderma* strains, growth was observed from 100% of the sclerotia, while in the bacteria, growth was observed from 95% of the sclerotia. No *S. cepivorum* growth was observed in any of them (Figure 1A). Regarding the sclerotia of the control, they did not show infection when germinated in PDA, and *S. cepivorum* colonies were obtained. On the other hand, observation of the sclerotia of each treatment under a stereoscope showed that all the antagonists caused partial degradation of sclerotia, because of the loss of their structural stability (Figure 1B) which prevented the pathogen from growing from those structures.

observó crecimiento a partir del 100% de los esclerocios, en tanto que para las bacterias el crecimiento se observó a partir del 95% de los esclerocios, en todos los casos no se evidenció crecimiento de *S. cepivorum* (Figura 1A). En cuanto a los esclerocios del control, no presentaron infección germinando en el PDA, obteniendo colonias de *S. cepivorum* a partir de ellos. Por otra parte, la observación de los esclerocios de cada tratamiento al estereoscopio mostró que todos los antagonistas causaron la degradación parcial de los esclerocios, de acuerdo con la pérdida de su estabilidad estructural (Figura 1B) impidiendo el crecimiento del patógeno a partir de dichas estructuras.

**Efecto de aceites esenciales sobre el crecimiento de *S. cepivorum* in vitro.** En el agar PDA suplementado con los aceites de clavo, limón en las tres concentraciones y tomillo (200 y 400 ppm) se obtuvo una inhibición del crecimiento entre el 2

**Effect of essential oils on *S. cepivorum* in vitro growth.** In PDA agar supplemented with essential clove and lemon at the three concentrations, and thyme oils (200 and 400 ppm), growth inhibition was 2-12%, with no significant differences compared to the control. Conversely, in PDA agar supplemented with essential eucalyptus and oregano oils (200 and 250 ppm) and Tebuconazole, growth inhibition was higher than 92%; with essential cinnamon, oregano (150 ppm) and thyme oils (800 ppm), growth inhibition was 50-86% (Figure 2).

**Control of *S. cepivorum* under controlled conditions.** The evaluated treatments showed they could control the pathogen, except for essential oils, particularly eucalyptus oil, which had a negative effect on bulbils (data not shown), apparently due to a phytotoxic effect that caused necrosis on the tissue and affected germination. When oregano oil

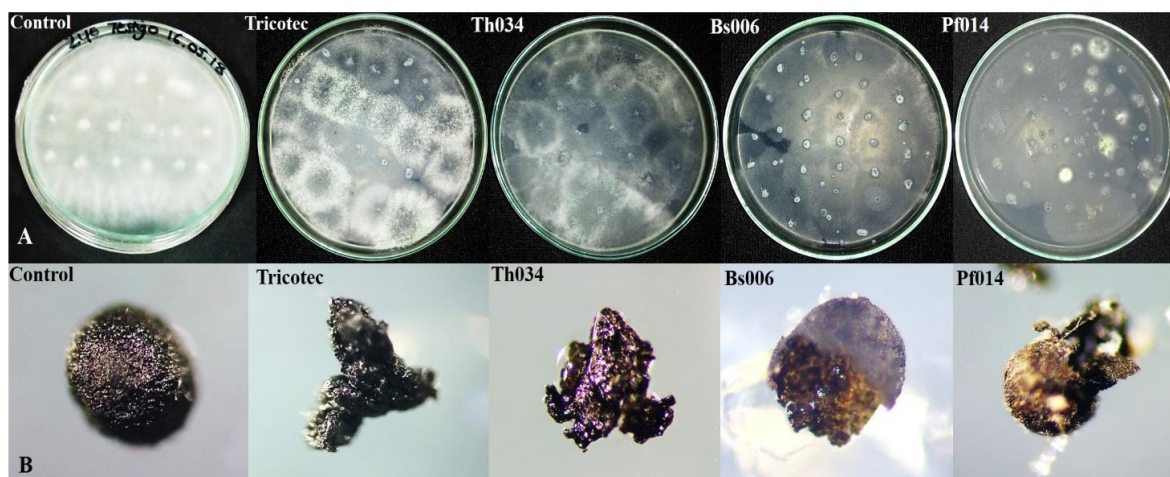


Figura 1. A. Crecimiento de los antagonistas a partir de los esclerocios inoculados. B. Degradación de los esclerocios por los antagonistas. Control (tratamiento sin aplicación de antagonistas), Tricotec (biofungicida a base de *T. koningiopsis* cepa Th003), Th034 (*T. asperellum* cepa Th034), Bs006 (*B. amyloliquefaciens* cepa Bs006), Pf014 (*P. fluorescens* cepa Pf014).

Figure 1. A. Antagonist growth from inoculated sclerotia. B. Sclerotia degradation caused by the antagonists. Control (treatment with no application of antagonists), Tricotec (biofungicide based on *T. koningiopsis* Th003 strain), Th034 (*T. asperellum* Th034 strain), Bs006 (*B. amyloliquefaciens* Bs006 strain), Pf014 (*P. fluorescens* Pf014 strain).

y 12%, sin presentar diferencias significativas con respecto al control; en contraste, con eucalipto, orégano (200 y 250 ppm) y Tebuconazol, la inhibición superó el 92%, con los aceites de canela, orégano (150 ppm) y tomillo (800 ppm) se inhibió el crecimiento entre un 50 y 86% (Figura 2).

was applied, the performance was similar to the pathogen's treatment, and even caused significant statistical differences (Figure 3).

The lowest level of disease incidence (21%) was obtained with *T. asperellum* Th034, as well as the greatest amount of healthy or asymptomatic

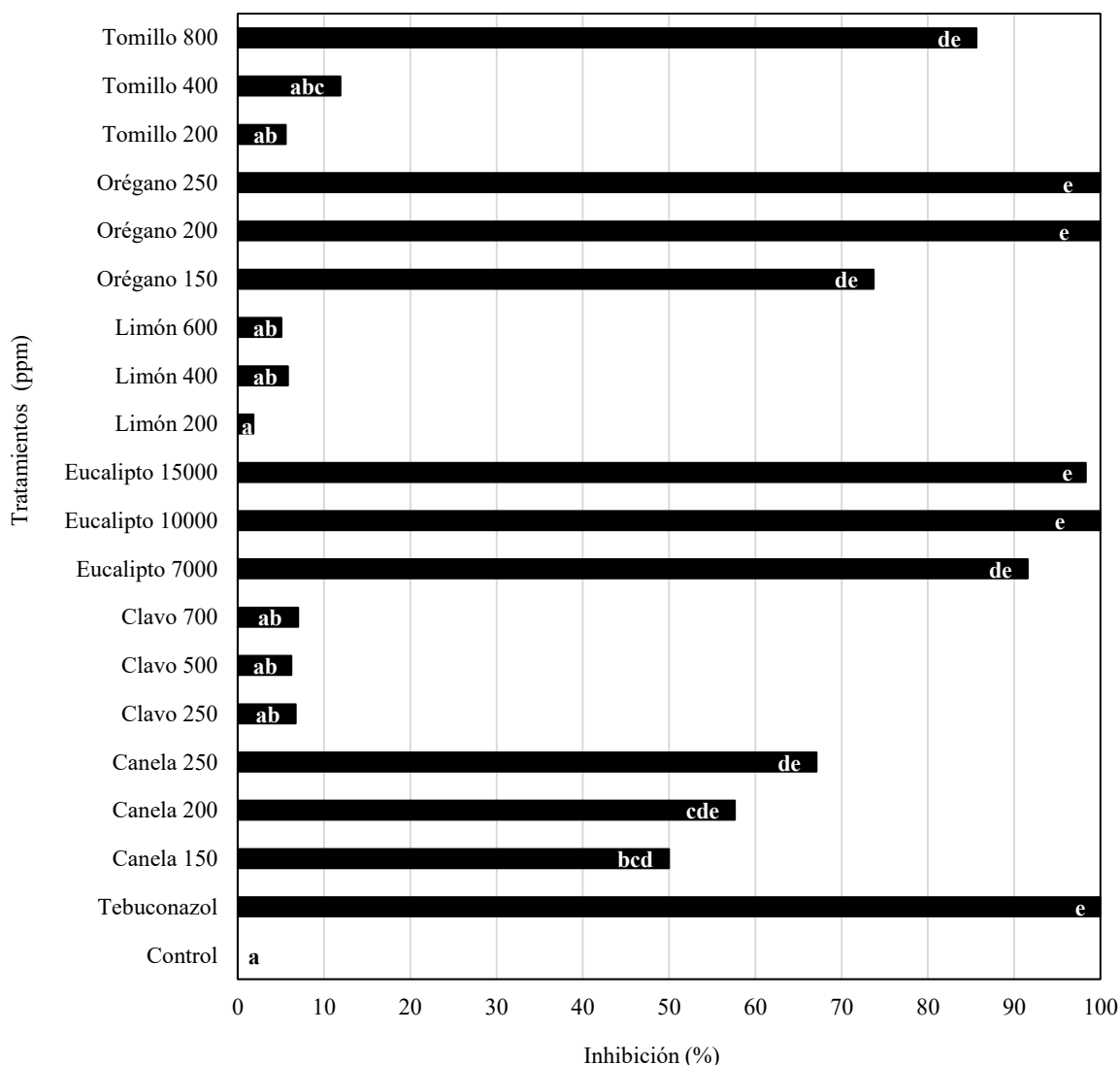


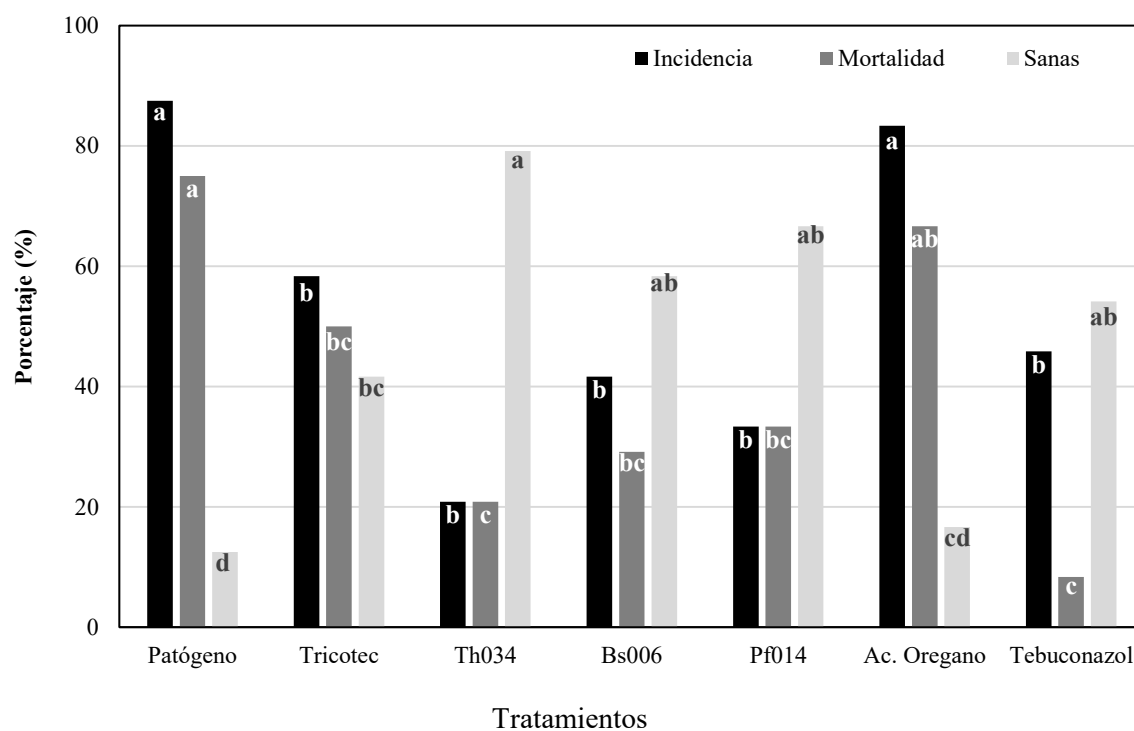
Figura 2. Inhibición del crecimiento de *S. cepivorum* en medio suplementado con aceites esenciales después de 12 días de incubación a 18 °C. Valores con las mismas letras no presentan diferencias significativas para la prueba de Tukey (\*= $P>0.05$ ).

Figure 2. Inhibition of *S. cepivorum* growth in a culture medium supplemented with essential oils after 12 days of incubation at 18 °C. Values with the same letters do not have significant differences according to Tukey's test (\*= $P>0.05$ ).



**Control de *S. cepivorum* en condiciones controladas.** Los tratamientos evaluados, mostraron actividad de control del patógeno a excepción de los aceites esenciales, particularmente el aceite de eucalipto, en el cual se mostró un efecto negativo sobre los bulbillos (Datos no mostrados), al parecer por un efecto fitotóxico que provocó necrosis del tejido afectando su germinación. Con las aplicaciones del aceite de orégano se obtuvo un comportamiento similar al observado en el tratamiento patógeno, incluso presentando diferencias estadísticas significativas (Figura 3).

plants (79%) (Figure 3), while when bacteria were applied, the performance was similar to that of the tebuconazole application, with no significant differences between them, though in numerical terms the disease incidence was lower and the percentage of healthy plants increased with the bacteria (Figure 3). On the other hand, the treatment with *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec®) was the least effective for reducing the disease incidence and mortality (Figure 3). The plants of the control that were not inoculated did not show signs or symptoms of white rot.



**Figura 3. Incidencia, mortalidad y de plantas sanas de ajo por tratamiento después de 90 días de evaluación. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (\*= P>0.05).**

**Figure 3. Incidence, mortality and healthy garlic plants per treatment after being evaluated for 90 days. Columns with the same letter are not significantly different according to Tukey's test (\*= P>0.05).**

La menor incidencia de la enfermedad con un 21% se obtuvo con las aplicaciones de *T. asperellum* Th034, así como la mayor cantidad de plantas sanas o asintomáticas con un 79%, (Figura 3); mientras que, con las aplicaciones de las bacterias se obtuvo un comportamiento similar a las aplicaciones de Tebuconazol, sin presentar diferencias significativas entre sí, aunque numéricamente la incidencia de la enfermedad fue menor y el porcentaje de plantas sanas mayor en las bacterias (Figura 3). Por otra parte, el tratamiento con *T. koningiopsis* Th003 (Tricotec®) fue el menos eficiente en la reducción de la incidencia y mortalidad de la enfermedad (Figura 3). Las plantas del control sin inocular no presentaron signos o síntomas de la pudrición blanca.

## DISCUSIÓN

La degradación de los esclerocios es una característica por considerar al momento de seleccionar un microorganismo antagonista ya que dichas estructuras pueden persistir durante décadas en los suelos limitando la producción y rendimiento de los cultivos de aliáceas (Metcalf *et al.*, 2004; Velásquez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015). Esta acción está relacionada principalmente con la capacidad del antagonista para producir metabolitos secundarios tóxicos y enzimas extracelulares, las cuales le posibilitarán acceder a los esclerocios como una fuente de nutrientes; en especies del género *Trichoderma* esta acción se relaciona con el micoparasitismo, involucrando la producción y secreción de enzimas como la  $\beta$  1-3 glucanasa,  $\beta$  1-6 glucanasa, N-acetylhexosaminidasa, polisacaridasas, proteasas y lipasas, las cuales intervienen en la degradación de la pared celular y su producción se ha reportado en cepas de *T. asperellum* y *T. koningiopsis* (Vinale *et al.*, 2008; Schuster y Schmoll, 2010;

## DISCUSSION

Sclerotia degradation is a characteristic considered when selecting an antagonistic microorganism, since sclerotia can survive in the soil for decades, thereby limiting Alliaceae production and crop yields (Metcalf *et al.*, 2004; Velásquez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015). This action is related mainly to the antagonist's ability to produce toxic secondary metabolites and extracellular enzymes, which will make it possible for it to access to sclerotia as a source of nutrients. In species of *Trichoderma* genus, this action is related to micoparasitism, involving production and secretion of enzymes, including  $\beta$  1-3 glucanase,  $\beta$  1-6 glucanase, N-acetylhexosaminidase, polysaccharides, proteases and lipases, which are involved in cell wall degradation and their production has been reported in *T. asperellum* and *T. koningiopsis* strains (Vinale *et al.*, 2008; Schuster and Schmoll, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015; Fuga *et al.*, 2016).

Similarly, *B. amyloliquifaciens* and *P. fluorescens* are known to produce  $\beta$  glucanases and chitinases, and *B. amyloliquifaciens* produces lipopeptides, including iturines, fengicines or fatty acids and phenols, for example, chloroxylenol, pentadecanoic acid, hexadecanoic acid, heptadecanoic acid, octadecanoic acid and pyrrole, with antifungal action against pathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* or *F. oxysporum*. The species *P. fluorescens* is known to produce hydrocyanic acid, pyrrolnitrin and siderophores responsible for antifungal activity on *Sclerotium rolfsii*, among others (Ganeshan and Arthikala, 2005; Shafi *et al.*, 2017; Vinodkumar *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2018).

In this regard, white rot control in this study could be related to the parasitism of sclerotia in the soil eventually mediated by the production of

Mukherjee *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015; Fuga *et al.*, 2016).

Igualmente, para *B. amyloliquefaciens* y *P. fluorescens* se conoce que producen  $\beta$  glucanasas y quitinasas; adicionalmente se sabe que *B. amyloliquefaciens* produce lipopéptidos como iturrinas y fengicinas o ácidos grasos y fenoles como cloroxilenol, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico y pirrol, con acción antifúngica contra patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* o *F. oxysporum*. En *P. fluorescens* se conoce que esta especie produce ácido cianhídrico, pyrrolnitrin y sideróforos responsables de la actividad antifúngica entre otros sobre *Sclerotium rolfsii* (Ganeshan y Arthikala, 2005; Shafi *et al.*, 2017; Vinodkumar *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2018).

En este sentido, es posible que el control de la pudrición blanca en este trabajo esté relacionada con el parasitismo de los esclerocios en el suelo mediada eventualmente por la producción de metabolitos secundarios, particularmente para *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034 se ha demostrado su actividad de control sobre patógenos que producen esclerocios; por ejemplo, se observó que el tratamiento previo a la siembra de tubérculos de papa con presencia de esclerocios de *Rhizoctonia solani* con dos formulaciones a base de estos hongos redujo la incidencia del patógeno en un 80%, en comparación con los tubérculos no tratados, cuya incidencia fue del 100% (Beltrán *et al.*, 2010).

De mismo modo, en el control de *S. sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* mediante el uso de Tricotec® se redujo en un 34% la incidencia del moho blanco en cultivos de lechuga en condiciones comerciales (Moreno *et al.*, 2010); para *T. asperellum* Th034 Smith *et al.* (2013) determinaron su capacidad para degradar esclerocios de *S. sclerotiorum*. Por otra parte, se ha demostrado que *B. amyloliquefaciens* Bs006 y *P. fluorescens* Pf014 presentan actividad de control sobre *F. oxysporum* en plantas

secondary metabolites. Particularly, it has been demonstrated that *T. koningiopsis* Th003 and *T. asperellum* Th034 have control activity on pathogens that produce sclerotia. For example, it was observed that a pre-planting treatment of potato tubers infected with *Rhizoctonia solani* sclerotia with two formulations based on these fungi reduced the incidence of the pathogen by 80 % compared to non-treated tubers, whose incidence was 100 % (Beltrán *et al.*, 2010).

Similarly, in the control of *S. sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* using Tricotec® the incidence of white mold was reduced by 34% in commercial lettuce crops (Moreno *et al.*, 2010). For *T. asperellum* Th034, Smith *et al.* (2013) determined its ability to degrade *S. sclerotiorum* sclerotia. On the other hand, it has been demonstrated that *B. amyloliquefaciens* Bs006 and *P. fluorescens* Pf014 have control activity on *F. oxysporum* in cape gooseberry plants and increase their survival in the field, making it possible to harvest their fruits (Díaz *et al.*, 2012).

Regarding essential oils, it is necessary to bear in mind that their effect can be different on mycelium and sclerotia due to the resistance of these structures. Different studies have demonstrated the inhibitory effect that the essential oils have on phytopathogens. For example, Ranasinghe *et al.* (2002) described *Colletotrichum musae*, *Lasioidiplodia theobromae* and *Fusarium proliferatum* inhibition using clove oil at concentrations of 300-1100 ppm. Likewise, Barrera *et al.* (2009) reported 100 % inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* using clove, thyme and cinnamon oils at concentrations of 100, 150, 200, 250 and 300 ppm.

Although *S. cepivorum* growth was inhibited under *in vitro* conditions, no control of the disease was observed in the bioassay conducted in soil, particularly when oregano oil was used. This may be due to the fact that the oil did not have an effect on the sclerotia and that, when germination

de uchuva, aumentando en condiciones de campo la supervivencia de las plantas, permitiendo obtener cosecha a partir de estas (Díaz *et al.*, 2012).

Respecto a los aceites esenciales es necesario tener en cuenta que el efecto puede ser diferente sobre el micelio y en los esclerocios dada la resistencia de estas estructuras. Diferentes estudios han demostrado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de fitopatógenos de los aceites esenciales utilizados en la presente investigación, por ejemplo, Ranasinghe *et al.* (2002) describieron la inhibición de *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium proliferatum* mediante el uso del aceite de clavo en concentraciones de entre 300 - 1100 ppm; del mismo modo, Barrera *et al.* (2009) reportaron la inhibición del 100% sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* con los aceites de clavo, tomillo y canela en concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm.

A pesar de que en condiciones *in vitro* se observó la inhibición del crecimiento de *S. cepivorum*, en el bioensayo en el suelo no se evidenció el control de la enfermedad particularmente con las aplicaciones del aceite de orégano; es posible que esto se deba a que el aceite no tuvo un efecto sobre los esclerocios y que, al germinar, posiblemente el aceite ya se había degradado en el suelo. En contraste, el efecto fitotóxico observado con el aceite esencial de eucalipto en la concentración aplicada lo hace inviable para su uso en el cultivo de ajo, si bien se conoce que este aceite presenta propiedades pesticidas de amplio espectro ya que diferentes trabajos han demostrado su actividad como compuesto antimicrobiano afectando tanto bacterias como hongos, así como plaguicida, acaricida o herbicida (Batish *et al.*, 2008; Haouel *et al.*, 2015; Tomazoni *et al.*, 2017); en este sentido, es necesario evaluar

occurrido, el aceite ya había posiblemente degradado en el suelo. En contraste, el fitotóxico efecto observado con el aceite esencial de eucalipto, a la concentración aplicada, hace que no sea viable para los cultivos de ajo, aunque se sabe que este aceite tiene propiedades pesticidas de amplio espectro, ya que diferentes estudios han demostrado su actividad como compuesto antimicrobiano que afecta tanto a bacterias como a hongos, y como pesticida, acaricida y herbicida (Batish *et al.*, 2008; Haouel *et al.*, 2015; Tomazoni *et al.*, 2017). En este respecto, es necesario evaluar otras concentraciones o métodos de aplicación antes de usarlo como alternativa para controlar la roya blanca.

Aunque los resultados de este estudio muestran que los antagonistas reducen el impacto negativo de la enfermedad, antes de usarlos en el campo, se deben realizar más estudios para determinar los métodos y la frecuencia de aplicación, particularmente durante la preparación del suelo, con el fin de reducir el patógeno en el inóculo, de acuerdo con los resultados obtenidos por Velásquez *et al.* (2012), quien demostró que la esclerotia puede moverse desde áreas profundas (20 a 40 cm) hasta la capa superior, y viceversa, durante la preparación del suelo.

## CONCLUSIONS

Aunque los aceites esenciales de orégano (200 y 250 ppm) y de eucalipto inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum* en experimentos *in vitro*, cuando se aplicaron a los bulbos y al suelo, el aceite de orégano tuvo un rendimiento similar al del control del patógeno, mientras que el aceite de eucalipto tuvo un efecto tóxico que afectó la germinación de los bulbos. Por el contrario, los microorganismos antagonistas redujeron la incidencia y la mortalidad de la enfermedad, y *T. asperellum* Th034 resultó ser el más efectivo.

otras concentraciones o formas de aplicación para considerar su uso como alternativa de control de la pudrición blanca.

Si bien los resultados muestran que los antagonistas reducen el impacto negativo de la enfermedad, para su uso en campo, es necesario realizar estudios que permitan determinar las formas y frecuencias de aplicación, particularmente su incorporación durante la etapa de preparación del terreno, con el objetivo de reducir el inóculo de patógeno, esto de acuerdo con los resultados obtenidos por Velásquez *et al.* (2012), quienes demostraron el potencial de movimiento de los esclerocios de zonas profundas (20 a 40 cm) a la capa superior y viceversa, durante la preparación del suelo.

## CONCLUSIONES

A pesar de que los aceites esenciales de orégano (200 y 250 ppm) y eucalipto inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum* en ensayos *in vitro*, al ser aplicados en los bulbillos y al suelo, el primero presentó un comportamiento similar al testigo patógeno mientras que el segundo presentó un efecto tóxico que afectó la germinación del bulbillito. En contraste con el uso de los microorganismos antagonistas se redujo la incidencia y mortalidad de la enfermedad destacando sobre todos a *T. asperellum* Th034 como el más eficiente.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA por la financiación del proyecto “Generación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de la pudrición blanca en aliáceas” que permitió el desarrollo del presente trabajo.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA for funding the project “Generación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de la pudrición blanca en aliáceas” that made it possible to conduct this study.

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

## LITERATURA CITADA

- AGRONET, 2019. Red de información y comunicación del sector Agropecuario Colombiano. Recurso en línea. Área, producción y rendimiento nacional por cultivo. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>. (Consulta octubre, 2019).
- Amin M, Tadele S and Thangavel S. 2014. White rot (*Sclerotium cepivorum*-Berk) an aggressive pest of onion and garlic in Ethiopia: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 6(1): 6-15. <https://doi.org/10.5897/JABSD2013.0210>
- Barrera L, Garduno C and García L. 2009. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal* 8(1): 17-21. <https://doi.org/10.3923/ppj.2009.17.21>
- Batish D, Singh H, Kohli R and Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256(12): 2166-2174. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Beltrán CR, Moreno CA, Blanco P, Villamizar L and Cotes AM. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP). *Bulletin*, 78, 223-227. [https://www.iobc-wprs.org/members/shop\\_en.cfm?mod\\_Shop\\_detail\\_producto=33](https://www.iobc-wprs.org/members/shop_en.cfm?mod_Shop_detail_producto=33)
- Betancourt LL, Ariza CJ and Afanador G. 2012. Efectos de la suplementación con aceites esenciales de Orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde. *Rev Colomb Cienc Pecu* 25 (2): 240-251. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324751>



- Clarkson JP, Payne T, Mead A and Whipps J.M. 2002. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology* 51(6): 735-745. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00787.x>
- Díaz A, Smith A, Mesa P and Zapata J. 2012. Avances en el control biológico de *Fusarium oxysporum*. Pp. 71-81. En: Díaz A. (Ed.), Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Bogotá, Colombia. 82 p. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12610/64218\\_64911.pdf?sequence=1#page=71](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12610/64218_64911.pdf?sequence=1#page=71)
- Fuga CAG, Lopes EA, Vieira BS y da Cunha WV. 2016. Efficiency and compatibility of *Trichoderma* spp., and *Bacillus* spp., isolates on the inhibition of *Sclerotium cepivorum* Científica 44(4):526-531. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n4p526-531>
- Gakuubi MM, Maina AW and Wagacha JM. 2017. Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* dehn., against selected *Fusarium* spp. *International journal of microbiology* 2017:1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/8761610>
- Ganeshan, G and Arthikala M. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*. 1(3):123-134. <https://doi.org/10.1080/17429140600907043>
- Gurjar MS, Ali S, Akhtar M and Singh KS. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* 3(3): 425-433. <https://doi.org/10.4236/as.2012.33050>
- Haouel S, Hedjal-Chebheb M, Kellouche A, Khoudja M.L, Boudabous A and Ben Jemâa M. 2015. Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using Eucalyptus essential oils. *Industrial Crops and Products*. 74. 551-556. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.072>
- Hussain W, Elzaawely AA, El Sheery NI, Ismail AA and El-Zahaby HM. 2017. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. *Environment, Biodiversity and Soil Security* 1(2017)101-107. <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2017.1547.1008>
- Kottarachchia NS, Sammania A, Kelaniyangoda DB and Samarasekara R. 2012. Anti-fungal activity of essential oils of Ceylon Eucalyptus species for the control of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(17): 2026-2035. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.720469>
- Ley N, Márquez I, Carrillo JA, León J, Cruz I, García RS and Allende R. 2018. Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Lourenço V Jr, Vieira BS, Lopes EA and Villalta ON. 2018. Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: Current knowledge and future directions for Brazil. *Científica* 46(3), 241-256. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2018v46n3p241-256>
- Metcalf DA, Dennis JC and Wilson CR. 2004. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Disease* 88(3): 287-291. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.3.287>
- Moreno CA, Cotes AM, Smith A, Beltrán C, Villamizar L, Gómez M and Santos A. 2010. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12768>
- Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg, G and Zeilinger S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian journal of microbiology*. 52(4): 522-529. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0308-5>
- Pérez ML, Villalpando MJJ, Castañeda CC and Ramírez MR. 2009. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(1):11-17. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a2.pdf>
- Pérez L, Belmonte JR, Núñez HG, Guzmán R. and Mendoza B. 2015. Sensibilidad *in vitro* de dos especies de *Sclerotinia* spp., y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 256-267. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00256-en.pdf>
- Plata A, Martínez L, Dos Santos M, Fernandes F, Wilcken C, Soares M, Serrão J and Zenuncio J. 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific reports*. 7: 46406 <https://doi.org/10.1038/srep46406>
- Prato AI. 2016. Evaluación financiera de ajo (*Allium sativum* L.) morado nacional y peruano en el altiplano Cundiboyacense, Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17(1):43-53. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:460](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:460)
- Ramírez H, Castro LN and Martínez E. 2016. Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). *Revista Salud y Administración*. 3(8): 39-47. [http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4\\_Efectos\\_Terapeuticos\\_Ajo.pdf](http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf)
- Ranasinghe L, Jayawardena B and Abeywickrama K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*. 35(3):208-211. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01165.x>
- Santoyo G, Orozco M and Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* 22(8): 855-872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Schuster A and Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology* 87(3): 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

- Shafi J, Tian H and Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31(3): 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shalaby M.E, Ghoniem K.E and El-Diehi M.A. 2013. Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of Microbiology* 63(4):1579-1589. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0621-1>
- Smith A, Beltrán C, Kusunoki M, Cotes A, Motohashi K, Kondo T and Deguchi M. 2013. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of general plant pathology*, 79(1): 74-85. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1>
- Tomazoni E, Pauletti G, Rute R, Sidnei M and Schwambach J. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*. 223: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>
- Velásquez R, Reveles M, Medina MM and Amador MD. 2012. Efecto de la Preparación del Suelo en la Dispersión de Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(2): 150-154. [http://rmf.smf.org.mx/Contenido\\_Vol\\_30\\_2\\_2012.html](http://rmf.smf.org.mx/Contenido_Vol_30_2_2012.html)
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E, Marra R, Woo S and Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vinodkumar S, Nakkeeran S, Renukadevi P and Malathi VG. 2017. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in microbiology* 8:446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00446>

# Pathogenic fungi associated to commercial seed of mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*

## Hongos patogénicos asociados a semilla comercial de variedades mexicanas de *Bouteloua curtipendula*

Adrián Raymundo Quero-Carrillo, Alicia Zárate-Ramos, <sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, CP 56230; Leticia Robles-Yerena, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 55740; Cristián Nava-Díaz<sup>1</sup>, Leonor Miranda-Jiménez\*<sup>1</sup>, Sergio González-Muñoz<sup>1</sup>, \*Autor para correspondencia: lmirandaj@colpos.mx

Recibido: 06 de Febrero, 2020.

Aceptado: 18 de Abril, 2020.

Quero-Carrillo AR, Zárate-Ramos A, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Miranda-Jiménez L and González-Muñoz S. 2020. Pathogenic fungi associated to commercial seed of mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 198-214.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-4

Primera publicación DOI: 01 de Mayo, 2020.

First DOI publication: May 01, 2020.

**Resumen.** La semilla es una importante forma de diseminación de patógenos; para determinar aquellos asociados a semilla comercial de variedades de pasto Banderita: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith, NdeM-La resolana, se analizaron tres tipos de propágulo: espiguillas completas (cariópside + brácteas accesorias; M<sub>1</sub>), cariópside únicamente con lemas (M<sub>2</sub>) y cariópsides limpios (M<sub>3</sub>), provenientes de lotes del Valle del Mezquital, Hidalgo, cosechados en 2017. Para promover el desarrollo de hongos, se sembraron espiguillas (M<sub>1</sub>) en cámara de humedad; mientras

**Abstract.** Plant seeds represent a main source for pathogen dissemination; in order to determine pathogens associated with propagules of five varieties of sideoats gramma: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith, NdeM-La resolana, three different kind of propagules were analyzed, from seed (spikelets) available from commercial production fields located at Valle del Mezquital, Hidalgo: spikelets (caryopsis + accessory bracts; M<sub>1</sub>), caryopsis + lemma (M<sub>2</sub>) and pure caryopsis (M<sub>3</sub>). Seed was harvested during 2017. In order to promote the expression of fungus growth already present on the propagule, spikelets (M<sub>1</sub>) were sown within a humidity chamber; while M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>, sown on PDA culture media (five propagules per Petri dish, 60 dishes per variety); growth material was later sown on specific media for identification. Isolated results were identified through growth traits on culture media, morphology traits and molecular markers. *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* was observed for 67% of the samples, *Fusarium scirpi* and *F. incarnatum*, at 24%, and *Bipolaris cynodontis*, in

que M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> fueron sembradas en medio PDA (cinco propágulos por caja Petri y 60 cajas por variedad); posteriormente, los crecimientos se aislaron en medios selectivos. Los aislados se identificaron por características del cultivo, morfológicas y moleculares. Se obtuvieron 51 aislamientos en los tres tipos de propágulo y variedades; los cuales, se asociaron a *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* (67% de frecuencia), *Fusarium scirpi* y *F. incarnatum* (24%) y *Bipolaris cynodontis* (9%). Ninguna de estas especies ha sido reportada anteriormente en México para semilla comercial de *B. curtipendula*. Con lo anterior, se abre un panorama de opciones para futuros estudios de patogenicidad de los hongos aislados y en consecuencia el manejo sanitario de la semilla producida.

**Palabras clave:** Banderita, calidad de semilla, sanidad de semilla.

La semilla es el vehículo (sexual y asexual), por excelencia, para la propagación de cultivos; lo anterior, como portadoras de características genéticas y morfológicas destacadas para la producción agropecuaria; sin embargo, pueden transportar organismos patógenos, lo que afecta la eficiencia productiva (Arriagada, 2012; Lamichhane *et al.*, 2020). El efecto negativo de la asociación patógeno-semilla puede limitar la densidad de plantas, materia prima, alimentos y afectar seriamente tanto la salud humana y animal (Afzal *et al.*, 2019). La inspección y análisis de semilla permite la detección oportuna de los patógenos asociados y con ello, la oportunidad de tomar medidas de manejo. Entre los patógenos asociados a semillas forrajeras, los hongos poseen mayor importancia; lo anterior, dado que, además de afectar la densidad vegetal al establecimiento, rendimiento por enfermedades, también provocan alteraciones en parámetros de calidad de la cosecha:

9%. To date, none of these pathogenic species have been reported in Mexico for commercial seed of *B. curtipendula*. These findings open a wide spectrum for sanitary management of produced seed for this plant species.

**Key words:** sideoats gramma, seed health, seed quality.

Seed is the major form (sexual and asexual) of crop dissemination. Seeds carry genetic and morphological traits that are essential for livestock and agricultural production. However, seeds can also carry pathogenic organisms, which can affect production efficiency (Arriagada, 2012; Lamichhane *et al.*, 2020). The negative effect of the seed-pathogen association can limit plant density, raw materials, food, and seriously affect both human and animal health (Afzal *et al.*, 2019). Seed inspection and analysis allow the timely detection of the causal pathogens thus providing the opportunity to take management measures. Among the pathogens associated with seed of fodder grass species, fungi are the most important because, in addition to affecting plant density at establishment and yield due to diseases, they also alter crop parameters, including stem lignification, lower digestibility, free amino acid content in roots and leaves of the affected plants, mycotoxins that cause livestock diseases, among other problems (Pirelli *et al.*, 2016). Plant health along with other variables (viability, germination, purity and vigor) determine the quality of a seed lot. Most of the specialized literature indicates that fungi genera such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Pestalotia* and *Rhizopus*, include species associated with

lignificación de tallos, disminución de digestibilidad, contenido de aminoácidos libres en raíz y hojas de plantas afectadas, micotoxinas causantes de enfermedades en el ganado, entre otros problemas (Pirelli *et al.*, 2016). La fitosanidad junto con otras variables (viabilidad, germinación, pureza y vigor) determinan la calidad de un lote de semilla. La mayor parte de la literatura especializada indica que géneros de hongos como: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Pestalotia* y *Rhizopus*, incluyen especies asociadas a la semilla, en campo y almacén (Lezcano *et al.*, 2007). Los beneficios de una semilla con buen control sanitario contra patógenos aéreos y del suelo incluyen mejor emergencia, altura y vigor de planta; además, mayor biomasa aérea y radical de esta (Lamichhane *et al.*, 2020).

En México, cerca del 90% de las semillas forrajeras son importadas (Quero *et al.*, 2017). La necesidad de recursos genéticos forrajeros nacionales que garanticen calidad, alta persistencia y adaptación a condiciones regionales específicas (Quero *et al.*, 2007) hace necesarios estudios de calidad de semilla producida en el país; lo anterior, con el fin de otorgarle calidad sanitaria en conjunto con la calidad genética y comercial y promover la recuperación del mercado nacional con semilla de la mejor calidad. El establecimiento de praderas de alto riesgo en temporal semiárido implica su manejo con elevada incertidumbre inherente al clima y donde la calidad biológica y sanitaria de semilla es, las más de las veces, el único componente que se puede manejar con certidumbre (Quero-Carrillo *et al.*, 2014). Pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* es una especie nativa de México árido y semiárido, con buena apetencia para el ganado, alta calidad nutricional y ampliamente demandado en resiembras de praderas y pastizales de zonas áridas y semiáridas

seed, in the field and in the warehouse (Lezcano *et al.*, 2007). The benefits of seed with good sanitary control against airborne and soil pathogens include better emergence, plant height and vigor, as well as greater aerial and root biomass (Lamichhane *et al.*, 2020).

In Mexico, nearly 90% of fodder grass species seeds is imported (Quero *et al.*, 2017). The need for national genetic resources for forage species that guarantee quality, high persistence and adaptation to specific regional conditions (Quero *et al.*, 2007), makes it necessary to conduct studies on seed produced in Mexico to assure sanitary, genetic and commercial quality, and to promote the recovery of the national market with seed of best quality. The establishment of high-risk prairies under semiarid rainfed areas implies management with high uncertainty due to the climate and where the biological and sanitary quality of seed is, most of the time, the only component that can be managed with certainty (Quero-Carrillo *et al.*, 2014). Sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) is a species native to Mexico's arid and semiarid areas showing good palatability for grazing cattle, has high nutritional quality and is in high demand for reseeding prairies and pasturelands in arid and semiarid areas (Morales *et al.*, 2009). Therefore, the objective of the present study was to identify pathogenic fungi associated with sideoats gramma seed that is commercially produced in Valle del Mezquital, Hidalgo.

## MATERIALS AND METHODS

**Genetic material.** The evaluated varieties correspond to five apomictic genetic materials of sideoats gramma registered by Colegio de Postgraduados in 2017 and 2018, available for research at the Forages area of the Livestock



(Morales *et al.*, 2009). Por consiguiente, objetivo del presente trabajo fue identificar hongos patógenos asociados a las semillas del pasto Banderita producida comercialmente en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material genético.** Las muestras evaluadas pertenecen a cinco materiales genéticos apomícticos de pasto Banderita, registrados por el Colegio de Postgraduados, durante 2017 y 2018, disponibles para investigación en el área de Forrajes del Programa de Ganadería. Se evaluaron las variedades noveles, de las cuales, se carece de información sobre su calidad sanitaria: 1) “NdeM-La Zarca”, 2) “NdeM-303”, 3) “NdeM-5”, 4) “NdeM-Zenith” y 5) “NdeM-La Resolana”. La semilla se cosechó al centro de praderas exclusivas para producción comercial de semilla, regadas con aguas del río Tula, libres de pastoreo, en áreas con, al menos, un año de establecidas y con superficies de una (NdeM-5, NdeM-Zenith; NdeM-La Resolana) y 10 ha (NdeM-La Zarca, NdeM-303), localizadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo y cosechada manualmente en otoño de 2017. Este valle se localiza a 2000 msnm delimitado por sierras al norte y noreste, que impiden el paso de masas de aire húmedo provenientes del Golfo de México. El clima es seco con lluvias en verano clasificado como tipo BSkwg y BShwg. Precipitación anual entre 500 y 600 mm. Temperaturas mínima de -10 °C en invierno y máxima de 39.5 °C, en verano (CONAGUA, 2018).

**Aislamiento y purificación de hongos.** El trabajo fue realizado en el Departamento de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo-Texcoco, Estado de México, durante el 2018. Las semillas de cada variedad se

Program. These novel varieties were evaluated for which information about their sanitary quality is not available: 1) “NdeM-La Zarca”; 2) “NdeM-303”; 3) “NdeM-5”; 4) “NdeM-Zenith”; and 5) “NdeM-La Resolana”. The seed was manually harvested (Autumn, 2017) in the middle of plots that are used only for commercial seed production and are irrigated with water from the Tula River, where no cattle are grazed, in sites that were established at least one year ago, with surfaces of one (NdeM-5, NdeM-Zenith; NdeM-La Resolana) and 10 ha (NdeM-La Zarca, NdeM-303), located in Valle del Mezquital, Hidalgo. Valle del Mezquital is located at 2000 masl and surrounded by northern and northeastern mountain ranges that keep humid air masses from the Gulf of Mexico from entering the valley. The weather is dry with summer rains classified as BSkwg and BShwg type. Annual rainfall is 500-600 mm. The minimum temperature is -10 °C in winter and the maximum 39.5 °C in summer (CONAGUA, 2018).

**Fungi isolation and purification.** The study was conducted in the Phytosanitary-Phytopathology Department of Colegio de Postgraduados, Montecillo-Texcoco *Campus*, State of Mexico, in 2018. The seeds of each variety were separated into three types of samples or propagules:  $M_1$ -spikelets (accessory bracts + caryopses),  $M_2$ -caryopsis with lemmas and clean  $M_3$ -caryopsis (without accessory bracts). Each type of propagule ( $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ ) and variety was placed in 60 Petri dishes. The isolates were obtained:  $M_1$ , not disinfested, using the blotting paper and freezing method (Warham *et al.*, 1998).  $M_2$  and  $M_3$  were disinfested in a 1.5% sodium hypochlorite solution for 2 min, rinsed three times with sterile distilled water, dried with sterile absorbent paper, and five propagules per Petri dish were sown in Bioxon® PDA culture medium (potato-dextrose-agar; Crous *et al.*, 2009).

separaron en tres tipos de muestra o propágulo:  $M_1$ -espiguillas (brácteas accesorias + carióspsides),  $M_2$ -carióspsides con lemas y  $M_3$ -carióspsides limpios (sin brácteas accesorias). Se sembraron 60 cajas Petri de cada tipo de propágulo ( $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ ) y variedad. Los aislamientos se obtuvieron:  $M_1$ , sin desinfectar por el método de papel secante y congelación (Warham *et al.*, 1998). En el caso de  $M_2$  y  $M_3$ , fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio a 1.5% por dos min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron cinco propágu- los por caja Petri en medio de cultivo PDA (papa- dextrosa-agar; Crous *et al.*, 2009) marca Bioxon®. Las cajas se incubaron a  $24 \pm 2$  °C por ocho días o hasta el desarrollo de estructuras. Posteriormente, se realizaron los sub-cultivos necesarios en medio de cultivo PDA, con el fin de iniciar el proceso de purificación con la técnica de punta de hifa y monospóricos (Gilchrist *et al.*, 2005). Para calcular la frecuencia de aislamiento por género y tipo de muestra se utilizó la siguiente ecuación: Frecuencia (%) = (No. de aislados del género identificado / total de aislados analizados por tipo de muestra) \* 100 (Mariscal *et al.*, 2017).

**Caracterización morfológica.** De los aislamientos obtenidos, posteriormente se sembraron en medios selectivos de cultivo, de acuerdo a los posibles gé- neros obtenidos de las siembras. Los aislamientos del género *Alternaria* se sembraron en cajas Pe- tri con medio de cultivo PDA,  $V_8$  (Agar-jugo de verduras®) y PCA (Papa-Zanahoria-Agar); los del género *Fusarium* en medio PDA, CLA (Agar- clavel) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer-Agar); y finalmente, los del género *Bipolaris* solo en me- dio PDA. Las cajas se incubaron a temperatura de  $24 \pm 2$  °C con 12 horas luz/oscuridad, durante 14 días. Para la identificación morfológica se realizó con base a color de colonia, forma y tamaño de

The Petri dishes were incubated at  $24 \pm 2$  °C for 8 days or until structures were formed. Later, the necessary sub-cultivations were performed in PDA culture medium in order to proceed with the purification process using the hyphal tip and monosporic technique (Gilchrist *et al.*, 2005). The following equation was used to calculate the isolation frequency per genus and type of sample: Frequency (%) = (Number of isolates of the identified genus/total of isolates analyzed by type of sample) \* 100 (Mariscal *et al.*, 2017).

**Morphological characterization.** The obtained isolates were then sown in selective culture media according to the possible genera obtained by sowing the propagules. The *Alternaria* genus isolates were sown in petri dishes with PDA culture medium,  $V_8$  (Agar-vegetable juice®) and PCA (Potato-Carrot- Agar); the isolates of the *Fusarium* genus were sown in PDA culture medium, CLA (Carnation Agar) and SNA (Spezieller Nährstoffarmer-Agar); and, finally, isolates of the *Bipolaris* genus were sown in PDA culture medium only. The Petri dishes were incubated at  $24 \pm 2$  °C temperature with 12 cycles of light/darkness for 14 days. Morphological identification was done based on the color of the colony, and the shape and size of the conidiophores and conidia. For *Fusarium* and *Bipolaris*, semi-permanent preparations were made in 50% glycerol. The sample size used for these measurements consisted of 50 specimens per genus (Crous *et al.*, 2009) that were documented using a compound microscope with a Motic Images Plus 2.0 camera (Software Motic 580 ver.5.0.) and a Carl Zeiss® Imager D2 microscope with a camera (Axioncam 503 color). Identification was made based on taxonomic keys (Warham *et al.*, 1998; Barnett and Hunter, 1972; Gilchrist *et al.*, 2005; Leslie and Summerell, 2006; Manamgoda *et al.*, 2014).

conidióforos y conidios; para *Fusarium* y *Bipolaris*, se llevaron a cabo preparaciones semipermanentes en glicerol al 50%. El tamaño de muestra para las mediciones fue de 50 ejemplares por cada género (Crous *et al.*, 2009), documentadas con ayuda de microscopio compuesto con cámara Motic Images Plus 2.0, (Software Motic 580 ver.5.0.) y microscopio Carl Zeiss® Imager D2 con cámara (Axioncam 503 color). La identificación se realizó con base a claves taxonómicas (Warham *et al.*, 1998; Barnett y Hunter, 1972; Gilchrist *et al.*, 2005; Leslie y Summerell, 2006; Manamgoda *et al.*, 2014).

**Identificación molecular, alineamiento de secuencias y análisis filogenético.** Para confirmar molecularmente las especies de hongos se realizó la extracción de ADN genómico por el método de Fosfatasa Alcalina (AP) (Sambrook y Russell, 2001) y se corroboró su calidad por medio del Nanodrop; posteriormente, se enviaron a Macrogen® Inc., Korea para la purificación y amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se amplificó la región ITS del ADN ribosomal ITS4 con la utilización del iniciador: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', para *Alternaria* spp. y *Bipolaris* spp., cuyo fragmento de amplificación es de 550 bp (White *et al.*, 1990); mientras que para *Fusarium* spp., se realizó en el ADN ribosomal ITS4 con el iniciador EF1-983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'; Kidd *et al.*, 2019), con un producto de 900 a 1,200 bp. Ambos iniciadores se consideran universales de dominio público. Las secuencias se editaron y alinearon manualmente mediante el Software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) y se compararon individualmente en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology (NCBI) USA, mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con los parámetros preestablecidos.

**Molecular identification, sequence alignment and phylogenetic analysis.** To molecularly confirm the fungal species, genomic DNA was extracted using the alkaline phosphatase method (AP) (Sambrook and Russell, 2001) and its quality was evaluated using a Nanodrop. Then, samples were sent to Macrogen® Inc., Korea, for purification and DNA amplification through polymerase chain reaction (PCR). To do this, the ITS region of the ITS4 ribosomal DNA was amplified using the primer 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' for *Alternaria* spp. and *Bipolaris* spp., which amplified a 550 bp fragment (White *et al.*, 1990). For *Fusarium* spp., the ITS4 ribosomal DNA was used with the primer EF1-983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'; Kidd *et al.*, 2019) which amplified a 900-1,200 bp fragment. Both primers are considered universal and in the public domain. The sequences were edited and manually aligned with the BioEdit 7.2.5 software (Hall, 1999), and individually compared in the Gene Bank of the National Center for Biotechnology (NCBI), USA, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program with the pre-established parameters. The phylogenetic analysis of the multiple sequences was done using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) software and the reference sequences reported by Woudenberg *et al.* (2013) for the genus *Alternaria*; by O'Donnell *et al.* (2009) for *Fusarium*, and by Manamgoda *et al.* 2014 for *Bipolaris*. All the sequences were aligned with the CLUSTAL-W algorithm and analyzed using the Neighbor-joining method (NJ) (Saitou and Nei, 1987). One thousand (1000) replications of support values (Bootstrap) were used to obtain a consensus tree with 70% majority rule (Tamura *et al.*, 2004). The *Phakopsora vitis* basidiomycete was used as a root node, external to the group.

Para el análisis filogenético de las secuencias múltiples se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) y las secuencias de referencia reportadas por Woudenberg *et al.* (2013), para el género *Alternaria*; de O'Donnell *et al.* (2009), para *Fusarium* y para *Bipolaris*, de Manamgoda *et al.* (2014). Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL-W y se analizaron con el método Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Se utilizaron 1000 réplicas de valores soporte (Bootstrap) para obtener un árbol consenso con una regla de mayoría del 70% (Tamura *et al.*, 2004). Se utilizó al basidiomiceto *Phakopsora vitis* como nodo raíz, externo al grupo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las 900 siembras que se realizaron para cada variedad (300 por tipo de propágulo), los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*, fueron los principales hongos aislados en propágulos de pasto Banderita, con incidencia variable, dependiendo del tipo de propágulo y variedad. El género *Alternaria* con 67% fue el que se identificó con mayor frecuencia entre las cinco variedades y los tres tipos de propágulo; lo anterior, con excepción de M<sub>3</sub> (cariópside limpio) de la variedad NdeM-5, donde no se aisló este género como resultado de la protección física que las brácteas accesorias proporcionan en esta especie, retrasando o evitando la entrada del patógeno. En alguna parte del desarrollo de semilla, las brácteas (glumas, lema y palea) son suficientemente sólidas o impermeables para evitar la llegada del patógeno al cariópside. Este hongo posee amplia distribución y presencia en el ambiente y puede infestar, desde el suelo, a semillas antes y después de la cosecha (Pavón *et al.*, 2012); similarmente, por contacto con brácteas contaminadas y/o mal manejo de cosecha de semilla; lo anterior, es

## RESULTS AND DISCUSSION

Among the 900 sowings of each variety (300 per type of propagule), the genera *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* were the main fungi isolated from sideoats gramma propagules with variable incidence, depending on the type of propagule and variety. The *Alternaria* genus was identified with the greatest frequency (67%) among the five varieties and the three types of propagule, except for M<sub>3</sub> (clean caryopse) of the NdeM-5 variety, from which this genus was not isolated because of the physical protection provided by the accessory bracts of this species, which delay or prevent pathogen penetration. At some stage of seed development, the bracts (glumes, lemma and palea) are solid and impermeable enough to keep the pathogen from reaching the caryopse. This fungus is widely distributed and present in the environment and can, from the soil, infest the seeds before and after harvest (Pavón *et al.*, 2012). The seed can also be infested by coming in contact with contaminated bracts and/or because of poor seed management. This is important for seedling survival after sowing and not necessarily for fodder quality in perennial species such as sideoats gramma.

The *Fusarium* genus had 24% incidence and was found in the five varieties, with variable frequency among them; the fungus was isolated most frequently from M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>, which indicates that the benefit to the caryopse improves the propagule's health. The presence of *Fusarium* can be caused by its biological cycles, since, in areas with low environmental moisture, for example, the arid regions where sideoats gramma grows naturally, the infection is almost exclusively produced by the inoculum present in the soil, which invades and penetrates the stems and root base; for this reason, the chemical or biological protective agents added to the seed avoid seedling infestation, either from



importante para la sobrevivencia de plántulas post-siembra y no necesariamente para la calidad de forraje en especies perennes como pasto Banderita.

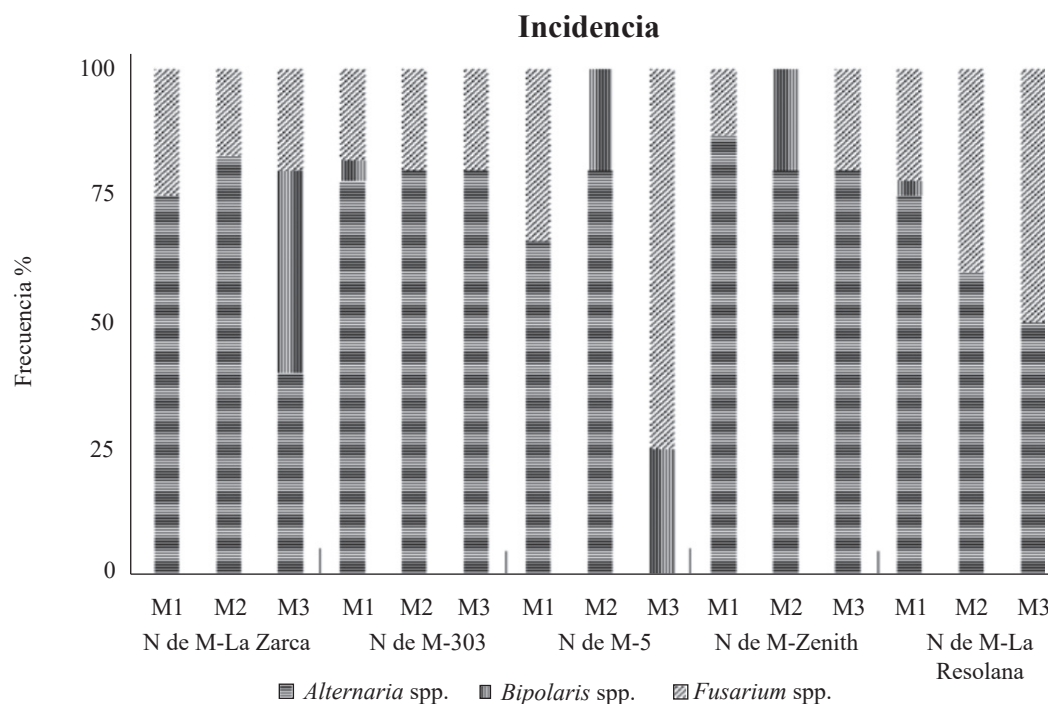
El género *Fusarium* presentó una incidencia de 24% (número) y, estuvo presente en las cinco variedades con frecuencia variable entre variedades, siendo en M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> donde se aisló con mayor frecuencia; lo cual, es indicativo de que el beneficio al cariósido mejora la sanidad del propágulo. La presencia de *Fusarium* puede deberse a su ciclo biológico ya que, en zonas con baja humedad ambiental, como son las regiones áridas donde se desarrolla naturalmente pasto Banderita, la infección la causa casi de manera exclusiva el inóculo presente en suelo, invadiendo y penetrando la base de tallos y raíces, por lo que los agentes protectores químicos o biológicos adicionados a la semilla evitan la infestación de plántulas, ya sea desde las brácteas accesorias o desde el suelo (Cook, 2010), llegando infectar a toda la planta. Finalmente, el género *Bipolaris*, con 9% de incidencia, fue el de menor número de aislados en las cinco variedades, siendo en M<sub>3</sub> de NdeM-La Zarca donde se presentó en mayor frecuencia (Figura 1). Los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* están asociados a enfermedades de hoja, tallo y raíz en gramíneas, así como con la producción de micotoxinas con efectos negativos en la salud animal (Sainz *et al.*, 2012). Enfermedades como “Damping-off” y punta negra del grano, pueden ser causadas por el complejo *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Bipolaris* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

**Identificación morfológica.** Aunque no se observaron síntomas en la semilla, la presencia de hongos que afecten el desarrollo de plántulas, es importante a la siembra, ya que definirá la capacidad competitiva de estas ante un ambiente naturalmente desafiante, así como su densidad en la pradera. Se obtuvieron 51 aislamientos de los tres

the accessory bracts or from the soil (Cook, 2010) and infect the whole plant. Finally, the *Bipolaris* genus, with 9% incidence, had the lowest number of isolates in the five varieties, of which NdeM-La Zarca in M<sub>3</sub> had the greatest frequency (Figure 1). The *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera are associated with leaf, stem and root diseases in grain crops, as well as the production of mycotoxins that negatively affect animal health (Sainz *et al.*, 2012). Diseases like Damping-off and grain black point can be caused by *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. and *Bipolaris* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

**Morphological identification.** Although no symptoms were observed on the seed, the presence of fungi that affect seedling development is important during sowing, since it will define the seedlings' competitive capacity in a naturally challenging environment as well as their density in the prairie. Fifty-one (51) isolates of the three types of sample (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>) were obtained and five morphospecies were identified: *Alternaria* F and *Alternaria*-cl, *Bipolaris*-os, *Fusarium* 1 and *Fusarium* 2. Based on the taxonomic keys for each genus, the following species were identified: *Alternaria*-cl: colony gray in color in PCA culture medium, with rough-dotted ornamentation, obclavate, wall-like conidia, transversal septation of 1-6 and longitudinal septation with 0-3 septa, conidia size 15-34 x 6.3-13.5 µm, and primary conidiophores 12-46 x 3.8-5.4 µm in size. The catenulation can have 5-15 conidia, has secondary ramification, characteristics which, according to Simmons' keys (1995), correspond to *A. tenuissima* (Figure 2A-2C). *Alternaria* F: colony gray-olive in color in PCA culture medium, obclavate, wall-like conidia with rough-dotted ornamentation, transversal septation of 1-6 and longitudinal septation of 0-3, conidia size 10.5-42 x 6.4-12.7 µm, and primary conidiophores 34.1- 44.8





**Figura 1.** Frecuencia de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* aislados de cinco variedades comerciales del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) a partir de espiguillas, carióspsides con lemas y carióspsides limpios. M1: espiguilla completa; M2: carióspside con lema; M3: carióspside limpio.

**Figure 1.** Frequency of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera isolates of five commercial varieties of sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) from spikelets, caryopses with lemmas and clean caryopses. M1: full spikelet; M2: caryopses with lemma; M3: clean caryopse.

tipos de muestra ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ); entre los cuales, se identificaron cinco morfoespecies: *Alternaria* F y *Alternaria*-cl, *Bipolaris*-os, *Fusarium* 1 y *Fusarium* 2. De acuerdo con las claves taxonómicas para cada género, se identificaron las siguientes especies: *Alternaria*-cl: colonia de coloración gris en medio de cultivo PCA, conidios con ornamentación rugosa-punteada, obclavados, muriformes, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3 septas, tamaño de conidios de 15-34 x 6.3-13.5  $\mu\text{m}$ , conidióforos primarios de 12-46 x 3.8-5.4  $\mu\text{m}$ . La catenulación puede poseer de 5-15 conidios, presenta ramificación secundaria, correspondiendo estas características a *A. tenuissima* de acuerdo a las claves de Simmons (1995) (Figura 2A-2C). *Alternaria* F: colonia grisáceo-olivo en medio PCA,

x 3.1- 4.6  $\mu\text{m}$  in size. The catenulation can have 5-10 conidia, abundant secondary ramification, which are characteristics that correspond to *A. alternata* (Simmons, 1995) (Figure 2D-2F). In this species, spores survive on the seed or in the mycelium inside the seed, and high humidity and temperatures of 20-25  $^{\circ}\text{C}$  favor their development. The *A. alternata* fungus has been isolated from wheat seeds (Bautista *et al.*, 2011), and Leucaena (Lezcano *et al.*, 2010); it causes leaf blight on oats (García *et al.*, 2013), rot in fruit trees (Mariscal *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017) and vegetables (Fraire *et al.*, 2010). The effect of many fungi on perennial grasses can be pathogenic (Kononenko *et al.*, 2015; Masi *et al.*, 2017) and/or reinforce their resistance to diverse environmental pressures (Ali *et al.*,

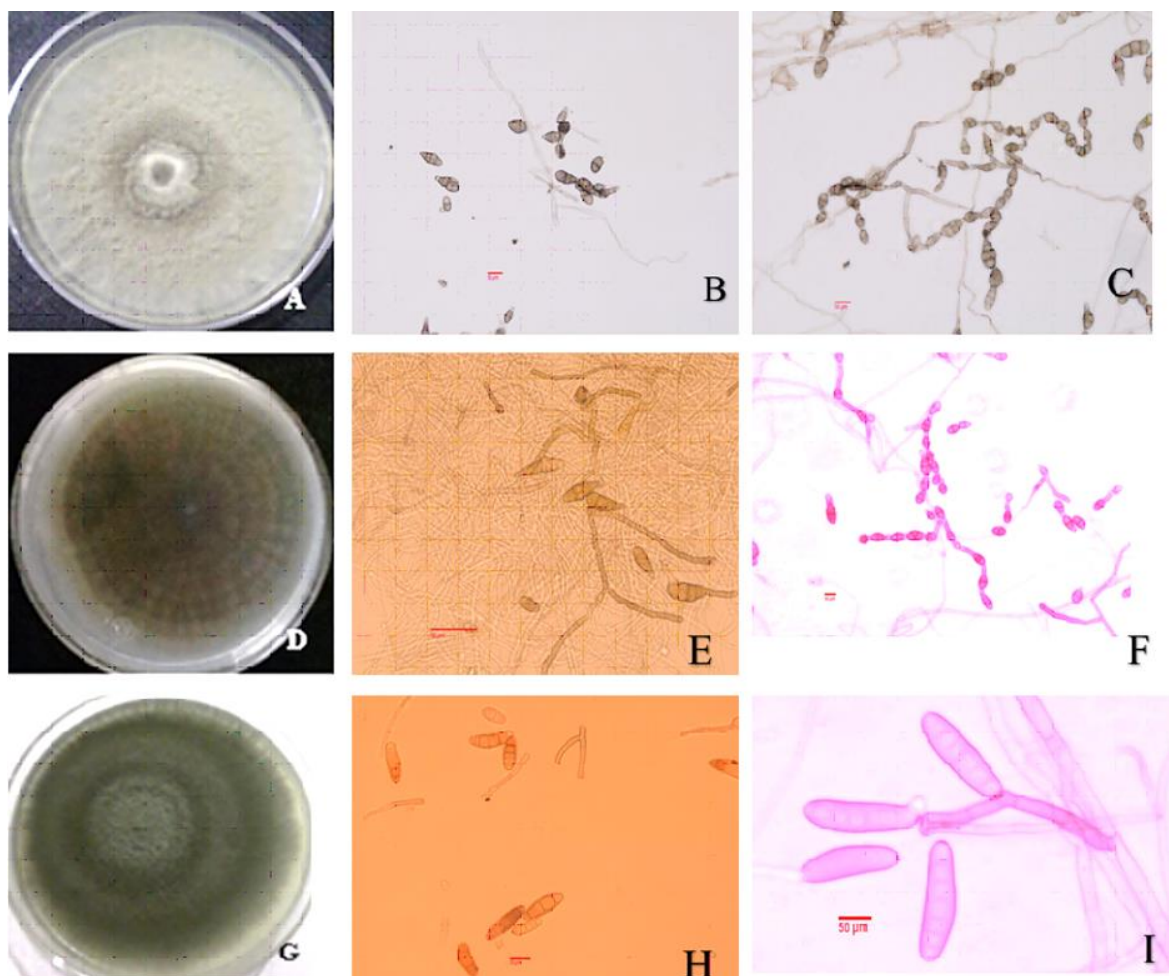


Figura 2. Características culturales y morfológicas de hongos asociados a semilla de pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. Morfología de los hongos. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colonia en PCA, B) Conidios, C) Cadena de conidios. D-F) *Alternaria alternata*, D) Colonia en PCA, E) Conidios, F) Cadena de conidios. G-I) *Bipolaris cyndontis*, G) Colonia en PDA, H) Conidios, I) Conidióforo.

Figure 2. Figure 2. Cultural and morphological characteristics of fungi associated with seed of sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo. Fungi morphology. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colony on PCA, B) Conidia, C) Conidia chain. D-F) *Alternaria tenuissima*, A) Colony on PCA, B) Conidia, F) Conidia chain. G-I) *Bipolaris cyndontis*, G) Colony on PDA, H) Conidia, I) Conidiophore.

conidios obclavados, muriformes con ornamentación rugosa-punteada, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3, tamaño variable de conidios de 10.5-42 x 6.4-12.7  $\mu\text{m}$ , conidióforos primarios de 34.1- 44.8 x 3.1- 4.6  $\mu\text{m}$ . La catenulación puede poseer de 5-10 conidios, presenta abundante

2017). *Alternaria tenuissinna* is present in wheat crops (Perello *et al.*, 2015). These species produce mycotoxins that can be present in products such as flour, concentrates and processed foods, and can seriously affect human and animal health (Pavón *et al.*, 2012).

ramificación secundaria, correspondiendo estas características a *A. alternata* (Simmons, 1995) (Figura 2D-2F); en esta especie, las esporas sobreviven sobre la semilla o el micelio dentro de esta, la alta humedad y temperaturas de 20-25 °C favorecen su desarrollo. El hongo *A. alternata* ha sido aislada de semillas de trigo (Bautista *et al.*, 2011) y *Leucaena* (Lezcano *et al.*, 2010), en avena causa tizón foliar (García *et al.*, 2013), pudriciones en frutales (Mariscal *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017) y hortalizas (Fraire *et al.*, 2010). El efecto de muchos hongos en pastos perennes puede ser patógeno (Kononenko *et al.*, 2015; Masi *et al.*, 2017) y/o potencializar su resistencia a diversidad de presiones ambientales (Ali *et al.*, 2017); por su parte, *A. tenuissinna* está presente en cultivos de trigo (Perello *et al.*, 2015). Estas especies producen micotoxinas que pueden estar presentes en productos como harinas, concentrados y alimentos procesados, afectando seriamente la salud humana y animal (Pavón *et al.*, 2012).

Para el género *Fusarium* 1: la colonia presentó una coloración beige con micelio blanco que se tornó marrón al envejecer en medio de cultivo PDA y con formación de masas de esporas. Los esporodocios se observaron de color salmón-naranja con macroconidios delgados y curva dorsiventral de 26-38.5 x 3-4.9 µm, con 5-6 septos, célula apical ahusada, célula basal en forma de pie. Microconidios elipsoidales de 8.9-17.5 x 2.5-4.2 µm, con 0-3 septos y polifialides cortas, características correspondientes a *F. scirpi*, (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3A-3C). Esta especie es común en regiones templadas, áridas y semiáridas (Summerell, 2019), pastizales y tierras de cultivo. Se considera patógeno secundario, pero puede causar pudriciones en raíz de leguminosas. *Fusarium* 2: presentó coloración naranja pálido a salmón, en medio de cultivo PDA, abundante micelio algodonoso; macroconidios semirectos y ligeramente curvados de 27-36 x 3-4.5 µm con 3-5 septos, célula basal en forma

For the *Fusarium* 1 genus: the colony was beige in color with white mycelium that became brown as it grew older in PDA culture medium and spore masses were formed. The sporodochia observed were salmon-orange in color with thin macronidia showing a dorsiventral curve of 26-38.5 x 3-4.9 µm with 5-6 septa, needle-like apical cell, and foot-like basal cell. Ellipsoid microconidia measured 8.9-17.5 x 2.5-4.2 µm with 0-3 septa and short polyphialides, characteristics that correspond to *F. scirpi* (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 3A-3C). This species is common in temperate, arid y semiarid regions (Summerell, 2019), grasslands and farmlands. It is considered a secondary pathogen but can cause legume root rot. *Fusarium* 2: the colony was pale orange-salmon in color in PDA culture medium, with abundant cottony mycelium, semi-straight and slightly curved macronidia of 27-36 x 3-4.5 µm with 3-5 septa, foot-like basal cell, sharp and curved apical cell, with abundant mesoconidia with 1-3 septa. These characteristics match those of *F. incarnatum* (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 3D-3F). This fungus is present in the soil and in a wide range of tropical-desert environments considered of minor economic importance and is associated with pearl millet seed (*Pennisetum americanum*) (Wilson, 2002), soybean (Chiotta *et al.*, 2015) and sorghum. Similarly, the presence of mycotoxins is often recognized in fodder with high moisture content and poor management: hay, silo and hay-silo. The presence of a great number of fungal metabolites (over 100, including mycotoxins, antibiotics and others whose action is not known) has been reported in cultivated fodder (Ramírez *et al.*, 2014) and grassland species. However, many of their effects on grazing cattle are unknown (Nichea *et al.*, 2015). Species belonging to the *F. incarnatum-equiseti* complex have been associated with diseases of grasses and mycotoxin production (Salvat *et al.*, 2013).

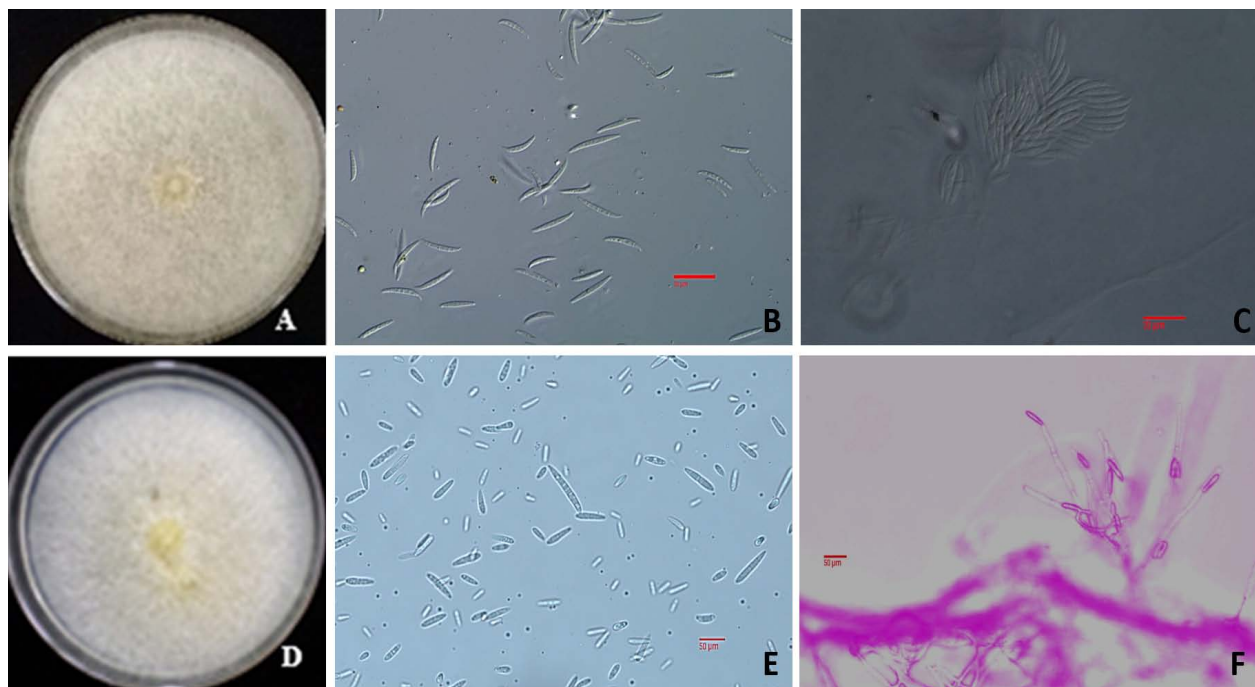


Figura 3. Características culturales y morfológicas de hongos asociados a semilla de pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colonia en PDA, B) Macroconidios, C) Esporodoquio. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colonia en PDA, E) Micro y Mesoconidios, F) Fiálides.

Figure 3. Cultural and morphological characteristics of fungi associated with seed of sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colony on PDA, B) Macroconidia, C) Sporodochium. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colony on PDA, E) Micro- and mesoconidia, F) Phialides.

de pie, célula apical afilada y curva; similarmente, presenta abundantes mesoconidios, con 1-3 septos. Estas características coinciden con *F. incarnatum* (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3D-3F). Este hongo está presente en suelo y amplia gama de ambientes tropical-desérticos considerados de baja importancia económica y asociado a semilla de mijo perla (*Pennisetum americanum*) (Wilson, 2002), soya (Chiotta *et al.*, 2015) y sorgo; similarmente, es ampliamente reconocida la presencia de micotoxinas en forrajes que se usan con alto contenido de humedad mal manejados: heno, silo y heno-silo. La presencia de gran cantidad de metabolitos fúngicos (más de cien; entre micotoxinas, antibióticos y otros de acción desconocida) han sido reportadas en especies forrajeras cultivadas (Ramírez *et al.*,

Finally, the *Bipolaris* B-os genus: in PDA culture medium it produced colonies olive-brown in color with aerial mycelium, individual conidiophores with no ramification, that measured 43-160 x 4-6  $\mu\text{m}$ , were septate and geniculated in the upper part, brown in color; and 21.5-49 x 10.5-15.8  $\mu\text{m}$  conidia, smooth or slightly curved, cylindrical, brown in color with 2-6 septa, characteristics that correspond to *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014) (Figure 2G-2I). This fungus was reported for the first time on *Cynodon dactylon* in 1909. It is considered a secondary saprophyte pathogen and can invade a wide range of hosts within the grasses (Poaceae). It is considered of low economic importance and has been reported as a pathogen in various grass species (González *et al.*, 2006). For



2014) y del pastizal; sin embargo, se desconocen muchos de sus efectos sobre el ganado en pastoreo (Nichea *et al.*, 2015). Especies pertenecientes al complejo *F. incarnatum-equiseti* se han asociado a enfermedades en gramíneas y producción de micotoxinas (Salvat *et al.*, 2013).

Finalmente, el género *Bipolaris* B-os: presentó en medio de cultivo PDA, colonias de coloración olivo-oscuro con micelio aéreo, conidióforos individuales sin ramificación de 43-160 x 4-6 µm, septado y geniculado en la parte superior, de color marrón; conidios de 21.5-49 x 10.5-15.8 µm lisos o ligeramente curvados, cilíndricos, de color marrón, con 2-6 septos, características que corresponden a *B. cynodontis* Manamgoda *et al.* (2014) (Figura 2G-2I). Este hongo fue reportado por primera vez en *Cynodon dactylon* en 1909 y se considera como patógeno saprofito secundario y puede invadir amplia gama de hospedantes dentro de las gramíneas (Poaceae). Es considerado de baja importancia económica, reportado como patógeno en varias especies de pastos (González *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *Chloris gayana* y *C. dactylon* induce manchas foliares (Hagan, 2005; Rodríguez, 2011).

**Identificación y filogenia molecular.** Basados en la identificación morfológica se enviaron por triplicado muestras de ADN de los géneros a Macrogen® Inc., Korea. Las secuencias de ADN obtenidas de los aislamientos tuvieron porcentaje de cobertura e identidad  $\geq 99\%$  para distintas especies de cada género de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*; lo cual, confirmó la identificación previa de los géneros basada en caracteres morfológicos. Para determinar la identidad de cada aislamiento, se realizó filogenia molecular (Figura 4). Las secuencias correspondientes al género *Alternaria*, se agruparon en el clado que comprende a diez especies que

example, it induces foliar spots in *Chloris gayana* and *C. dactylon* (Hagan, 2005; Rodríguez, 2011).

**Identification and molecular phylogeny.** Based on the morphological identification, three DNA samples of the genera were sent to Macrogen® Inc., Korea. The DNA sequences obtained from the isolates were covered and identified by  $\geq 99\%$  as being different species of each genus of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium*, which confirmed the previous identification of the genera based on morphological traits. Molecular phylogeny was used to determine the identity of each isolate (Figure 4). The sequences corresponding to the *Alternaria* genus were grouped in the clade that includes 10 species that form the *A. alternata* complex (Woudenberg *et al.*, 2013). There is little molecular variation, and to determine the specific morphotypes, three or more genes must be sequenced (Woudenberg *et al.*, 2015). However, based on their morphology (Simmons, 1995), it was corroborated that *Alternaria* F was *A. alternata*, and *Alternaria*-cl was *A. tenuissima*. *Bipolaris*-os sequencing was aligned with the clade that includes *B. coffeana* and *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014), both of which are phylogenetically related. Based on the morphology and the description of Manamgoda *et al.* (2014), it corresponds to *B. cynodontis*. The *Fusarium* sequences were aligned with the *incarnatum-equiseti* complex that includes four species: *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. lacertarum* and *F. scirpi*. The rDNA and EF1 ITS region did not show enough polymorphism to separate the four phylogenetically related species, which is in agreement with the results reported by O'Donnell *et al.* (2009). According to the morphology, F1 was identified as *F. scirpi* and F2 as *F. incarnatum*.



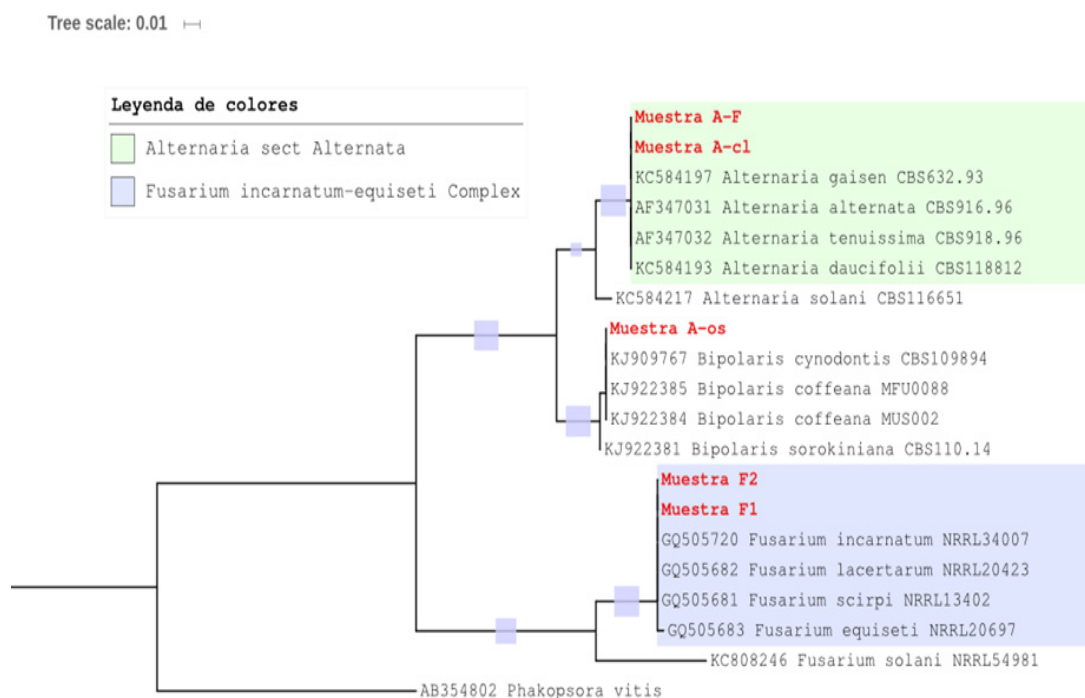


Figura 4. Análisis filogenético de los aislados de los géneros de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* asociados a la semilla de pasto Banderita del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Figure 4. Phylogenetic analysis of isolates of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera associated with sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo.

conforman el complejo *A. alternata* (Woudenberg *et al.*, 2013). Existe escasa variación molecular y para determinar los morfotipos específicos, es necesario secuenciar tres o más genes (Woudenberg *et al.*, 2015). Sin embargo, por la morfología presentada (Simmons, 1995), se corroboró que *Alternaria* F fue *A. alternata* y *Alternaria-cl* fue *A. tenuissima*. La secuenciación de *Bipolaris-os* se alineó con el clado que comprende a *B. coffeana* y *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014), ambas especies relacionadas filogenéticamente. Acorde a la morfología observada y lo descrito por (Manamgoda *et al.*, 2014) corresponde a *B. cynodontis*. Las secuencias de *Fusarium*, se alinearon dentro del complejo *incarnatum-equiseti*, que incluye a cuatro especies: *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. lacertarum* y *F. scirpi*. La región ITS del rADN y EF1

## CONCLUSIONS

The evaluated seeds had low phytosanitary quality because of the incidence of *Alternaria* spp. (67%), *Fusarium* spp. (24%) and *Bipolaris* spp. (9%) in the five varieties and the three types of propagule. The species *A. alternata*, *A. tenuissima*, *F. incarnatum*, *F. scirpi* and *B. cynodontis* were identified through morphological and molecular characterization and phylogeny as the main fungi associated with commercial seed of sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) from Valle del Mezquital, Hidalgo. In Mexico, there are no previous studies about the presence of fungi in seed of native sideoats gramma, which is of great importance to recover grasslands. Based on this information, conducting further studies to determine

no presentó suficiente polimorfismo para separar entre estas cuatro especies filogenéticamente relacionadas; lo cual, concuerda con lo reportado por O'Donnell *et al.* (2009). De acuerdo con la morfología presentada se identificó a F1 como *F. scirpi* y F2 como *F. incarnatum*.

## CONCLUSIONES

Las semillas evaluadas presentaron baja calidad fitosanitaria, ya que se encontraron a *Alternaria* spp. (67%), *Fusarium* spp. (24%) y *Bipolaris* spp. con 9% de incidencia en las cinco variedades y los tres tipos de propágulo. Las especies *A. alternata*, *A. tenuissinna*, *F. incarnatum*, *F. scirpi* y *B. cynodontis* fueron identificadas por caracterización morfológica, molecular y filogenia, como los principales hongos asociados en semilla comercial del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo. No existen en México estudios previos sobre la presencia de hongos en semilla de esta gramínea nativa de enorme importancia para recuperar pastizales. A partir de esta información, se recomienda realizar futuros estudios para determinar la patogenicidad de los hongos aislados en la semilla, así como estudios epidemiológicos en condiciones de campo con el fin de poder desarrollar estrategias asertivas para promover mayor calidad sanitaria de semilla y mejorar la probabilidad de establecimiento de praderas de alto riesgo, en condiciones de temporal semiárido.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la propuesta de Problemas Nacionales 2014 (248252): "Colecta, salvaguarda y evaluación de forrajeras (Poaceae) para pastoreo extensivo, nativas de México semiárido"; similarmente, por el apoyo

the pathogenicity of the fungi isolated from seed is recommended, as well as epidemiological studies in the field in order to develop assertive strategies to promote higher sanitary quality of seed and improve the probability of establishing high-risk prairies under semiarid rainfed conditions.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for its support through the proposal of Problemas Nacionales 2014 (248252): "Colecta, salvaguarda y evaluación de forrajeras (Poaceae) para pastoreo extensivo, nativas de México semiárido" (Collection, safeguarding and evaluation of fodder crops (Poaceae) for extensive grazing, native to semiarid Mexico) and for the financial support it provided for conducting research through the Masters in Science scholarship granted to the second author of this study.

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

financiero brindado para el desarrollo de este trabajo a través de la beca de Maestría en Ciencias otorgada a la segunda autora.

## LITERATURA CITADA

- Afzal I, R Shabir, and S Rauf. 2019. Seed production technologies of some major field crops. *In*: Hasanuzzaman M. (ed.) *Agronomic Crops*. Springer, Singapore. pp. 655-678.
- Ali S, TC Charles, BR Glick. 2017. Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. *In*: Doty S (ed.) *Functional Importance of the Plant Microbiome*. Springer. Chap. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1_6)
- Arriagada RV. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 115 p. <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf> (consulta, diciembre 2018).
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Ilustred Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p.
- Bautista EE, Leyva MG, Villaseñor ME, Huerta EJ y Mariscal AA. 2011. Hongos asociados al grano de trigo sembrado en áreas del centro de México. *Revista Mexicana de Fito-patología* 29(2):175-177. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a11.pdf>

- Chiotta ML, Chulze S y Barros G. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 47(2):171-184. <https://doi.org/10.19137/qs.v7i0.687>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2018. Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Ixmiquilpan (1312), Estado de Hidalgo. Subdirección General Técnica. Gerencia de Aguas Subterráneas. Subgerencia de Evaluación y Ordenamiento de Acuíferos. *Diario Oficial de la Federación*. Enero 4, 2018. 34 p.
- Cook RJ. 2010. *Fusarium* root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. In: *Compendium of wheat diseases and pests*. Ed. W.W. Bockus, R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray, and R. Smiley (eds.). 3<sup>rd</sup>. Ed. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA. p. 37-39. <https://doi.org/10.1080/10496505.2011.564100>
- Crous PW, Verkley GJ, Groenewald JZ, and Samson RA. 2009. *Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series*. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, Netherlands. 269 p.
- Fraire CL, Nieto AD, Cárdenas SE, Gutiérrez AG, Bujanos MR y Vaquera HH. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):25-33. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003)
- García LE, Leyva MG, Villaseñor ME, Rodríguez GF y Tovar PM. 2013. Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos de reporte nuevo en avena (*Avena sativa* L.), en la meseta central de México. *Agrociencia* 47(8):815-827. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i8.1090>
- Gilchrist SL, Fuentes GC, Martínez CA, López RE, Duveiller PS, Henry MI y García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda Ed. 68 p. México. CIMMYT. (Consulta, mayo 2018). <https://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/1272>
- González AG, López MM, Novo A, Estrada ZV, López GM, Bernal DA, Granda BA, Rodríguez AG, Figueredo GG, Pupo LZ, Ramos AD, González M, Ruiz MG, Pérez MG, Nápoles IA, García CR, Sánchez GC, Buchillón R y López CM. 2006. Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad* 10(1):11-18. <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116158002.pdf>
- Hagan A. 2005. Leaf spot and rust diseases of turf grasses. Alabama Cooperative. Extension System. <https://ssl.acesag.auburn.edu/pubs/docs/A/ANR-0621/ANR-0621-archive.pdf> (consulta, diciembre 2018).
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf> (consulta, junio de 2019)
- Kidd SE, Sharon C, Chen A, Meyer W, Halliday CL. 2019. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready? *Frot. Microbiol.* 10: 2903. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02903>
- Kononenko, GP, Burkin AA, Gavrilova OP, Gagkaeva TY. 2015. Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated grasses and legumes crops. *Agricultural and Food Science*. 24:323-330. <https://doi.org/10.23986/afsci.52313>
- Lamichhane JR, You MP, Laudinot V, Barbet MJ, and Aubertot JN. 2020. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. *Plant Disease* 104:610-623. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1157-FE>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, United States of America. 388 p. ISBN/ISSN: 978-0-8138-1919-8
- Lezcano JC, Martínez B y Alonso O. 2010. Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fúngicos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes* 33(1):1-14 pp. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v33n1/pyf04110.pdf>
- Lezcano JC, Navarro M, González Y y Alonso O. 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. *Pastos y Forrajes* 30(1):107-118. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v30n1/pyf06107.pdf>
- Manamgoda DS, Rossman A, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, and Hyde KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Micology* 79:221-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Mariscal AL, Rivera YA, Dávalos GP y Ávila MD. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia* 51(6): 673-681. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00673-en.pdf>
- Masi, M, Meyer S, Pescitelli G, Cimmino A, Clement S, Peacock B, and Evidente A. 2017. Phytotoxic activity against *Bromus tectorum* for secondary metabolites of a seed-pathogenic *Fusarium* strain belonging to the *F. trincinctum* species complex. *Natural Product Res.* 31(23):2768-2777. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1297445>
- Morales NC, Quero CA, Melgoza AC, Martínez SM y Jurado GP. 2009. Diversidad forrajera del pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Técnica Pecuaria México* 47(3):231-244. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v7i2.4174>
- Nichea MJ, Cendoya E, Zchetti VGL, Chiacchiera SM, Sul-yok M, Krska R, Torres AM, Chulze SN, and Ramírez ML. 2015. Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin Journal* 8(4): 451-457. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1770>
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, and Geiser DM. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J Clinical Microbiology* 47(12):3851-3861. <https://doi.org/10.1128/jcm.01616-09>
- Pavón MM, González AI, Martín SR y García LT. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27(6):1772-1781. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.20.12.27.6.6017>
- Perello AE, Aulicino MB, Martinelli C, Regueira M, Moreno MV y Stenglein S. 2015. Caracterización morfo-cultural de

- nuevos grupos taxonómicos de *Alternaria*, asociados a enfermedades del trigo en Argentina. *Revista Ciencias Morfológicas* 17(1):1-15. <https://doi.org/10.35537/10915/53343>
- Pirelli GJ, Anderson NP, Craig AM, and Young CA. 2016. Endophyte toxins in grass and other feed sources. Risk to Livestock. EM-9156. Oregon State University. 10 p. <http://oregonstate.edu/endophyte-lab/files/ext-pub-nov-2016.pdf> (Consulta, marzo, 2020).
- Quero, CAR, Enriquez QJF y Miranda JL. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o *status quo*. *Interciencia* 32(8):566-571. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000800014](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000800014)
- Quero CA, Miranda J. L., Villanueva, Á. J. F. 2017. Recursos genéticos de gramíneas para el pastoreo extensivo. Condición actual y urgencia de su conservación ante el cambio climático. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 3:63-85.
- Quero-Carrillo AR, Miranda-Jiménez L, Hernández-Guzmán F y FA Rubio A. 2014. Mejora del establecimiento de praderas de temporal. Folleto Técnico. Colegio de Postgraduados. ISBN: 978-607-715-213-2 31p. <http://doi.org/10.13140/2.1.5101.2161>
- Ramírez ML, Chulze SN, Torres MA, Zchetti GV, Nichea JM, Cendova E y Palacios AS. 2014. Variación estacional de la presencia de micotoxinas en pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina. *SNS (Argentina)* 4:49-54.
- Rodríguez G. 2011. Patógenos fungosos que afectan a gramíneas procedentes de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Las Tunas”. Unidad Experimental “Indio Hatuey”, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Cuba. <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/tesis/tesism/gisellerodriguez.pdf> (consulta, septiembre 2018).
- Rodríguez, CG, Iglesias C, Nieto TM y Palmero D. 2009. La enfermedad de la punta negra del trigo. *Agricultura. Revista Agropecuaria* 195:118-121. ISSN 0002-1334. (consultada, mayo 2019). <http://oa.upm.es/15517/>
- Ruiz CF, Ríos VC, Berlanga RD, Ornelas PJ, Acosta MC, Romo CA, Zamudio FP, Pérez CD, Salas MM, Ibarra RJ y Fernández PS. 2017. Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3):437-462. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>
- Sainz MJ, Aguin O, Bande MJ, Pintos C y Mansilla JP. 2012. Biodiversidad de especies de *Fusarium* en tallos de maíz forrajero en Galicia. *Pastos* 42(1):51-56.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salvat A, Balbuena O, Ricca A, Comerio R, Rosello BJ, Rojas D, Berretta M, Delssin E, Bedascarrasbure E y Salerno J. 2013. Presencia de zearalenona en pasturas del Este del Chaco. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 39(1):31-36.
- Sambrook J and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press 1:1. 32-1. 34 p.
- Simmons EG. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon*. 55:55-163.
- Summerell BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Ann Rev. of Phytopatology*. 57:323-339. <https://doi.org/10.1146/annualvev-phyto-082718-100204>.
- Tamura K, Nei M, and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Warham E.J., Butler L. y Sutton B. 1998. *Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. Manual de Laboratorio*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México. 64 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and Direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ, White TJ. (eds.) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, CA, USA p. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.5002-1>
- Wilson JP. 2002. Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease* 86:833-839. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.8.833>
- Woudenberg JH, Groenewald JZ, Binder M, and Crous PW. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75(1):171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Woudenberg JH, Seidl MF, Groenewald JZ, Vries M, Stielow JB, Thomma BP, and Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82:1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>



# Wilt incidence in tomato genotypes (*Solanum lycopersicum*) in different production systems under shade mesh

## Incidencia de marchitez en genotipos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en diferentes sistemas de producción bajo malla sombra

Edgar Montiel-Peralta<sup>1</sup>, Norma Ávila-Alistac<sup>2\*</sup>, Erik Montiel-Peralta<sup>1</sup>, Juan Antonio Chamú-Baranda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Estudios Profesionales-CEP, Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero-CSAEGRO, Cocula, Guerrero. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud. Unidad Xochimilco, CDMX. \*Autor para correspondencia: alixtac@gmail.com.

Recibido: 14 de Diciembre, 2019.

Aceptado: 14 de Febrero, 2020.

Montiel-Peralta E, Ávila-Alistac N, Montiel-Peralta E, Chamú-Baranda JA. 2020. Wilt incidence in tomato genotypes (*Solanum lycopersicum*) in different production systems under shade mesh. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 215-225.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1912-2

Primera publicación DOI: 24 de Febrero, 2020.

First DOI publication: February 24, 2020.

**Resumen.** El objetivo del trabajo fue identificar el agente asociado a la marchitez y evaluar la incidencia en nueve genotipos de jitomate comerciales: seis genotipos con crecimiento indeterminado (Cid, Sun 7705, Moctezuma, Cuauhtémoc, Ramsés y Aníbal) y tres de crecimiento determinado (Palomo, Pony express y Toro). Los genotipos se evaluaron en cuatro sistemas de producción en malla sombra: suelo con acolchado, y tezontle en bolsas de plástico polietileno de 37x37, 40x40 y 40x45 cm. La incidencia de marchitez se evaluó a 114 días en 3,476 plantas. De acuerdo a características mor-

**Abstract.** The objective of this work was to identify the agent associated with wilting disease and evaluate the incidence in nine commercial tomato genotypes: six genotypes with undetermined growth (Cid, Sun 7705, Moctezuma, Cuauhtémoc, Ramses and Aníbal) and three of determined growth (Palomo, Pony express and Toro). The genotypes were evaluated in four shadow mesh production systems: directly on soil, and tezontle substrate in 37x37, 40x40 and 40x45 cm polyethylene plastic bags. The wilt disease incidence was evaluated at 114 days in 3,476 plants. According to morphological characteristics *in vitro* in PDA medium and humid chamber, only one fungus of the *Fusarium* genus was isolated from 18/20 plants whereas *Fusarium* and *Rhizoctonia solani* were isolated in 2/20. The highest incidence was observed in genotypes Cid (20.1%), Moctezuma (22.4%) and Sun 7705 (29.7%) and the lowest on determined growth genotypes. The 37x37 cm bag production system had the highest wilting disease incidence (25.9%) with 74.3 t ha<sup>-1</sup> yield; while in 40x45 cm bags the incidence was lowest (4.7%). In



fológicas *in vitro* en medio PDA y cámara-húmeda, de 18/20 plantas se aisló únicamente un hongo del género *Fusarium* y en 2/20 se obtuvieron aislados de *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*. La mayor incidencia se observó en los genotipos Cid (20.1%), Moctezuma (22.4 %) y Sun 7705 (29.7%) y la menor en genotipos de crecimiento determinado. El sistema de producción en bolsas 37x37 cm presentó la mayor incidencia de marchitez (25.9%) con rendimiento de 74.3 t ha<sup>-1</sup>; mientras que en bolsas 40x45 cm la incidencia fue menor (4.7%). En los cuatro sistemas de producción, el menor rendimiento se obtuvo con el genotipo Sun 7705 con producción en rango de 59.7 - 70.6 t ha<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** Genotipo, *Fusarium*, casa sombra, rendimiento.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor producción mundial, México ocupa el décimo lugar en su producción. A nivel nacional, los principales estados productores son: Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán. La superficie para el cultivo durante el 2018, fue de 49,415 ha, de las cuales 7,737 ha fueron bajo el sistema de agricultura protegida, destinados principalmente en la modalidad de malla sombra. En el estado de Guerrero se destinaron durante el mismo año 119.8 ha bajo estas condiciones (SIAP, 2018). No obstante, a pesar de tener el cultivo bajo condiciones protegidas es afectado por enfermedades causadas por *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis taurica*, *Rhizoctonia* spp., *Fusarium oxysporum*, *Oidium neolycopersici* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, entre otros (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011).

El hongo *Fusarium* es conocido por su capacidad fitopatógena y habitualmente se asocia con marchitamiento vascular (Forero-Reyes *et al.*, 2018). Una de las tácticas para minimizar las afectaciones por

the four production systems, the lowest yield was obtained in Sun 7705 genotype ranging in 59.7 - 70.6 t ha<sup>-1</sup>.

**Key words:** Genotype, *Fusarium*, shadow house, yield.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most produced vegetables in the world; Mexico is ranked tenth in worldwide production. At the national level, the major producing states are Sinaloa, San Luis Potosí and Michoacán. In 2018, the area for cultivation to tomato was 49,415 ha, from which 7,737 ha were cultivated under the protected agriculture system, mainly under the shade mesh modality. The same year, in the state of Guerrero an area of 119.8 ha was also allocated to tomato under the same conditions (SIAP, 2018). However, although tomato is grown under protected conditions, it is affected by diseases caused by *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis taurica*, *Rhizoctonia* spp., *Fusarium oxysporum*, *Oidium neolycopersici* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, among others (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011).

The *Fusarium* fungus is recognized for its phytopathogenic ability, which is usually associated with vascular wilting (Forero-Reyes *et al.*, 2018). The use of genotypes resistant or tolerant to the pathogen has been one of the tactics to minimize the fungus infection, since its presence, along with favorable environmental conditions, reduces tomato yields (Sánchez-Aspeytia *et al.*, 2015). For this reason, different genotypes are used in order to fulfill the producer needs, including production increases, tolerance to environmental conditions (high temperature), pests and diseases (fungi, viruses, nematodes) (Rodríguez *et al.*, 2004). Therefore, the objective of this study was to

este hongo, ha sido el uso de genotipos resistentes o tolerantes al patógeno, ya que la presencia de este en adición a las condiciones climáticas favorables demerita el rendimiento (Sánchez-Aspeytia *et al.*, 2015). Por ello que, de acuerdo a las necesidades del productor, se llegan a utilizar diferentes genotipos de acuerdo a sus necesidades como el incremento en la producción, tolerancia a condiciones ambientales (temperaturas altas), plagas y enfermedades (hongos, virus, nematodos) (Rodríguez *et al.*, 2004). Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue identificar el microorganismo asociado a la marchitez y evaluar la incidencia en nueve genotipos de jitomate comerciales ante el inoculo natural del microorganismo en cuatro sistemas de producción bajo malla sombra.

El trabajo se realizó en Tepecoacuilco, Guerrero, México en el vivero “Valerio Trujano” que pertenece al Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero (CSAEGRO) (18° 17' 54.5" N, 99° 27' 38.6" W). Se seleccionaron nueve genotipos comerciales de jitomate tipo saladette de las empresas Harris Moran (ocho genotipos) y Nunhems (un genotipo) para establecerse bajo las condiciones que predominan en la zona (temperatura: 20-30 °C y cálido húmedo con lluvias en verano): seis de crecimiento indeterminado (Cid, Sun 7705, Moctezuma, Cuauhtémoc, Ramsés y Aníbal) y tres genotipos de crecimiento determinado (Palomo, Pony express y Toro) con fertirriego y bajo casa sombra en una superficie de 1000 m<sup>2</sup>. Todos los genotipos se establecieron en cuatro sistemas de producción. Las bolsas se llenaron con sustrato tezontle rojo de reúso cuyo cultivo anterior fue el chile (serrano y jalapeño) y en donde se detectó a *Fusarium* asociado a la marchitez. Las macetas se colocaron sobre plástico negro para evitar el contacto directo del suelo e impedir el crecimiento de malezas entre las macetas. En el caso del sistema de producción

identificar el microorganismo asociado con marchitez, y evaluar su incidencia en nueve genotipos comerciales de jitomate en la presencia del microorganismo natural en cuatro sistemas de producción bajo malla sombra.

El estudio se realizó en Tepecoacuilco, Guerrero, México, en el invernadero “Valerio Trujano” del Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO) (18° 17' 54.5" N, 99° 27' 38.6" W). Se seleccionaron nueve genotipos comerciales de jitomate tipo saladette de las empresas Harris Moran (ocho genotipos) y Nunhems (un genotipo) para establecerse bajo las condiciones que predominan en la zona (temperatura: 20-30 °C y cálido húmedo con lluvias en verano): seis genotipos de crecimiento indeterminado (Cid, Sun 7705, Moctezuma, Cuauhtémoc, Ramsés y Aníbal) y tres genotipos de crecimiento determinado (Palomo, Pony express y Toro), con fertirriego y bajo casa sombra en una superficie de 1000 m<sup>2</sup>. Todos los genotipos se establecieron en cuatro sistemas de producción. Las bolsas se llenaron con sustrato tezontle rojo de reúso cuyo cultivo anterior fue el chile (serrano y jalapeño) y en donde se detectó a *Fusarium* asociado con marchitez. Las macetas se colocaron sobre plástico negro para evitar el contacto directo del suelo e impedir el crecimiento de malezas entre las macetas. En el caso del sistema de producción

El estudio se realizó en Tepecoacuilco, Guerrero, México, en el invernadero “Valerio Trujano” del Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO) (18° 17' 54.5" N, 99° 27' 38.6" W). Se seleccionaron nueve genotipos comerciales de jitomate tipo saladette de las empresas Harris Moran (ocho genotipos) y Nunhems (un genotipo) para establecerse bajo las condiciones que predominan en la zona (temperatura: 20-30 °C y cálido húmedo con lluvias en verano): seis genotipos de crecimiento indeterminado (Cid, Sun 7705, Moctezuma, Cuauhtémoc, Ramsés y Aníbal) y tres genotipos de crecimiento determinado (Palomo, Pony express y Toro), con fertirriego y bajo casa sombra en una superficie de 1000 m<sup>2</sup>. Todos los genotipos se establecieron en cuatro sistemas de producción. Las bolsas se llenaron con sustrato tezontle rojo de reúso cuyo cultivo anterior fue el chile (serrano y jalapeño) y en donde se detectó a *Fusarium* asociado con marchitez. Las macetas se colocaron sobre plástico negro para evitar el contacto directo del suelo e impedir el crecimiento de malezas entre las macetas. En el caso del sistema de producción

en suelo, se utilizó acolchado plástico color gris-negro. Antes del trasplante se aplicó cuaternario de amonio para desinfectar el suelo y sustrato tezontle, a una dosis de 5 mL L<sup>-1</sup> de agua hasta capacidad de campo.

Las semillas de los genotipos se sembraron en sustrato (tierra lama: peatmoss: naturabono) previamente esterilizado. La nutrición en esta etapa se basó en aplicaciones de Rootex (3 g L<sup>-1</sup> de agua), Gro-Green (2 g L<sup>-1</sup>) y Ultrasol inicial (15-30-15). El experimento inició con el trasplante de las plántulas, el cual se realizó a los 30 días después de la siembra. Durante la etapa vegetativa y de producción del cultivo se realizaron aplicaciones de productos químicos y biológicos para el manejo de plagas y enfermedades. En cuanto a la nutrición del cultivo se hicieron aplicaciones de acuerdo a sus etapas fenológicas y se complementó con aplicaciones foliares de micronutrientes (Bayfolan Forte, Aminofit, Poliquel multi, Gro-Green, Biozime, entre otros). Además, los riegos se realizaron de forma automatizada, iniciando con la adición de 0.5 L de agua por planta (etapa vegetativa) hasta 3.0 L de agua (fructificación) al día.

En todos los sistemas de producción se realizaron prácticas culturales que consistieron en el tutorado, control de malezas (manual), podas de brotes y sanidad. Por otro lado, en los genotipos de crecimiento indeterminado se eliminaron las yemas laterales para dejar el tallo principal y, en los genotipos determinados esta práctica se omitió. Se implementó un diseño de bloques incompletos al azar con arreglo de parcelas divididas, en la parcela grande se ubicaron los sistemas de producción: 1) suelo con acolchado, 2) bolsas de polietileno blanco-negro de 37x37 cm, 3) bolsas de 40x40 cm y 4) bolsas de 40x45 cm. En tanto, en la parcela chica consistió en el establecimiento de los nueve genotipos con tres repeticiones por sistema de producción. Cada repetición del genotipo (32 plantas) se distribuyó

products were applied during the vegetative and production stages of the crop for pest and disease management. As for crop nutrition, applications were made according to the phenological stages, and complemented with foliar applications of micronutrients (Bayfolan Forte, Aminofit, Poliquel multi, Gro-Green, Biozime, among others). Irrigation was automated and started by adding 0.5 L of water per plant (vegetative stage) up to 3.0 L of water a day (fructification).

In all the production systems, agronomic practices were carried out, including tutorate, weed control (manual), bud pruning and plant health. On the other hand, the lateral buds of the genotypes with indeterminate growth were removed to keep only the main stem; for the genotypes with determined growth this practice was omitted. For the experiment, an incomplete randomized blocks design with a divided plot array was used in the largest plot where the production systems were established: 1) padded soil; 2) 37x37 cm white-black polyethylene bags; 3) 40x40 cm bags; and 4) 40x45 cm bags. The small plot was sown with the nine genotypes and three replications per production system. Each replication of the genotype (32 plants) was randomly distributed in each production system (large plot). Each system consisted of 864 plants with 96 plants per genotype, giving a total of 3,456 plants in the four systems. Each experiment unit consisted of two double-row furrows, 4 m long separated by a distance of 1.2 m between furrows and 0.5 m among plants. To assess the yield, each experiment unit was harvested by taking 12 plants from 32 plants per replication. The tomato fruits were weighed to obtain the yield per genotype and per production system. Data of the incidence and yield were subjected to a statistical analysis using the Statistical Analysis System (SAS) software, where an analysis of variance and Tukey's tests were done.

aleatoriamente en cada sistema de producción (parcela grande). Cada sistema estuvo constituido por un total de 864 plantas con 96 plantas por genotipo, generando un total de 3,456 plantas conformado por los cuatro sistemas. Cada unidad experimental estuvo constituida por dos surcos de doble hilera, una longitud de 4 m y una distancia entre surcos de 1.2 m y una distancia de 0.5 m entre plantas. Para la evaluación del rendimiento, se realizó la cosecha de cada unidad experimental, tomando 12 plantas de un total de 32 plantas por repetición. Los frutos se pesaron para obtener el rendimiento por genotipo y por sistema de producción. Los datos de incidencia y rendimiento se sometieron a un análisis estadístico con el software Statistical Analysis System (SAS) donde se les realizó análisis de varianza y prueba de Tukey.

La incidencia de la marchitez se realizó en todas las plantas de cada sistema de producción. Así mismo, en cada sistema se seleccionaron plantas que mostraron síntomas de marchitez para realizar la identificación del microorganismo asociado. Las plantas se lavaron con agua potable, se realizaron cortes transversales de tallo y raíces de 1 cm aproximadamente donde se seleccionaron de la zona de avance de la enfermedad, y se enjuagaron en agua destilada estéril; se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% durante 60 s y nuevamente se enjuagaron con agua destilada estéril (triple lavado). Los cortes vegetales se sembraron en cajas Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar). También, se realizaron cámaras húmedas en cajas Petri y se incubaron bajo condiciones ambientales. Finalmente, al observar la presencia de micelio se realizó la transferencia de puntas de hifa para su purificación e identificación morfológica (Leslie y Summerell, 2006).

Los síntomas iniciales observados, consistieron de un amarillamiento en el follaje, con pérdida de turgencia en la parte apical y de un marchitamiento

The wilt incidence was detected in all the plants of each production system. In addition, plants from each system showing wilt symptoms were selected to identify the associated microorganism. The plants were washed with running water, then cross-wise cuts of approximately 1 cm were made to stems and roots, from which the areas of the disease progression were selected, rinsed with sterile distilled water, submerged in 2% sodium hypochlorite for 60 s and rinsed again with sterile distilled water (triple wash). The cuts were sown in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA) culture medium. Humidity chambers were also carried out in Petri dishes and incubated at environmental conditions. When the presence of mycelium was detected, tips of hyphae were transferred for purification and morphological identification (Leslie and Summerell, 2006).

The initial symptoms were foliage yellowing, loss of turgor at the apex and general wilting; subsequently, the plants showed yellowing and necrosis on the intermediate and basal leaves (Figure 1A and B). Finally, the plants became brownish due to the attached fruits. At the level of the stem neck, a dark brown lesion developed (Figure 1C), which, as the days went by, expanded toward the upper part of the stem and, when a cross-wise cut was made, it could be seen that the xylem had a light brown color (Fernández-Herrera *et al.*, 2013). It should be noted that the symptoms were observed in the production stage of the crop. The *Fusarium* genus that produced cottony reddish mycelium with formation of slightly curve macronidia, 2-3 septa and abundant microconidia, was consistently isolated from the samples sown in PDA medium and in humidity chambers (20 plants) (Figure 1D). *Rhizoctonia solani* was also isolated though sporadically (two samples) and mixed with *Fusarium*. There are reports of *Fusarium* found in tomato genotypes under greenhouse conditions



general; posterior, las plantas presentaron un amarillamiento acompañado de necrosis en hojas medias y basales (Figura 1A y B). Finalmente, las plantas se tornaron con una tonalidad café con los frutos adheridos. A la altura del cuello del tallo hubo presencia de una lesión de color café oscuro (Figura

in the state of Michoacán, a fact that suggests that the pathogen is present in the production systems (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011).

The incidence evaluation was carried out 114 days after transplanting. The genotypes with indeterminate growth showing low incidence to wilt



Figura 1. Síntomas y microorganismo asociado a marchitez en plantas de jitomate bajo malla sombra en Tepecoacuilco, Gro. A) Amarillamiento y marchitez general bajo el sistema de suelo con acolchado; B) Bolsas de polietileno blanco-negro con tezontle; C) lesión de color café oscuro en la base del tallo y D) conidios de *Fusarium* sp.

Figure 1. Symptoms and microorganism associated with tomato plants wilt under shade mesh in Tepecoacuilco, Guerrero. A) General yellowish and wilt under a padded soil system; B) Black-white polyethylene bags with tezontle; C) Dark brown lesion at the stem base; and D) *Fusarium* sp. conidia.



1C), que conforme transcurrieron los días ésta se expandió hacia la parte superior del tallo y, al realizar un corte transversal se observó en el xilema una pigmentación café claro (Fernández-Herrera *et al.*, 2013). Cabe mencionar que los síntomas se observaron en la etapa de producción del cultivo. Tanto en las muestras sembradas en medio PDA como en cámaras húmedas (20 plantas) se aisló consistentemente al género *Fusarium*, el cual produjo micelio algodonoso de color rojizo, con formación de macroconidios ligeramente curvo de dos-tres septos y abundantes microconidios (Figura 1D). Por otra parte, también se aisló a *Rhizoctonia solani* pero de forma esporádica (dos muestras) y mezclado con *Fusarium*. Se tiene reportes de la presencia de *Fusarium* en genotipos de jitomate bajo invernadero en el estado de Michoacán, por lo que se infiere su presencia en estos sistemas de producción (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011).

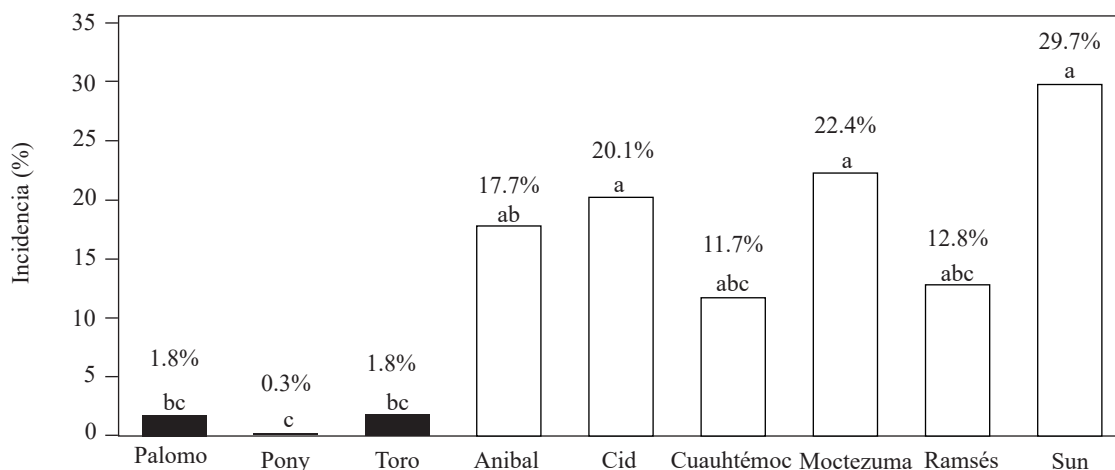
La evaluación de la incidencia se realizó a los 114 días después del trasplante. Los genotipos de crecimiento indeterminado que mostraron menor incidencia a la marchitez fueron Cuauhtémoc (11.7%) y Ramsés (12.7%) y, los de mayor incidencia fueron Cid, Moctezuma y Sun 7705 con 20, 22.4 y 29.7% en los cuatro sistemas evaluados (Figura 2). Para el caso de los genotipos de crecimiento determinado (Palomo, Pony express y Toro) mostraron una baja incidencia, del 0.3 y 1.8% respectivamente (Figura 2). En el caso del genotipo Toro presenta resistencia a *F. oxysporum* (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011), información que coincide con estos resultados que muestran no solo al genotipo Toro con menor incidencia, sino al resto de los genotipos de hábito de crecimiento determinado. Si bien en la presente investigación no se identificó a nivel especie, se puede relacionar algún grado de tolerancia de los genotipos a este microorganismo.

Es importante mencionar que, aunque las empresas de semillas (Harris Moran y Nunhems)

were Cuauhtémoc (11.7%) and Ramsés (12.7%) and the ones with high incidence were Cid, Moctezuma and Sun 7705 (20, 22.4 and 29.7%, respectively) in the four systems that were evaluated (Figure 2). The genotypes with determined growth (Palomo, Pony express and Toro) had low incidence of the 0.3 and 1.8%, respectively (Figure 2). The Toro genotype is resistant to *F. oxysporum* (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2011), and this information is in agreement with our results that showed that not only Toro showed lower incidence but also the other genotypes with determined growth habit. Although in this study tolerance was not identified at the species level, some level of the genotypes' tolerance can be associated with the microorganism.

It is important to mention that, although the seed companies (Harris Moran and Nunhems) report that the seed is tolerant to the fungus, this does not mean it is not susceptible to the pathogen's attack, given that infection by and susceptibility to *F. oxysporum* race 3 has been found in genotypes Cid, Anibal and Sun 7705 in San Luis Potosí (Hernández-Martínez *et al.*, 2014). It should also be highlighted that selecting genotypes tolerant to *F. oxysporum* is not the only parameter that should be considered when selecting the genotype to be sown, but also other parameters, including yield, tolerance to other diseases or pests and climatic conditions in the area where the crop is to be sown (Monge-Pérez, 2014), as well as the genetic variability that the pathogen may have in the soil, since *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* variability has been reported in high tomato production areas (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

In the system with higher wilt incidence, 37x37 cm polyethylene bags (26%) with 224 withered plants were used. In this system, Anibal, Sun 7705, Cid and Moctezuma genotypes had the highest percentage of withered plants ranging from 39.5 to 49% of incidence (Table 1). An explanation for the high incidence is the substrate, which had



**Figura 2. Incidencia de marchitez (*Fusarium* sp.) en genotipos de jitomate de hábito de crecimiento determinado e indeterminado establecido en cuatro sistemas de producción bajo malla sombra en Tepecoacuilco, Gro. Ciclo: Invierno-Primavera 2017-2018. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con Tukey ( $P < 0.5$ ).**  
**Figure 2. Wilt incidence (*Fusarium* sp.) in a tomato crop with determined and undetermined growth established in four production systems under shade mesh in Tepecoacuilco, Guerrero. Cycle: Winter-spring 2017-2018. Equal letters indicate that there are no significant differences, according to Tukey's test ( $P < 0.5$ ).**

reportan tolerancia a este hongo, no implica que no estén exentos al ataque de este patógeno, ya que se ha reportado infección y susceptibilidad de *F. oxysporum* raza 3 en los genotipos Cid, Anibal y Sun 7705 en San Luis Potosí (Hernández-Martínez *et al.*, 2014). También cabe enfatizar que la selección de genotipos a la tolerancia de *F. oxysporum* no es el único parámetro a considerar al seleccionar un genotipo para su siembra, sino también se debe contemplar otros parámetros como rendimiento, tolerancia a otras enfermedades o plagas, condiciones climáticas donde se establece el cultivo (Monte-Pérez, 2014); así como la variabilidad genética que pudiera presentar el patógeno en el suelo, ya que se ha reportado variabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en zonas de alta producción de esta hortaliza (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

En sistema con mayor incidencia de marchitez fue donde se utilizó bolsas de polietileno de tamaño de 37x37 cm (26%) con 224 plantas marchitas. En este sistema los genotipos Anibal, Sun 7705, Cid y

been used for other crops of the same botanical family (serrano and jalapeño peppers), where the microorganism and wilt symptoms were observed. The wilt incidence in 40x45 cm bags (40 withered plants) was of 4.7% (Figure 3). These results may be explained by the greater root development, the use of higher volume containers, and therefore, a higher capacity of the plants to tolerate the pathogen's attack compared to that of the plants in smaller bags (37x37 cm). In this regard, Arizaleta and Pire (2008) point out that the containers size has to do not only with the root development and growth, but also with the aerial development of the plants, in the case of coffee trees. On the other hand, Oagile *et al.* (2016) also conclude that the size of large containers in the development of tomato seedlings affects the plant's height, number of leaves, and fresh and dry weight. These data support the results obtained in this study, since we observed that the genotypes sown in larger bags (40x45 cm) produced taller plants, had higher root

Moctezuma tuvieron mayor porcentaje de plantas marchitas que oscilaron entre 39.5 a 49% de incidencia (Cuadro 1). Una explicación que se da a la alta incidencia es al hecho de que el sustrato que se utilizó era de reúso, donde previamente se estableció otro cultivo de la misma familia botánica (chile serrano y chile jalapeño) y mismo donde se detectó el microorganismo y se observaron síntomas de marchitez. La incidencia de marchitez en bolsas de tamaño de 40x45 cm fue de 4.7% (40 plantas marchitas) (Figura 3). Una respuesta a estos resultados, puede ser el hecho de tener mayor desarrollo de las raíces, al tener contenedores de mayor volumen de sustrato, por ende mayor capacidad de las plantas de tolerar el ataque del patógeno versus en bolsas de menor tamaño (37x37 cm). Al respecto, Arizaleta y Pire (2008) señalan que el tamaño de contenedores influye no solo en el desarrollo y crecimiento de la raíz, sino en el desarrollo aéreo de las plantas, en el caso de café. Por otra parte, Oagile *et al.* (2016) también concluyen que el tamaño de grandes con-

fresh and dried weight (data not published), as well as lower wilt incidence. This system (40x45 cm) also produced the greatest number of withered plants of the Sun 7705 genotype.

While the highest level of incidence was observed in the production system where 37x37 bags were used, the estimated potential yield was of 74.3 t ha<sup>-1</sup>, and in the production system where 40x45 cm bags were used (lower wilt incidence), the estimated potential yield was of 72.3 t ha<sup>-1</sup> (Table 1). These results show that regardless of the wilt incidence, the genotypes produced good yields under the conditions in the studied area. Also, wilt was observed in the phenological stage of the crop, so it did not significantly affect the yield.

Wilt symptoms in tomato crops were associated with the *Fusarium* genus. The genotypes with indeterminate growth Cuauhtémoc and Ramsés showed low wilt incidence caused by the microorganism in all the production systems, and in the case of the genotypes with determined growth,

**Cuadro 1. Número de plantas con marchitez y rendimiento en cuatro sistemas de producción, bajo malla sombra del cultivo de jitomate establecido en el vivero “Valerio Trujano” en Tepecoacuilco, Gro. Ciclo: Invierno-Primavera 2017-2018.**

**Table 1. Number of plants showing wilt and yield in four production systems under shade for a tomato crop established in the “Valerio Trujano” greenhouse in Tepecoacuilco, Gro. Cycle: Winter-spring 2017-2018.**

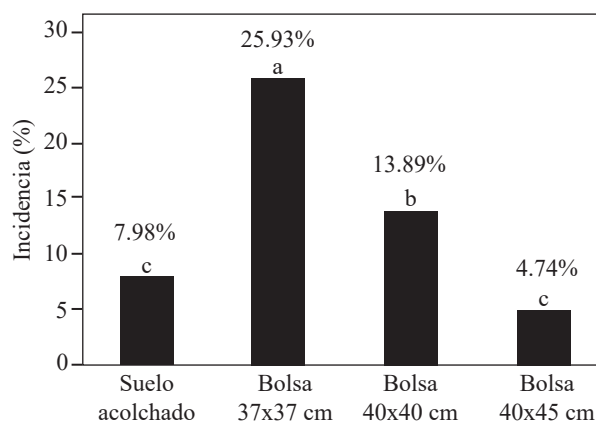
| Genotipo     | Plantas con marchitez/ Número de plantas totales<br>Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> ) / Sistema de producción |                     |       |                    |       |                    |       |                    |
|--------------|---|---------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|
|              | Suelo   | t ha <sup>-1</sup>  | 37x37 | t ha <sup>-1</sup> | 40x40 | t ha <sup>-1</sup> | 40x45 | t ha <sup>-1</sup> |
| Palomo       | 0/96  | 53.3 b <sup>z</sup> | 5/96  | 88.6 a             | 1/96  | 90.8 a             | 1/96  | 77.2 a             |
| Pony express | 0/96  | 56.7 b              | 0/96  | 91.4 a             | 0/96  | 84.1 a             | 1/96  | 84.9 a             |
| Toro         | 0/96  | 50.4 b              | 2/96  | 86.3 a             | 2/96  | 85.2 a             | 3/96  | 80.2 a             |
| Aníbal       | 6/96  | 81.7 a              | 47/96 | 71.1 b             | 12/96 | 67.9 b             | 3/96  | 68.8 b             |
| Cid          | 9/96  | 80.4 a              | 39/96 | 69.1 b             | 23/96 | 78.3 b             | 5/96  | 70.3 b             |
| Cuauhtémoc   | 3/96  | 84.5 a              | 24/96 | 69.6 b             | 14/96 | 61.9 b             | 4/96  | 68.0 b             |
| Moctezuma    | 16/96   | 85.3 a              | 38/96 | 65.7 b             | 27/96 | 79.5 b             | 5/96  | 78.8 b             |
| Ramsés       | 8/96  | 82.2 a              | 27/96 | 67.0 b             | 12/96 | 86.8 b             | 2/96  | 63.0 b             |
| Sun 7705     | 28/96   | 70.6 a              | 42/96 | 60.0 b             | 29/96 | 64.2 b             | 16/96 | 59.7 b             |

<sup>z</sup>Letras iguales en columnas indican que no existe diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con Tukey (P<0.5) / <sup>z</sup>Equal letters in the columns indicate that there are no statistically significant differences, according to Tukey's test (P<0.5).

tenedores en el desarrollo de plántulas de jitomate influye en la altura de la planta, número de hojas, peso fresco y seco de la planta. Estos datos sustentan los resultados obtenidos en la presente investigación ya que se observó que los genotipos que se sembraron en bolsas de mayor tamaño (40x45 cm) también presentaron mayor altura de la planta, peso fresco y seco de la raíz (datos no publicados), presentando menor incidencia de marchitez. Además, en este sistema (40x45 cm) también se observó el mayor número de plantas con marchitez del genotipo Sun 7705.

Si bien, en el sistema de producción de tamaño de bolsa de 37x37 cm ocurrió la mayor incidencia de marchitez, se obtuvo un rendimiento potencial estimado de 74.3 t ha<sup>-1</sup>, y en el caso del sistema de producción de tamaño de bolsa de 40x45 cm (menor incidencia de marchitez) presentó un rendimiento potencial estimado de 72.3 t ha<sup>-1</sup> (Cuadro 1). Estos resultados muestran que a pesar de la incidencia de la marchitez, los genotipos mostraron buenos rendimientos bajo las condiciones presentes en la zona. Además, la marchitez se presentó en la etapa fenológica de producción del cultivo, por lo que no afectó de manera significativa el rendimiento.

Los síntomas de marchitez en el cultivo de jitomate se asociaron al género *Fusarium*. Los genotipos de crecimiento indeterminado Cuauhtémoc y Ramsés mostraron baja incidencia de marchitez causada por el microorganismo en todos los sistemas de producción, y en el caso de los genotipos de crecimiento determinado, todos mostraron baja incidencia (0.2 a 1.8%). El genotipo Sun 7705 presentó la mayor incidencia de marchitez y menor rendimiento con un rango de 59.7 - 70.6 t ha<sup>-1</sup>. Finalmente, en los sistemas de producción evaluados se observó efecto en el rendimiento en los genotipos, así como en la incidencia de la marchitez, observándose menor número de plantas marchitas



**Figura 3.** Porcentaje de incidencia de marchitez (*Fusarium* spp.) en plantas de jitomate por cada sistema de producción bajo malla sombra, en Tepecoacuilco, Gro. Ciclo: Invierno-Primavera 2017-2018. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo con Tukey (P<0.5).

**Figure 3.** Percentage of wilt incidence (*Fusarium* spp.) in tomato plants per each production system under shade mesh in Tepecoacuilco, Guerrero. Cycle: Winter-spring 2017-2018. Equal letters indicate that there are no significant differences, according to Tukey's test (P<0.5).

all of them had low incidence (0.2-1.8%). The Sun 7705 genotype had the highest wilt incidence and the lowest yield with a range of 59.7 – 70.6 t ha<sup>-1</sup>. Finally, in the production system evaluated, an effect on genotype performance was observed, as well as on the wilt incidence, since only a small number of withered plants were observed in the 40x45 cm containers. In this study, *Fusarium* natural infection was observed in tomato. However, it is important to conduct further studies in order to identify the microorganism using molecular techniques and evaluate the pathogenicity in all genotypes to determine their tolerance.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the support financed through the “Protected Agriculture” project and the CSAEGRO for the development of the research work.

en los contenedores de tamaño de 40x45 cm. En este estudio se observó la infección natural de *Fusarium* en genotipos de jitomate; sin embargo, es importante realizar estudios adicionales para identificar el microorganismo con técnicas moleculares y evaluar la patogenicidad en todos los genotipos para determinar su tolerancia.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiado a través del proyecto “Agricultura Protegida” y al CSAEGRO para el desarrollo del trabajo de investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Arizaleta M y Pire R. 2008. Respuesta de plántulas de ca-feto al tamaño de la bolsa y fertilización con nitróge-no y fósforo en vivero. *Agrociencia* 42: 47-55. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000100006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000100006)
- Ascencio-Álvarez A, López-Benítez A, Borrego-Escalante F, Rodríguez-Herrera SA, Flores-Olivas A, Jiménez-Díaz F y Gámez-Vázquez AJ. 2008. Marchitez vascular de to-mate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26(2): 114-120. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n2/v26n2a3.pdf>
- Fernández-Herrera E, Guerrero Ruiz JC, Rueda Puente EO y Acosta Ramos M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15 (3): 46-50. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/viewFile/157/149>
- Forero-Reyes CM, Alvarado-Fernández AM, Ceballos-Rojas AM, González-Carmona LC, Linares-Linares MY, Cas-tañeda-Salazar R, Pulido-Villamarín A, Góngora-Medina ME, Cortés-Vecino JA y Rodríguez-Bocanegra MX. 2018. Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium* spp. en modelos vegetal y murino. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1): 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.009>
- Hernández-Martínez R, López-Benítez A, Borrego Escalante F, Espinoza Velázquez J, Sánchez-Aspeytia D, Maldonado Mendoza IE y López-Ochoa LA. 2014. Razas de *Fusa-rium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7):1169-1178. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v5n7/v5n7a3.pdf>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Monge-Pérez JE. 2014. Caracterización de 14 genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados bajo invernadero en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 27(4): 58-68. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i4.2086>
- Oagile O, Gabolemogwe P, Matsuane C and Mathowa T. 2016. Effect of container size on the growth and development of tomato seedlings. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(4):890-896. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.100>
- Rodríguez-Alvarado G, García-López J y Fernández-Pavía SP. 2011. Enfermedades del jitomate (*Solanum lycopersicum*) cultivado en invernadero en la zona Centro de Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1): 50-60. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a5.pdf>
- Rodríguez E, Carballo A, Baca GA, Martínez AG and Rosas MR. 2004. Genetic parameters of mean fruit weight and their components of tomato. *Acta Horticulture* 637:145-148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.637.15>
- Sánchez-Aspeytia D, Borrego-Escalante F, Zamora-Villa VM, Sánchez-Chaparro JD y Castillo-Reyes F. 2015. Estimación de la interacción genotipo-ambiente en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con el modelo AMMI. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(4): 763-778. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n4/v6n4a8.pdf>
- SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y pecuaria (SIAP). Ciudad de México. 215 p. [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)



# Graft response of *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to Begomovirus in field

## Respuesta del injerto de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* a Begomovirus en campo

Reyna Z. Navarrete-Mapen<sup>1</sup>, Jairo Cristóbal-Alejo<sup>1\*</sup>, Alberto Uc-Vázquez<sup>2</sup>, Arturo Reyes-Ramírez<sup>1</sup>, José M. Tun-Suárez<sup>1</sup>, Carlos Juan Alvarado-López<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico S/N, Conkal, Yucatán, México. C.P. 97345. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera, Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Yucatán, C.P 97302, México. \*Autor para correspondencia: jairoca54@hotmail.com

Recibido: 11 de Enero, 2020.

Aceptado: 28 de Febrero, 2020.

Navarrete-Mapen RZ, Cristóbal-Alejo J, Uc-Vázquez A, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM and Alvarado-López CJ. 2020. Graft response of *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to Begomovirus in field. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 226-238.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-2

Primera publicación DOI: 13 de Marzo, 2020.

First DOI publication: March 13, 2020.

**Resumen.** Uno de los problemas fitosanitarios en el cultivo de chile es la mosca blanca, transmisor de begomovirus. Ante la necesidad de alternativas, se planteó el objetivo de evaluar la tolerancia de injertos de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* a begomovirus bajo condiciones de campo. Se utilizaron dos materiales criollos para portainjerto (amashito y muela) y chile habanero como injerto (criollo y jaguar). Se empleó la

**Abstract.** One of the phytosanitary problems in the cultivation of pepper is the whitefly, begomovirus transmitter. Given the need for alternatives, the objective was to evaluate graft tolerance of *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to begomovirus under field conditions. Two creole materials were used for rootstock (amashito and muela) and habanero pepper as graft (criollo and jaguar). The “terminal plectrum” graft was used and six treatments were generated. The whitefly populations, the incidence and severity of the disease were recorded every 10 days, with the latter AUDPC were calculated and apparent infection rate  $Y_{final}$ . In the production stage, yield, length and diameter of fruits it was determined. At 130 days after transplantation, the population under whitefly, it was quantified in the grafted treatments (muela + habanero jaguar, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo y amashito + habanero criollo) that ranged from 5.5 to 14.5 insects per plant. The increased

injertación de “púa terminal” y se generaron seis tratamientos. Se registraron cada 10 días las poblaciones de mosca blanca, la incidencia y severidad de la enfermedad, con esta última se calcularon ABCDE, tasa de infección aparente y  $Y_{final}$ . En etapa de producción, se determinó rendimiento, longitud y diámetro de frutos. A los 130 días después del trasplante, la menor población de mosca blanca, se cuantificó en los tratamientos injertados (muela + habanero jaguar, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo y amashito + habanero criollo) que osciló entre 5.5 a 14.5 insectos por planta. La mayor incidencia y severidad promedio de virosis fue en habanero jaguar con 100 y 62%. La menor ABCPE, tasa de infección aparente y  $Y_{final}$  se estimaron en muela + habanero criollo con 746.6 (% por día), 0.005 (% por día) y 23.4%, en su orden; asociado con la fortaleza genética del portainjerto. Los injertos amashito + habanero jaguar, amashito + habanero criollo y muela + habanero criollo mostraron mejor comportamiento agronómico y productividad del cultivo.

**Palabras clave:** portainjertos, tolerancia, virosis, mosca blanca, chile.

En México, la producción de chile es afectada por plagas y enfermedades. En los últimos años, la mosca blanca se ha convertido en la principal transmisora de enfermedades inducidas por el género *Begomovirus* y han ocasionado pérdidas de producción de al menos 95% (García *et al.*, 2010). Para el control de esta plaga se implementan diferentes insecticidas; sin embargo, su uso genera contaminación e inducen resistencia en las poblaciones insectiles e inclusive con mayor agresividad (George *et al.*, 2015). Por otro lado, en el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense*) con denominación de origen de la península de Yucatán, se

incidence and severity of virus was average in habanero jaguar with 100 and 62%. The lowest AUDPC, apparent infection rate and  $Y_{final}$  were estimated in muela + habanero criollo with 746.6 (% per day), 0.0050 (% per day) and 23.4%, in their order; associated with the genetic strength of the rootstock. The grafts amashito + habanero jaguar, amashito + habanero criollo y muela + habanero criollo showed better agronomic performance and productivity of the crop.

**Key words:** rootstocks, tolerance, virosis, whitefly, chili pepper.

In Mexico, the production of chili peppers is affected by pests and diseases. In recent years, the whitefly has become the main transmitter of diseases induced by the genus *Begomovirus* and has caused production losses for at least 95% (García *et al.*, 2010). In order to control this pest, different insecticides have been used; however, their use leads to contamination and to resistance in even more aggressive resistance of insect populations (George *et al.*, 2015). On the other hand, in plantations of habanero peppers (*Capsicum chinense*) with denomination of origin of the Yucatan peninsula, there is an interest in implementing technologies based on plant resistance to reduce losses in production caused by virosis from this interaction. A strategy for the management of virosis and to improve the production in this crop is the use of grafted plants, which uses the virtues conferred by the rootstock and those of the graft of commercial interest. Previous investigations in watermelon and tomato plantations showed the efficiency of the use of rootstocks, in which tolerance was conferred to a virus complex such as: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus II* (WMV-II), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

tiene el interés de implementar tecnologías basadas en la resistencia vegetal con el fin de reducir pérdidas de producción causadas por virosis de esta interacción. Una estrategia para el manejo de virosis y mejorar la producción en este cultivo, es el uso de plantas injertadas donde se aprovechan las cualidades que confiere el portainjerto y las propias del injerto de interés comercial. Investigaciones previas en cultivos de sandía y jitomate, mostraron la eficacia del uso de portainjertos donde se confirió tolerancia a un complejo de virus como: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus II* (WMV-II), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Wang *et al.*, 2002); y en este aspecto, la opción de usar portainjertos silvestres tolerantes se presenta como una solución en campo al problema de virosis. El objetivo de este trabajo fue estimar bajo condiciones de campo la tolerancia del injerto de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* a begomovirus.

**Área de estudio y material genético.** El estudio se realizó con un productor cooperante en el estado de Yucatán, México, en una parcela ubicada entre 20° 58' 40" N y 89° 26' 30" W a una altitud de 8 m sobre nivel del mar. Se utilizaron dos variedades como injertos; habanero criollo y habanero jaguar (*C. chinense*), y como portainjertos amashito y muela (*C. annuum* var. *glabriusculum*) colectados en traspatio y selva aledaña.

**Obtención de los injertos.** Para favorecer la germinación de las semillas de los portainjertos, se sumergieron en ácido giberélico a 500 ppm por 24 h, posteriormente se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades en Sunshine #3® + Agrolita® en relación 2:1 como sustrato. Ocho días posteriores se sembraron las variedades comerciales de chile habanero utilizadas como injertos. Las

and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Wang *et al.*, 2002). In this regard, the option of using tolerant wild rootstocks is presented as a solution to the problem of virosis in the field. The aim of this investigation was to estimate, under field conditions, the tolerance of the graft of *Capsicum chinense-Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to begomovirus.

**Area of study and genetic material.** The study was carried out using a cooperating farmer in the state of Yucatan, Mexico, in a field located between 20° 58' 40" N and 89° 26' 30" W at an altitude of 8 m above sea level. Two varieties were used as grafts: habanero criollo and habanero jaguar (*C. chinense*), and as rootstock, amashito and muela (*C. annuum* var. *glabriusculum*) gathered in backyard orchards and the adjacent wilderness.

**Obtaining grafts.** In order to favor the germination of rootstock seeds, they were submerged in gibberellic acid at 500 ppm for 24 h. Later, they were planted in polystyrene trays with 200 cavities in Sunshine #3® + Agrolita® in a 2:1 ratio as a substrate. Eight days later, the commercial varieties of habanero peppers, used as grafts, were planted. The plants were grafted using the terminal plectrum technique when the stems of the rootstocks and the grafts were 2 mm in length. Grafted plants were kept for 21 days in a humid adaptation chamber at a humidity of 80% and 27 °C. After this time, they remained for 14 days in a tunnel-style greenhouse with 450 lux for their adaptation and growth.

**Establishment of the experiment.** The plantation was established under a system of drip irrigation and with a regional production, a distance of 1.2 m between furrows, and 0.40 m between plants. The soil texture, according to analyses, was clay-loam. The fertilization program consisted of N-N0<sub>3</sub>, 9.29,

plantas se injertaron mediante la técnica de púa terminal, cuando el tallo de los portainjertos y los injertos tuvieron 2 mm de diámetro. Las plantas injertadas se mantuvieron por 21 días en una cámara húmeda de adaptación a 80% de humedad relativa y 27 °C, posteriormente estuvieron por 14 días en un invernadero tipo túnel de 450 luxes para su adaptación y crecimiento.

**Establecimiento del experimento.** El cultivo se estableció bajo un sistema de riego por goteo y de producción regional, con una distancia de 1.2 m entre surcos y 0.40 m entre plantas. La textura del suelo según análisis previo fue franco-arcillosa. El programa de fertilización consistió: N-NO<sub>3</sub>, 9.29, N-NH<sub>4</sub>, 1.33, P-PO<sub>4</sub>, 1.42, K, 4.85, Ca, 4.32, Mg, 1.68, S-SO<sub>4</sub>, 2.56, Na<sup>+</sup>, 0.19, Cl<sup>-</sup>, 0.13 y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.01 meq L<sup>-1</sup>, respectivamente; con modificaciones según los requerimientos del cultivo. Se implementó un diseño experimental de bloques completos al azar, se establecieron seis tratamientos con cuatro repeticiones: amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo, muela + habanero jaguar y como testigos habanero criollo y habanero jaguar. Cada repetición constó de 30 plantas. El ciclo de producción fue de primavera-verano (12 de febrero a 25 de agosto de 2018) y sin la aplicación de plaguicidas.

**Fluctuación poblacional de mosca blanca.** Con el propósito de asociar la presencia de begomovirus con el vector, a partir del primer día del trasplante y hasta el final del ciclo del cultivo, se realizaron monitoreos de 10 plantas por repetición cada 10 días con la ayuda de un visor de monitoreo el cual consiste en un bote cilíndrico de 40 L, abierto por los extremos y con un orificio a un costado, uno de los extremos se tapa con polietileno transparente y el otro se coloca encima de la planta; por el orificio se sacude la planta con una varilla de madera y

N-NH<sub>4</sub>, 1.33, P-PO<sub>4</sub>, 1.42, K, 4.85, Ca, 4.32, Mg, 1.68, S-SO<sub>4</sub>, 2.56, Na<sup>+</sup>, 0.19, Cl<sup>-</sup>, 0.13 and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.01 meq L<sup>-1</sup>, respectively; with modifications according to crop requirements. A complete random block design was implemented; six treatments were established with four repetitions: amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo, muela + habanero jaguar, and as controls habanero criollo and habanero jaguar. Each repetition consisted of 30 plants. The production cycle was spring-summer (February 12 to August 25, 2018) and without the use of pesticides.

**Fluctuation of whitefly population.** In order to associate the presence of begomovirus with the vector, starting on the first day of transplant, and until the end of the planting cycle, 10 plants were monitored for each repetition every 10 days, using a monitoring visor, which consists of a cylindrical 40 L bucket, open on both ends and with a hole on one side. One of the ends is covered with transparent polyethylene and the other end is placed over the plant; through the hole, the plant is shaken with a wooden rod and the flies fly onto the polyethylene, where they are counted.

**Incidence and severity of virosis.** In each treatment, a quantification was performed (every 10 days) on plants with deformities, golden mosaics, wrinkles and leaf curling. Plants with these characteristics were divided between the total number of plants times 100. The viral severity was also estimated, using a pictorial severity scale of five types, created by the work group (Figure 1). The mean points of severity of each type of the proposed scale were obtained using the program 2-Log Ver. 1.0 (Mora *et al.*, 2000). Using the data obtained, disease progress curves were created, and the intensity of the disease was estimated using the

las moscas vuelan hacia el polietileno en donde se hace el conteo.

**Incidencia y severidad de virosis.** En cada tratamiento se cuantificó el número de plantas (cada 10 días) enfermas con deformaciones, mosaicos dorados, arrugamientos y acucharamientos. Las plantas con estas características se dividieron entre el número total de plantas por 100. También se estimó la severidad viral, mediante una escala de severidad pictórica de cinco clases elaborada por el grupo de trabajo (Figura 1). Los puntos medios de severidad de cada clase de la escala propuesta se obtuvieron con el programa 2-Log Ver. 1.0 (Mora *et al.*, 2000). Con los datos obtenidos se construyeron curvas del progreso de la enfermedad y se estimó la intensidad de la enfermedad con los siguientes parámetros epidemiológicos: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), tasa de infección aparente (con el modelo Weibull mediante su parámetro 1/b) y severidad final ( $Y_{\text{final}}$ ) (Morales, 2011).

following epidemiological parameters: Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC), apparent infection rate (with the Weibull model, with its parameter 1/b) and final severity ( $Y_{\text{final}}$ ) (Morales, 2011).

**Yield.** In each plantation, the number of fruits per plant and potential yield ( $\text{t ha}^{-1}$ ) were registered. Thirty fruits were selected at random per treatment and their length and equatorial diameter were measured, following the Mexican Official Norms NOM-189-SCFI-2017 for habanero peppers from the Yucatan peninsula.

**Statistical analyses.** The data obtained underwent an analysis of variance and the separation of means was carried out using the SNK method ( $P \leq 0.05$ ) with the SAS ver. 9.11 statistical package.

**Molecular identification of begomovirus.** The extraction of DNA was carried out following the

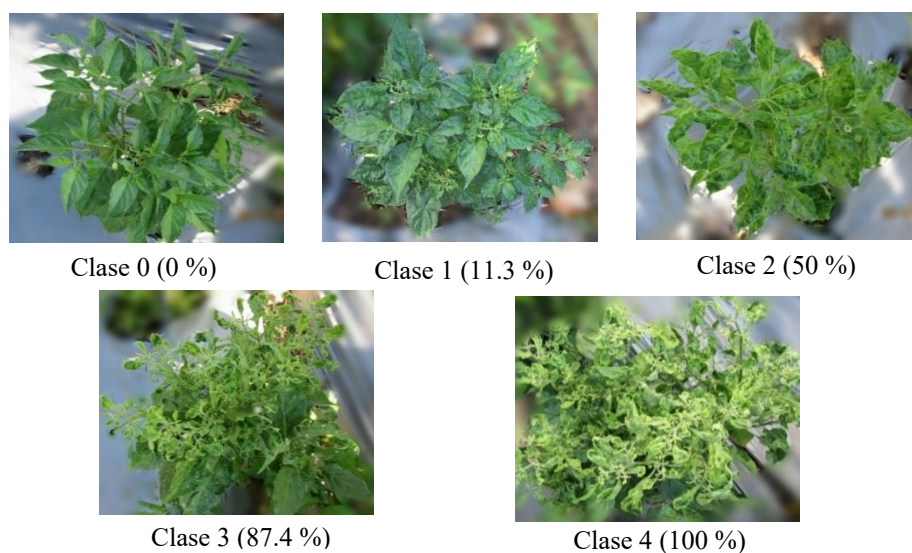


Figura 1. Escala pictórica de severidad en el patosistema *Capsicum chinense*-begomovirus.  
Figure 1. Pictorial severity in the *Capsicum chinense*-begomovirus pathosystem.



**Rendimiento.** En cada cosecha se registró el número de frutos por planta y el rendimiento potencial ( $t\ ha^{-1}$ ). Se seleccionaron 30 frutos al azar por tratamiento y se midió el largo y diámetro ecuatorial, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2017 de chile habanero de la Península de Yucatán.

**Análisis estadísticos.** Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y la separación de medias se hicieron con el método de SNK ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS ver. 9.11.

**Identificación molecular de begomovirus.** La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de DNAzol<sup>®</sup> Reagent según el proveedor (Life technologies) con modificaciones. De cada tratamiento y por cada repetición, se colectó una muestra foliar de tejido joven a partir de brotes nuevos (10 g) de 24 plantas con síntomas característicos de virosis a los 120 días después del trasplante (dat). La detección de begomovirus se realizó (en las 24 muestras colectadas) por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C durante 30 s, 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y finalmente un ciclo de 72 °C durante 30 s. En un tubo eppendorf se preparó una mezcla de reacción con los iniciadores AV494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') y AC1094 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3'); los cuales amplifican un segmento de la proteína de 600 pb de la cápside del género *Begomovirus* (Villanueva *et al.*, 2013). Con el fin de observar los productos finales de PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% en un equipo Applied Biosystems teñido con bromuro de etidio, y en un fotodocumentador UVP (Científica Sienna). A partir de las muestras positivas, se seleccionaron al azar seis muestras para la secuenciación en ambos sentidos a Macrogen, Corea. El

DNAzol<sup>®</sup> Reagent protocol, according to the supplier (Life technologies), with modifications. Out of each treatment and for each repetition, a young foliar tissue sample was taken from new sprouts (10 g) from 24 plants with similar virosis characteristics 120 days after transplanting (dat). The detection of begomovirus was carried out (in the 24 samples taken) by Polymerase Chain Reaction (PCR) under the following conditions: one cycle at 94 °C for 30 s, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and finally, one cycle at 72 °C for 30 s. In an Eppendorf tube, a reaction mixture was prepared with primers AV494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') and AC1094 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3'), which amplified a segment of the 600 pb protein of the capsid of the genus *Begomovirus* (Villanueva *et al.*, 2013). In order to observe the final products of PCR, electrophoresis was carried out in 1% agarose gel in Applied Biosystems equipment, stained with ethidium bromide, and in a UVP (Científica Sienna) photodocumenter. Out of the positive samples, six were chosen at random for the sequencing in both directions to Macrogen, Korea. The analysis *in silico* of the nucleotide sequences obtained was carried out by comparing the sequence of the NCBI, (National Center for Biotechnology Information) database, using the program BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool).

**Fluctuation of the whitefly population.** The first population record in the plantation was 40 dat and at 90 dat the largest average of insects per plant was quantified in habanero jaguar with 32 insects. At the end of the experiment, habanero jaguar and habanero criollo (ungrafted treatments), presented the highest average of the putative vector with 22 and 17 individuals per plant, respectively; whereas the treatments with grafting (muela + habanero

análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó mediante comparaciones con las secuencias de la base de datos del NCBI, (National Center for Biotechnology Information), mediante el programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool).

**Fluctuación poblacional de mosca blanca.** El primer registro poblacional en el cultivo fue los 40 ddt y a los 90 ddt se cuantificó el mayor promedio de insectos por planta en habanero jaguar con 32 insectos. Al final del experimento, habanero jaguar y habanero criollo (tratamientos sin injertar), presentaron mayor promedio del putativo vector con 22 y 17 individuos por planta, respectivamente; mientras que en los tratamientos donde se realizaron los injertos (muela + habanero jaguar, muela + habanero criollo, amashito + habanero jaguar y amashito + habanero criollo) mostraron menor población que oscilaron entre 5.5 a 14.5 insectos por planta (Figura 2). En un estudio con injertos de jitomate reportaron menor población de poblaciones de *Bactericera cockerelli*, *Liriomyza* spp. y áfidos (Cortes, 2010). Este efecto se ha explicado como

jaguar, muela + habanero criollo, amashito + habanero jaguar y amashito + habanero criollo) displayed lower populations that fluctuated between 5.5 and 14.5 insects per plant (Figure 2). A study with tomato grafts included a report of lower populations of *Bactericera cockerelli*, *Liriomyza* spp. and aphids (Cortes, 2010). This effect has been explained as an antixenosis, meaning that the insect feeds off least preferred foods, and even reproduces in them, but when there are plants with higher susceptibilities, such as the ungrafted controls, these are preferred by the insects.

**Incidence and severity of virosis.** At the end of the plantation, the lowest incidences of the disease were observed in muela + habanero criollo with 65%, and muela + habanero jaguar with 73% (Figure 3), in the remaining treatments, incidences were between 95 and 100%.

Severity was recorded starting 40 dat, and symptoms consisted of deformities, golden mosaics, wrinkling and leaf curling. According to the pictorial severity scale used, the treatments

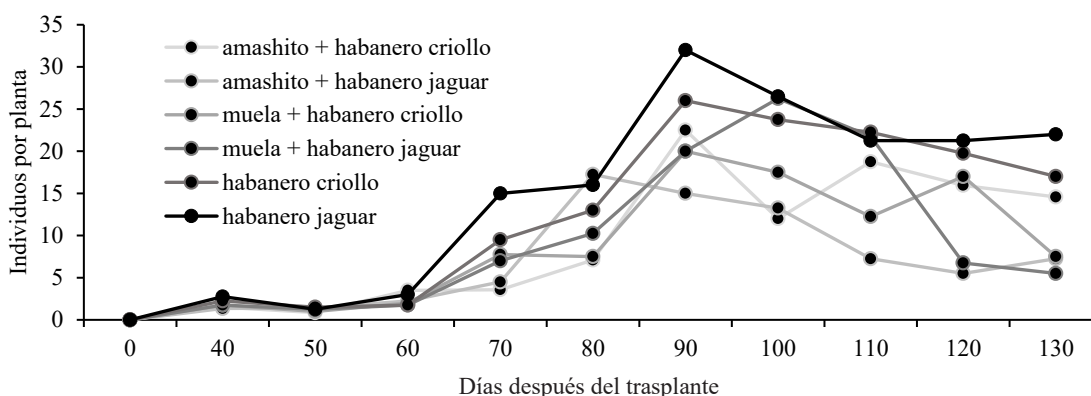


Figura 2. Fluctuación poblacional de mosca blanca en plantas injertadas y plantas testigo de habanero criollo y jaguar cultivados bajo condiciones de campo en Yucatán. Ciclo: Primavera-Verano.

Figure 2. Population fluctuation of whitefly in grafted plants and jaguar plants, planted under field conditions in Yucatan. Cycle: Spring-Summer.

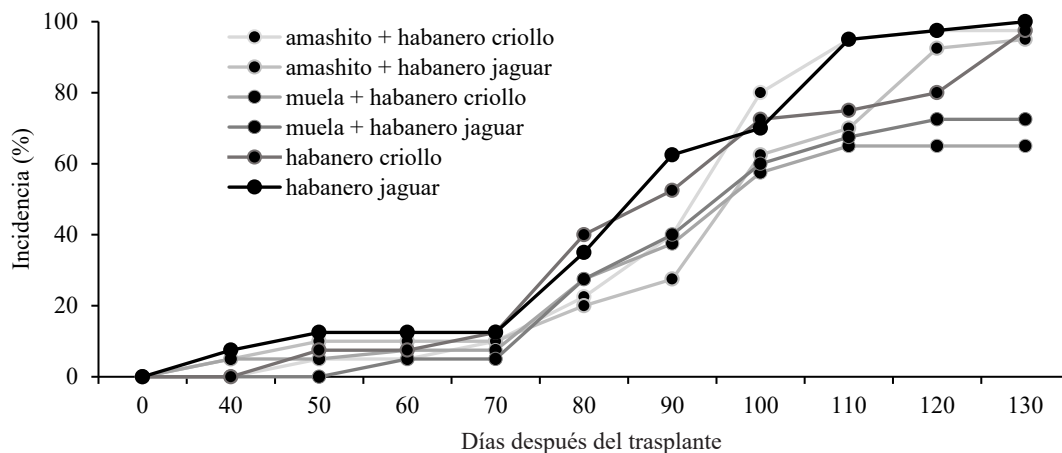
una antixenosis, es decir, el insecto se alimenta de plantas poco preferidas e incluso se reproduce en ellas, pero cuando hay plantas con mayor susceptibilidad, como los testigos sin injertar, éstas son preferidas por los insectos.

**Incidencia y severidad de virosis.** Al final del cultivo, las menores incidencia de la enfermedad se observaron en muela + habanero criollo con 65 % y muela + habanero jaguar con y 73 % (Figura 3), el resto de los tratamientos las incidencias de la enfermedad fueron del 95 al 100 %.

La severidad se registró a partir de los 40 ddt, los síntomas en follaje consistieron en deformaciones, mosaicos dorados, arrugamientos y acucharamientos. De acuerdo con la escala pictórica de severidad empleada, los tratamientos que mostraron los mayores porcentajes de severidad final de virosis fueron en habanero jaguar y habanero criollo con 62 y 58% (clase 2). En estos tratamientos la severidad incrementó en 44 y 48%, en su orden en

that presented the highest percentages of final virosis severity were in habanero jaguar and habanero criollo with 62 and 58 % (type 2). In these treatments, the severity increased by 44 and 48%, respectively, in relation to muela + habanero criollo, which allowed the 24% of final severity (type 1) (Figure 4).

In muela + habanero criollo, a value was presented below 746.6 % per day of the AUDPC with regard to habanero criollo and habanero jaguar, which displayed the highest intensity of the disease, with 2115.1 and 2341.2 % per day. The lowest apparent infection rate was registered in grafted treatments, particularly in muela + habanero criollo, and therefore, the health of the plants was better than in the rest of the treatments. At the end of the plantation, the grafted treatments had a lower trend in the  $Y_{final}$ ; likewise, in muela + habanero criollo, it helped obtain the lowest average for the  $Y_{final}$  (Table1). Investigations carried out with watermelon grafts reduced the AUDPC and improved crop yield (Winner *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Incidencia de virosis en plantas injertadas de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* cv. glabriusculum, bajo condiciones de campo en Yucatán. Ciclo: Primavera-Verano.

**Figure 3.** Incidence of virosis in grafted *Capsicum chinense-Capsicum annuum* cv. glabriusculum plants, under field conditions in Yucatan. Cycle: Spring-Summer.

relación con muela + habanero criollo que permitió el 24% de severidad final (clase 1) (Figura 4).

En muela + habanero criollo, se presentó un valor inferior de 746.6% por día del ABCPE con respecto al habanero criollo y el habanero jaguar que mostraron la mayor intensidad de la enfermedad con 2115.1 y 2341.2% por día. La menor tasa de infección aparente se registró en los tratamientos injertados, en particular en muela + habanero criollo, por lo que la sanidad de las plantas fue mejor que del resto de los tratamientos. Al final del cultivo, los tratamientos injertados, tuvieron una tendencia menor en la  $Y_{final}$ , también en muela + habanero criollo permitió el menor promedio de la  $Y_{final}$  (Cuadro 1). Trabajos realizados con injertos de sandía, disminuyeron el ABCPE y mejoraron el rendimiento del cultivo (Winmer *et al.*, 2015). En otro estudio demostraron que el uso de plantas injertadas en pimiento mejoró el comportamiento agronómico y el manejo de diversas plagas y enfermedades (Sánchez *et al.*, 2015). El uso de injertos, provee plantas vigorosas, capaces de permitir el crecimiento del cultivo en presencia de fitoparásitos

Another study showed how the use of plants grafted onto bell pepper plants improved the agronomic behavior and the management of pests and diseases (Sánchez *et al.*, 2015). The use of grafts provides vigorous plants, able to allow crop development in the presence of phytoparasites (Acevedo and Sánchez, 2017). In addition, it has been reported that grafted plants can activate defense mechanisms; in tobacco plants, the grafts promoted the accumulation of phenolic compounds and salicylic acid, which stimulated the peroxidase activity, and the replication of the *Potato Y virus* (PVY<sup>NTN</sup>) was reduced, resulting in the manifestation of only mild symptoms (Spoustová *et al.*, 2015). On the other hand, the resistance mechanisms in grafted tomato plants against *Pseudomonas solanacearum* were related to the rootstock, particularly in the lower section of the stem, where tyloses were formed (Grimault *et al.*, 1994). Grafted plants are known to share epigenetic traits, which makes them maintain their original genomes, even when they do not share DNA, although the epigenetic information is established within the plants (Fuentes *et al.*,

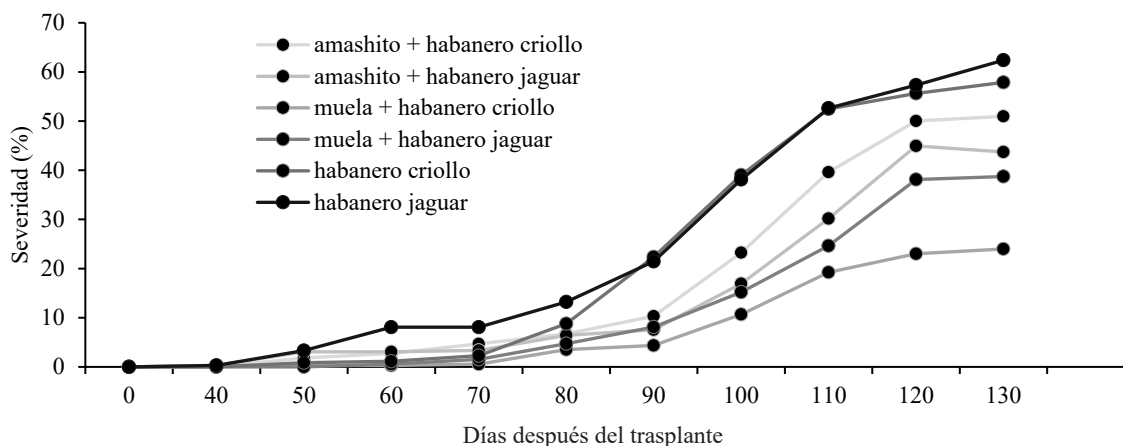


Figura 4. Severidad de virosis en plantas injertadas de *Capsicum chinense-Capsicum annuum* cv. *glabriusculum*, bajo condiciones de campo en Yucatán. Ciclo: Primavera-Verano.

Figure 4. Severity of virosis in *Capsicum chinense-Capsicum annuum* cv. *glabriusculum* grafted plants, under field conditions in Yucatan. Cycle: Spring-Summer.

**Cuadro 1. Parámetros epidemiológicos estimadores de intensidad de enfermedad en el patosistema con injertos de *Capsicum chinense*-begomovirus.****Table 1. Epidemiological parameters, estimators of the intensity of the disease in the pathosystem with *Capsicum chinense*-begomovirus grafts.**

| Tratamiento                 | ABCPE<br>(unidad % por día) | Tasa de la infección<br>aparente<br>(Weibull <sup>1b</sup> % por día) | r <sup>2</sup><br>(ajuste del modelo<br>Weibull) | Y <sub>final</sub> (%) |
|-----------------------------|-----------------------------|---|--|------------------------|
| amashito + habanero criollo | 1646.3 ab <sup>z</sup>      | 0.0073 ab   | 0.95   | 50.97 b                |
| amashito + habanero jaguar  | 1381.5 bc                   | 0.0066 ab   | 0.92   | 43.70 c                |
| muela + habanero criollo    | 746.6 c                     | 0.0050 b  | 0.93   | 23.49 d                |
| muela + habanero jaguar     | 1122.5 bc                   | 0.0063 ab   | 0.94   | 40.72 c                |
| habanero criollo            | 2115.1 a                    | 0.0074 ab   | 0.93   | 56.63 ab               |
| habanero jaguar             | 2341.2 a                    | 0.0081 a  | 0.95   | 62.38 a                |

<sup>z</sup> Medias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (SNK, P≤0.05) / Means with the same letter in the same column are not significantly different (SNK, P≤0.05).

(Acevedo y Sánchez, 2017). También, se ha reportado que plantas injertadas pueden activar mecanismos de defensa; en plantas de tabaco los injertos promovieron la acumulación de compuestos fenólicos y ácido salicílico, lo que estimuló la actividad de peroxidasa, y se disminuyó la replicación del el *Potato Y virus* (PVY<sup>NTN</sup>) y solo se manifestaron síntomas leves (Spoustová *et al.*, 2015). Por otro lado, los mecanismos de resistencia en plantas injertadas de jitomate contra *Pseudomonas solanacearum* estuvieron asociadas con el portainjerto, en particular en la parte inferior del tallo donde se formaron tilosas (Grimault *et al.*, 1994). Se sabe que plantas injertadas comparten rasgos epigenéticos, lo que las hace mantener sus genomas originales, aun cuando no comparten ADN, pero la información epigenética se establece dentro de las plantas (Fuentes *et al.*, 2014), lo que podría explicar, la respuesta tolerante a begomovirus en este estudio con plantas injertadas.

**Rendimiento.** El ciclo del cultivo fue de 130 días después del trasplante y se realizaron seis cosechas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas (P≤0.01). Los tratamientos injertados

2014), which may explain the tolerant response to begomovirus in this study with grafted plants.

**Yield.** The planting cycle was 130 days after grafting and six harvests were carried out. The analysis of variance displayed significant differences (P≤0.01). The grafted treatments had a higher yield, particularly amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar and muela + habanero criollo with an estimated potential yield of 18.3, 18.4 and 18.4 t ha<sup>-1</sup> (Table 2). The grafted plants are tolerant to various environmental stresses, such as drought, salinity, pests and diseases, and therefore improve water and nutrient absorption, and thus have a vigorous growth, a prolonged growth period, and an increased yield (Acevedo and Sánchez, 2017). In muela + habanero jaguar, the lowest estimated yield potential was found, with 9.8 t ha<sup>-1</sup>. Although the rootstocks are often carried out to provide greater yield, they may occasionally reduce it, due to compatibility with the plant being grafted. In solanaceae and cucurbits, the graft on vigorous patterns increased the production, although it depended on the rootstock-variety combination and the conditions of plantations (Di Gioia *et al.*, 2010).



tuvieron mayor rendimiento, en particular amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar y muela + habanero criollo con un rendimiento potencial estimada de 18.3, 18.4 y 18.4 t ha<sup>-1</sup> (Cuadro 2). Las plantas injertadas poseen tolerancia a varios ambientes estresantes, como sequía, salinidad, plagas y enfermedades; por lo que mejoran la absorción de agua y nutrientes, y con ello un crecimiento vigoroso, prolongación del periodo de crecimiento e incremento en el rendimiento (Acevedo y Sánchez, 2017). En muela + habanero jaguar, se tuvo la menor rendimiento potencial estimada con 9.8 t ha<sup>-1</sup>. Aunque los portainjertos a menudo se realizan para proporcionar mayor rendimiento, en ocasiones pueden reducirlo, por la compatibilidad con la planta a injertar. En solanáceas y cucurbitáceas, el injerto sobre patrones vigorosos logró incrementar la producción, aunque dependió de la combinación portainjerto-variedad y las condiciones de cultivo (Di Gioia *et al.*, 2010).

**Frutos.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en el tamaño de fruto (Cuadro 2).

De acuerdo con la NOM-189-SCFI-2017, establece parámetros aceptables de 3.8 a 5.5 cm de

**Fruits.** Significant differences ( $P \leq 0.01$ ) were observed in fruit sizes (Table 2). The NOM-189-SCFI-2017 establishes acceptable parameters between 3.8 and 5.5 cm in length and between 2.5 and 3.0 cm in width for habanero peppers. The results obtained in this study show that all treatments fulfill the parameters established by the NOM, with a range of 4.6 to 4.8 cm in length and 2.8 to 3.0 cm in diameter (Table 2).

**Sequencing, analysis and identification of begomovirus.** The sequencing of the six samples that gave positive for begomovirus displayed a homology of 83 to 91% of nucleotidic investigation with two isolations, DZI03W20 and GU355941.1 of the GenBank by BLASTn which corresponded to the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) and the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Out of the total, 84% were bipartite and corresponded to the treatments amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo, muela + habanero jaguar and habanero jaguar, and the remaining 16%, monopartite, detected in the treatment of habanero criollo. The sequences helped securely identify the presence of begomovirus, although it is recommended to

**Cuadro 2. Rendimiento total y número de frutos de plantas injertadas y plantas testigo de habanero criollo y jaguar cultivados bajo condiciones de campo en Yucatán.**

**Table 2. Total yield and number of fruits from grafted and control creole and jaguar habanero plants sown under field conditions in Yucatan.**

| Tratamiento                 | Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> ) | Total de frutos por ciclo | Largo (cm)  | Diámetro (cm) |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------|---------------|
| amashito + habanero criollo | 18.3 ±0.06 a <sup>z</sup>         | 667 ±27.3 c               | 4.7 ±0.08 a | 3.0 ±0.01 a   |
| amashito + habanero jaguar  | 18.4 ±0.07 a                      | 466 ±16.7 e               | 4.8 ±0.03 a | 2.9 ±0.02 b   |
| muela + habanero criollo    | 18.4 ±0.09 a                      | 887 ±15.7 a               | 4.8 ±0.01 a | 2.9 ±0.03 b   |
| muela + habanero jaguar     | 9.8 ±0.05 d                       | 585 ±13.6 d               | 4.7 ±0.04 a | 2.8 ±0.04 b   |
| habanero criollo            | 12.2 ±0.08 b                      | 760 ±13.8 b               | 4.6 ±0.05 a | 2.8 ±0.03 b   |
| habanero jaguar             | 13.8 ±0.06 c                      | 718 ±28.2 b               | 4.7 ±0.05 a | 2.8 ±0.01 b   |

<sup>z</sup> Medias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (SNK,  $P \leq 0.05$ ) / Means with the same letter in the same column are not statistically different (SNK,  $P \leq 0.05$ ).

largo y de 2.5 a 3.0 cm de ancho para el chile habanero. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que todos los tratamientos cumplen con los parámetros establecidos de la NOM, con un rango de 4.6 a 4.8 cm de largo y de 2.8 a 3.0 cm de diámetro (Cuadro 2).

**Secuenciación, análisis e identificación de begomovirus.** La secuenciación de las seis muestras positivas a begomovirus mostraron una homología del 83 al 91% de identidad nucleótida con dos aislados, el DZI03W20 y el GU355941.1 del GenBank mediante BLASTn que correspondieron a *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y al *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). El 84% fueron bipartita y correspondieron a los tratamientos amashito + habanero criollo, amashito + habanero jaguar, muela + habanero criollo, muela + habanero jaguar y habanero jaguar y el 16% monopartita detectado en el tratamiento habanero criollo. Las secuencias permitieron identificar con seguridad la presencia de begomovirus, aunque se recomienda utilizar oligonucleótidos específicos para cada uno de los virus preliminarmente identificados. Solamente uno de los productos de PCR enviados a secuenciar resultó con un porcentaje de homología del 83%, este porcentaje puede estar asociado con la presencia de bases no definidas (N) en algunas de las posiciones de la secuencia resultante o a otra especie de begomovirus. Sin embargo, este porcentaje realmente es mayor si se considera la edición con base al cromatograma correspondiente; proceso no realizado en los datos reportados. En el caso de los begomovirus, se ha establecido que la secuencia de una especie con una homología  $\geq 91\%$  con todo el genoma o parte del componente DNA-A, significa que se trata de la especie en cuestión, mientras que si se tiene una homología  $< 91\%$ , entonces debe considerarse una especie nueva (Brown *et al.*, 2015).

use specific oligonucleotides for each one of the preliminarily identified viruses. Only one of the products of PCR sent for sequencing turned out to have a percentage of homology of 83%, a percentage which may be related to the presence of undefined bases (N) in some of the positions of the resulting sequences or to another species of begomovirus. However, this percentage is actually higher if we consider the editing based on the corresponding chromatogram, a process which was not carried out in the data reported. In the case of begomovirus, it has been established that the sequence of one species with a homology  $\geq 91\%$  with the whole genome or part of the DNA-A component, means that we are dealing with the species in question, whereas if there is a homology  $< 91\%$ , then we are dealing with a new species (Brown *et al.*, 2015). Based on the results, the muela + habanero criollo grafts conferred a higher tolerance to virosis and had a lower white fly population. The amashito + habanero jaguar, amashito + habanero criollo and muela + creole habanero grafts displayed a better agronomic behavior and crop productivity.

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

Con base en los resultados, los injertos de muela + habanero criollo confirieron mayor tolerancia a virosis y tuvo menor población de mosca blanca. Los injertos amashito + habanero jaguar, amashito + habanero criollo y muela + habanero criollo mostraron mejor comportamiento agronómico y productividad del cultivo.

## LITERATURA CITADA

Acevedo J y Sánchez C. 2017. Eficiencia del uso de portainjerto sobre el rendimiento y dinámica nutricional foliar de macronutrientes en pimiento morrón. Revista Mexicana de

- Ciencias Agrícolas 8: 685-693. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263150932016>.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JCF, Fiallo-Olivé E, Briddon RW, Hernández-Zepeda C, Idris A, Malathi VG, Martin DP, Rivera-Bustamante R, Ueda S and Varsani A. 2015. Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*. 6:1593- 1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>.
- Cortes H. 2010. Resistencia a insectos de tomate injertado en parientes silvestres, con énfasis en *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera: Psilidae). *Bioagro* 22:11-16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85716706002>.
- Di Gioia F, Serio F, Buttaro D, Ayala O and Santamaria P. 2010. Influence of rootstock on vegetable growth, fruit yield and quality in “cuore di bue”, an heirloom tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85:477-482. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512701>.
- Fuentes I, Stegemann S, Golczyk H, Karcher D and Bock R. 2014. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature* 00:1-4. DOI. 10.1038/nature13291.
- García M, Trejo D y Rivera R. 2010. Veinte años de investigación con *Geminivirus* en vegetales en Guanajuato. *Acta Universitaria*. 3:84-92. <https://doi.org/10.15174/au.2010.64>.
- George D, Banfield J, Collier R, Cross J, Birch A, Gwynn R and Neill T. 2015. Identification of novel pesticides for use against glasshouse invertebrate pests in UK tomatoes and peppers. *Insects* 6:464. <https://doi.org/10.3390/insects6020464>.
- Grimault V, Lie B, Lemattre M, Prior P and Schmit J. 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:105-123. <https://www.academia.edu/29584807>.
- Mora A, Rivas V, Góngora C, Tovar S, Cristóbal J, Loeza K, Michereff J, Marinelli A y Osada V. 2000. Sistemas computarizados en epidemiología: 2-Log ver. 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Puerto Vallarta, México.
- Morales F. 2011. Interaction between *Bemisia tabaci*, Begomoviruses and plant species in Latin America and the Caribbean. In: Thompson, W. (ed). *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminiviruses-Infected Host plants. Netherlands. pp. 15-49. [https://links.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1524-0\\_2](https://links.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1524-0_2).
- Sánchez E, Torres A, Flores M, Preciado P y Márquez C. 2015. Uso de portainjerto sobre el rendimiento, calidad del fruto y resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento morrón. *Nova Scientia* 7:227-244. <https://www.redalyc.org/pdf/2033/203342741014.pdf>.
- Spoustová P, H'ysková V, Müller K, Schnablová R, Ryčslavá H, Ce'rovská N, Malbeck J, Cvikrová M and Synková H. 2015. Tobacco susceptibility to Potato virus YNTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. *Plant Science* 235: 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.017>.
- Villanueva H, Us R, López L, Robertson D, Guerra O, Minero Y and Moreno O. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology letters* 35: 811-823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>.
- Wang J, Zhang D and Fang Q. 2002. Studies on antiviral disease mechanism of grafted seedless watermelon. *Journal of Anhui Agricultural College* 29: 336-339. <http://europmc.org/article/cba/392005>.
- Winmer J, Inglis D and Mile C. 2015. Evaluating grafted watermelon for *Verticillium* wilt Severity, yield, and fruit quality in Washington State. *Hortsciencie*. 50:1332-1337. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1332>.

# Chemical treatment to wheat seed to reduce the incidence of bacteria

## Tratamiento químico en la semilla de trigo para disminuir la incidencia de bacterias

María Florencia Rodríguez-García\*, Julio Huerta-Espino, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir, Patricia Rivas-Valencia, Miguel González-González, René Hortelano-Santa Rosa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco Km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, CP 56250, México; Leticia Robles-Yerena, Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5 Tecámac, Estado de México, CP 55740, México. Sergio Aranda-Ocampo, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. \*Autor para correspondencia: rodriguez.maria@inifap.gob.mx

Recibido: 24 de Enero, 2020.

Aceptado: 23 de Febrero, 2020.

Rodríguez-García MF, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, Rivas-Valencia P, González-González M, Hortelano-Santa Rosa R, Robles-Yerena L and Aranda-Ocampo S. 2020. Chemical treatment to wheat seed to reduce the incidence of bacteria. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 239-249.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-5

Primera publicación DOI: 13 de Marzo, 2020.

First DOI publication: March 13, 2020.

**Resumen.** Actualmente la presencia de enfermedades en trigo causadas por bacterias ha incrementado hasta un 15%, debido probablemente a factores como: baja resistencia, cambio climático y contaminación de semilla. El objetivo fue evaluar tratamientos químicos para control de bacterias en semilla de trigo. Se utilizó semilla de tres variedades (Gálvez M87, Tlaxcala F2000 y Nana F2007)

**Abstract.** Currently the presence of diseases in wheat caused by bacteria has increased up to 15%, probably due to factors such as: low resistance, climate change and seed contamination. The objective was to evaluate chemical treatments for bacterial control in wheat seed. Seed of three varieties (Gálvez M87, Tlaxcala F2000 and Nana F2007) from four locations were used. Treatments were: hydrogen peroxide, sodium hypochlorite (2% and 5%) at three-time intervals (1, 2 and 3 min), Metacaptan (80, 90 and 100 g/100 kg seed), Cupravit Hydro (200, 300 and 400 g/100 kg seed) and untreated check. The treated seed was sown in Petri plates with nutritious Agar. The infected seed percentage (PSI) and the germination percentage (PG) were evaluated. The variance analysis showed high significance for PSI and PG. The product with the highest control of bacteria (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) was sodium hypochlorite at 5% at 2 and 3 min which reduced the PSI by 80% compared to the check,

y cuatro localidades. Los tratamientos fueron: peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio (2% y 5%) en tres intervalos de tiempo (1, 2 y 3 min), Metacaptan (80, 90 y 100 g/100 kg de semilla), Cupravit Hidro (200, 300 y 400 g/100 kg de semilla) y testigo sin tratamiento. La semilla tratada fue sembrada en cajas Petri con Agar nutritivo. Se evaluó porcentaje de semilla infectada (PSI) y porcentaje de germinación (PG). El análisis de varianza mostró alta significancia para PSI y PG. El producto con mayor control de bacterias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) fue hipoclorito de sodio al 5% a 2 y 3 min que redujo 80% el PSI en comparación con el testigo, seguido de hipoclorito de sodio al 2% 2 min y Metacaptan a 90 g, el menos efectivo fue peróxido de hidrogeno a 2 min. Ninguno de los productos evaluados fue efectivo al 100%.

**Palabras clave:** control, germinación, variedades.

El trigo harinero (*Triticum aestivum*), es el cereal con mayor producción en el mundo (FAO, 2018). En México, durante el 2018 destacó como el tercer cereal en importancia en cuanto a superficie sembrada (541,789 ha) (SIAP, 2019). Se prevé que para el 2050, la demanda de trigo aumentará un 70% debido al crecimiento de la población y los cambios en sus hábitos alimentarios; sin embargo, la producción de trigo en los últimos años se ha visto afectada por factores bióticos (plagas y enfermedades) y en gran parte por factores abióticos (suelo y clima) (Beddow *et al.*, 2015). Dentro de los factores bióticos, las enfermedades causadas principalmente por hongos, destacan aquellas causadas por el género *Puccinia* por ser considerada la más destructiva del trigo y con mayores pérdidas que ha generado en el mundo (Singh *et al.*, 2016). Sin embargo, en la actualidad las bacterias fitopatógenas han ocasionado considerables pérdidas en el

seguido por sodio hipoclorito al 2% a 2 min y Metacaptan a 90 g, y el menos efectivo fue peróxido de hidrogeno a 2 min. Ninguno de los productos evaluados fue 100% efectivo.

**Key words:** control, germination, varieties.

Bread wheat (*Triticum aestivum*) is the most grown cereal in the world (FAO, 2018). In Mexico, in 2018, bread wheat was the third most important cereal produced in terms of area sown (541,789 ha) (SIAP, 2019). Demand for wheat by 2050 is predicted to increase by 70% due to population growth and changes in people's diet. However, in recent years, wheat production has been affected by biotic factors (pests and diseases) and mostly by abiotic factors (soil and weather) (Beddow *et al.*, 2015). Among the biotic factors, diseases mainly caused by fungi, the most important are those caused by *Puccinia*, which is considered the most devastating genus causing the greatest crop losses in the world (Singh *et al.*, 2016). Currently, phytopathogenic bacteria are responsible for considerable wheat yield losses (Adhikari *et al.*, 2011; Kandel *et al.*, 2012). Nowadays, bacterial stripe caused by *Xanthomonas translucens* is the most common wheat disease (Adhikari *et al.*, 2011). On the other hand, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Syn. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*) and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* have re-emerged as a potential threat to bread wheat production in the United States and other countries in the world (Kandel *et al.*, 2012). There has been speculation that the re-emergence of diseases has to do with the low level of wheat varieties resistance, changes in the environment, especially temperature increases during the crop cycle, cultural practices and, probably, the evolution of pathogenic populations, which has turned them more virulent



cultivo (Adhikari *et al.*, 2011; Kandel *et al.*, 2012). En la actualidad el rayado bacteriano causado por *Xanthomonas translucens* es la enfermedad bacteriana más común de trigo (Adhikari *et al.*, 2011). Por otra parte, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Syn. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* han resurgido como una amenaza potencial en el trigo harinero en los Estados Unidos y otros países del mundo (Kandel *et al.*, 2012). Se ha especulado que la causa de la reaparición de las enfermedades es debido a un bajo nivel de resistencia de las variedades, los cambios del medio ambiente principalmente el aumento de la temperatura durante el ciclo del cultivo, las prácticas culturales y probablemente la evolución de las poblaciones patógenas a más virulentas (Kandel *et al.*, 2012; Ávila-Quezada *et al.*, 2018). Diversos estudios mencionan que el problema también podría deberse a la contaminación de semilla siendo una restricción para el intercambio de germoplasma (Adhikari *et al.*, 2011; Mezzalama, 2013). De acuerdo con Gitaitis y Walcott (2007) y Navarrete-Maya *et al.* (2014), el movimiento de estas semillas son fuente de inóculo de patógenos no solo para nuevas áreas sino además entre países. Estos mismos autores mencionan que las medidas de exclusión y evasión mediante el uso de cuarentenas y la producción de semillas en regiones semiáridas son eficaces hasta cierto punto ya que hasta el momento estas prácticas no han controlado al 100% las enfermedades bacterianas transmitidas por semilla. Las principales medidas de control de enfermedades causadas por fitobacterias han sido a través de los años las rotaciones con cultivos no hospedantes, la aplicación de bacterias antagonistas fluorescentes del género *Pseudomonas*, la producción de semilla en regiones libres de enfermedad y el mejoramiento genético para obtener resistencia (Sapkota *et al.*, 2020; Valencia-Botín *et al.*, 2012). La eliminación del patógeno de la semilla

(Kandel *et al.*, 2012; Ávila-Quezada *et al.*, 2018). Diverse studies mention that this could be a problem caused by seed contamination, a factor that restricts germplasm exchange (Adhikari *et al.*, 2011; Mezzalama, 2013). According to Gitaitis and Walcott (2007) and Navarrete-Maya *et al.* (2014), seed movement is the source of pathogen's inoculum not only in new areas but also among countries. The same authors mention that exclusion and evasion measures such as quarantine and seed production in semiarid regions are effective up to a certain level, since these practices have not totally controlled bacterial diseases transmitted by seed. Over the years, the main measures for controlling diseases caused by phyto-bacteria have been non-host crop rotations, use of fluorescent antagonistic bacteria of *Pseudomonas* genus, seed production in disease-free regions and genetic improvement to obtain resistant varieties (Sapkota *et al.*, 2020; Valencia-Botín *et al.*, 2012). The elimination of the pathogen from the seed could help to control bacterial diseases, but the methods developed so far are not effective. In recent years, the use of seed chemicals treatments has quickly accelerated and evolved due to the integration of diverse factors that have contributed to the development of strategies for controlling the disease (Munkvold, 2009). For this reason, the objective of this study was to try different chemical treatments for controlling bacteria in wheat seed that was produced under rainfed conditions and to determine the effect of these products on germination.

The experiment was established in May 2018 under controlled conditions in the National Laboratory for Rusts and Other Cereal Diseases (LANAREC), at the Experiment Station Valle de México of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP). The experiment was conducted using a completely randomized design under a factorial

puede ayudar al control de las enfermedades bacterianas, pero los métodos desarrollados hasta el momento no son eficaces. Durante los últimos años el uso de tratamientos químicos a la semilla se ha acelerado y evolucionado rápidamente ya que diversos factores se han unido para impulsar estrategias de control (Munkvold, 2009). Por lo cual, el objetivo de la investigación fue probar diferentes tratamientos químicos para el control de bacterias en semilla de trigo producida bajo condiciones de temporal y determinar el efecto de los productos en la germinación.

El experimento fue establecido durante el mes de mayo del 2018 bajo condiciones controladas en el Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de Cereales (LANAREC), ubicado en el Campo Experimental Valle de México, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Se utilizó un diseño completamente al azar bajo un arreglo factorial con tres repeticiones (3x16x4x3; variedades, tratamientos químicos, localidades y repeticiones). Se evaluaron lotes de semilla de tres variedades de trigo harinero recomendadas para siembras de temporal: Gálvez M87, Tlaxcala F2000 y Nana F2007; dichas variedades representan diferentes épocas de liberación comercial. Los lotes de semilla (100 g) de los tres genotipos fue semilla proveniente de cuatro localidades: Terrenate y Nanacamilpa, Tlaxcala; Chapingo, Edo. de México y, Cuyoaco, Puebla; las cuales en evaluación previa se determinó que eran portadoras de bacterias saprofitas y fitopatógenas principalmente del género *Pseudomonas* (datos sin publicar). Los 16 tratamientos químicos (incluyendo el testigo) a la semilla fueron: peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 3%) a 1, 2 y 3 min; hipoclorito de sodio (Cloralex) al 2% y 5% a 1, 2 y 3 min, Metoxicloro+Captan (Metacaptan) a 80, 90 y 100 g/100 kg de semilla e Hidróxido cúprico (Cupravit Hidro) a 200, 300 y 400 g/100 kg de

arrangement with three replications (3x16x4x3): varieties, chemical treatments, locations and replications. Seed lots of three bread wheat varieties recommended for rainfed conditions were evaluated: Gálvez M87, Tlaxcala F2000 and Nana F2007. These varieties are representative of different commercial release cycles. The seed lots (100 g) of the three seed genotypes came from four locations: Terrenate and Nanacamilpa, Tlaxcala; Chapingo, State of Mexico; and Cuyoaco, Puebla. Previous evaluations showed that these genotypes were saprophytic and phytopathogenic bacteria carriers, mainly of *Pseudomonas* genus (data not published). The 16 treatments used (including the check) were hydrogen peroxide (3% oxygenated water) for 1, 2 and 3 min; 2% and 5% sodium hypochlorite (Cloralex) for 1, 2 and 3 min, Methoxychlor+Captan (Metacaptan) to 80, 90 and 100 g/100 kg of seed, and copper hydroxide (Cupravit Hidro) to 200, 300 and 400 g/100 kg of seed; and seed with no chemical treatment. Hydrogen peroxide was applied to seed by immersion. In the case of Metacaptan and Cupravit Hidro, the products were first mixed with water and then applied to the seed. Once the chemical treatment was applied, the seed of each of the 576 treatments, which resulted from the combination of all the factors involved in the experiment design, were sown in plates containing nutritive agar. The experiment unit consisted of 10 seeds taken at random per plate (Warham *et al.*, 1997). They were then incubated at 25 to 28 °C for six days. The evaluated variables were infected seed percentage (PSI; seeds with bacterial exudate) and germination percentage (PG), which were obtained by visually counting each variable in relation to the total number of seeds in each plate. Two evaluations were carried out. The first was made three days after sowing, and the second, six days after sowing. The obtained data were subjected to statistical analysis

semilla; y semilla sin ningún tratamiento químico. Para peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio el tratamiento fue por inmersión; mientras que para Metacapatán y Cupravit Hidro el producto se mezcló con agua y se impregno a la semilla. Después de recibir el tratamiento químico, las semillas de cada uno de los 576 tratamientos, originados por la combinación de todos los factores involucrados en el diseño experimental, fueron sembradas en placa con medio Agar nutritivo. La unidad experimental consistió de 10 semillas tomadas al azar por placa (Warham *et al.*, 1997). Posteriormente se incubaron en un rango de temperatura de 25 a 28 °C durante tres a seis días. Las variables evaluadas fueron porcentaje de semillas infectadas (PSI; semillas con presencia de exudado bacteriano) y porcentaje de germinación (PG), obtenidas mediante un conteo visual para cada variable en relación al número total de semillas contenidas en cada placa. Se registraron dos evaluaciones, la primera a los tres días después de la siembra y la segunda a los seis días. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa SAS 9.1.3 (SAS Institute®, EUA) y se realizaron comparaciones de medias para las variables en estudio mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis de varianza para las variables evaluadas mostró diferencias estadísticas altamente significativas para el origen de la semilla (localidades), variedades y el tratamiento químico en sus respectivas dosis y/o tiempos de exposición. Para la interacción variedad\*producto únicamente para la variable PSI fue estadísticamente significativa; mientras que en PG no se observaron diferencias estadísticas significativas, aunque sí mostró tendencias negativas al aumentar el tiempo de exposición.

La comparación de los valores promedio de porcentaje de semilla infectada obtenidos por localidad (Cuadro 1) muestran que, para la semilla de

using SAS 9.1.3 (SAS Institute®, United States) and the means of the variables were compared by applying Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

The analysis of variance of the evaluated variables showed highly significant statistical differences for seed origin (locations), varieties and chemical treatments at the corresponding doses and/or time exposure. For the variety\*product interaction, only the PSI variable was statistically significant, and though no significant statistical differences were found in PG, it showed negative tendencies by increasing the exposure time.

The comparison of the average values of the infected seed percentage per location (Table 1) showed that the seed of the different varieties harvested in Terrenate, Tlaxcala, had a higher level of bacteria incidence with 62% of infected seed. Seed collected in Nanacamilpa, Tlaxcala, showed a lower level of bacteria incidence (27% of infected seeds). These results may be attributed to the environmental conditions prevailing in each location, and that, according to Villaseñor and Espitia (2000), the first location is considered as an intermediate production environment where rainfall ranges from 400 to 600 mm during the crop growth stage and the main problems are poorly distributed rainfall, high temperatures and foliar diseases. On the other hand, Nanacamilpa is considered a location with favorable production conditions with amounts of rainfall greater than 600 mm, usually well distributed, and mild temperature.

Regarding PG, the greatest problems were found in Terrenate, which only reached 55% germination, a fact that could indicate that there is a relation between seed infection and seed germination. The best average value of PG (80.6%) was observed in Chapingo, followed by Nanacamilpa (73.0%) (Table 1), whose response is probably influenced by the prevailing conditions in this region, which are ideal for other diseases but limited for bacteria.

**Cuadro 1. Comparación de medias para las variables porcentaje de semilla infectada con bacteria (PSI) y porcentaje de germinación (PG) de cuatro localidades y tres variedades de trigo.**

**Table 1. Comparison of means of the percentage of seed infected (PSI) by bacteria and germination percentage (PG) of four locations and three wheat varieties.**

|                          | PSI (%) | PG (%) |
|--------------------------|---------|--------|
| Localidades              |         |        |
| Terrenate, Tlaxcala      | 62.0 a  | 55.0 c |
| Cuyoaco, Puebla          | 49.0 b  | 68.4 b |
| Chapingo, Edo. de México | 43.4 c  | 80.6 a |
| Nanacamilpa, Tlaxcala    | 27.7 d  | 73.0 b |
| DHS                      | 0.46    | 0.51   |
| Variedades               |         |        |
| Tlaxcala F2000           | 48.9 a  | 78.8 a |
| Nana F2007               | 45.8 a  | 70.9 b |
| Gálvez M87               | 41.7 b  | 58.1 c |
| DHS                      | 0.36    | 0.4    |

PSI: porcentaje de semillas infectadas; PG: porcentaje de germinación. DHS: diferencia honesta significativa. Valores con letra similares dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey  $p \leq 0.05$ ) / PSI: infected seed percentage; PG: germination percentage. SHD = significant honest difference. Values with similar letters in the columns are statistically equal (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

las diferentes variedades cosechadas en Terrenate, Tlax., existen mayores problemas de incidencia de bacterias con 62% de semillas infectadas. La semilla obtenida en la localidad con menor incidencia de bacterias fue Nanacamilpa, Tlax. (27% semillas infectadas). Estos resultados probablemente se deban a las condiciones ambientales que prevalecen en cada localidad evaluada y que de acuerdo a Villaseñor y Espitia (2000) la primera localidad es considerada como un ambiente de producción intermedio donde la precipitación oscila entre los 400 a 600 mm durante la estación de crecimiento del cultivo y las principales problemáticas son precipitación mal distribuida, temperaturas altas y presencia de enfermedades foliares. Por otra parte, Nanacamilpa es considerada una localidad de producción favorable con precipitaciones mayores a los 600 mm, generalmente bien distribuidas y temperaturas medias.

The varieties mean indicates that there is a higher level of variation and that, for this reason, their performance varies under the environmental conditions in the evaluated sites. The differences identified in PSI were not statistically significant between varieties Tlaxcala F2000 and Nana F2007, but they were in Gálvez M87 (Table 1). This result could indicate that of the three evaluated varieties, Gálvez M87 probably has genes that confer resistance to bacteria, and/or because it is an early cycle variety (45 days to heading), this trait helps it escape the disease, as mentioned by Hortelano-Santa Rosa *et al.* (2016). On the other hand, when the PG results were compared, each variety also showed different performance. Tlaxcala F2000 had the highest PG, whose value was statistically higher than the value of Nana F2007 and Gálvez M87, as shown in Table 1.

En el caso de PG se observó que los mayores problemas se tuvieron nuevamente en Terrenate, alcanzando solo 55% de germinación lo cual indicaría una relación entre la presencia de infección por bacterias y germinación de la semilla. En la localidad de Chapingo, se observó el mejor valor promedio para esta variable (80.6%), seguido de Nanacamilpa (73.0%) (Cuadro 1), cuya respuesta es probablemente influenciada por las condiciones que prevalecen en estas regiones las cuales resultan idóneas para otras enfermedades, mientras que para bacterias es limitada.

El promedio de las variedades indica que existe mayor variación, por lo que las variedades se comportan de manera diferente a las condiciones ambientales de los sitios de evaluación. Las diferencias identificadas en PSI no fueron significativas estadísticamente entre las variedades Tlaxcala F2000 y Nana F2007, pero si en Gálvez M87 (Cuadro 1). Lo que podría indicar que, de las tres variedades evaluadas, Gálvez M87 probablemente posea genes que le confieren resistencia a bacterias y/o debido a que es una variedad de ciclo precoz (45 días a espigamiento), esta característica le permita tener escape a la enfermedad como lo mencionan Hortelano-Santa Rosa *et al.* (2016). Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos en PG, se observó también un comportamiento diferente de cada variedad. El mayor porcentaje de germinación se registró en Tlaxcala F2000 cuyo valor fue estadísticamente superior a Nana F2007 y Gálvez M87 como se indica en el Cuadro 1.

Los resultados de la comparación de medias para los diferentes productos y tiempo de exposición (tratamientos químicos) en el Cuadro 2, muestran diferencias estadísticas contrastantes entre los valores observados para cada tratamiento aplicado a las variedades evaluadas. El hipoclorito de sodio al 5% a 2 y 3 min, fue el tratamiento más efectivo en la reducción del PSI cuyos valores fueron es-

The results of means comparison of the different products and exposure time (chemical treatments) in Table 2, show statistically contrasting differences among the values observed in each treatment applied to the evaluated varieties. The most effective treatment to reduce PSI was 5% sodium hypochlorite at 2 and 3 min, whose values were statistically like the values obtained when using 2% sodium hypochlorite. Although the values do not show statistical differences, there is a numerical superiority in the case of 5% sodium hypochlorite at different exposure times. For the seed treated with Metacaptan, the values were statistically similar to those obtained using 2% sodium hypochlorite, except at a 90 g dose, where the mean value was statistically similar that obtained using 5% sodium hypochlorite (Table 2). The treatments with copper hydroxide were more effective at low doses (200 g). However, our results are not satisfactory due to the high percentage of infected seeds (55% of infected seed). In the case of seed treated with hydrogen peroxide, the infection values were very high and the three-time intervals for the treatment were statistically similar. The check treatment had the highest percentage of infected seeds (93.9%), and as expected, the control of bacterial infection was statistically null. However, the PG was more than 10% higher compared to the PG of the treatment with copper hydroxide (300 g/100 kg of seed) (Table 2).

In the PG variable, the performance was very similar to the control in PSI. The highest germination percentage was obtained with 5% sodium hypochlorite at 1 min, with an average value of 82%. This value is statistically similar to that obtained with sodium hypochlorite at 2 min, which, when compared to the PSI values, showed the best bacterial control. Although the variations in the average response to the PG treatments are more contrasting between and among the groups



**Cuadro 2. Comportamiento promedio de incidencia de bacterias en semilla y porcentaje de germinación para tratamientos químicos aplicados en tres variedades de trigo harinero y cuatro localidades.**

**Table 2. Average performance of the level of incidence of bacteria in seed and germination percentage of the chemical treatments applied to three bread wheat varieties and four locations.**

| Tratamiento                              | PSI      | PG        |
|------------------------------------------|----------|-----------|
| Testigo sin tratar                       | 93.9 a   | 68.6 abcd |
| Peróxido de hidrógeno 1 min              | 70.6 cb  | 79.2 ab   |
| Peróxido de hidrógeno 2 min              | 76.1 b   | 65.0 cd   |
| Peróxido de hidrógeno 3 min              | 68.6 cb  | 59.2 d    |
| Hidróxido cúprico 200 g/100 kg semilla   | 55.1 d   | 69.2 abcd |
| Hidróxido cúprico 300 g/100 kg semilla   | 63.1 cd  | 56.6 d    |
| Hidróxido cúprico 400 g/100 kg semilla   | 64.7 cbd | 57.5 d    |
| Metoxicloro+Captan 80 g/100 kg semilla   | 33.3 e   | 74.2 abc  |
| Metoxicloro+Captan 90g/100 kg semilla    | 29.4 fe  | 65.0 cd   |
| Metoxicloro+Captan 100 g/100 kg semilla  | 34.4 e   | 68.1 bcd  |
| Hipoclorito de sodio al 2 % 1 min        | 26.9 fe  | 79.4 ab   |
| Hipoclorito de sodio al 2 % 2 min        | 23.9 fe  | 76.1 abc  |
| Hipoclorito de sodio al 2 % 3 min        | 27.2 fe  | 67.8 bcd  |
| Hipoclorito de sodio (CLORALEX 5%) 1 min | 22.2 fe  | 81.9 a    |
| Hipoclorito de sodio (CLORALEX 5%) 2 min | 18.9 f   | 76.3 abc  |
| Hipoclorito de sodio (CLORALEX 5%) 3 min | 18.6 f   | 64.3 cd   |
| DHS                                      | 1.23     | 1.36      |

PSI: porcentaje de semilla infectada; PG: porcentaje de germinación. DHS: diferencia honesta significativa. Valores con letra similares dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey  $p \leq 0.05$ ) / PSI: infected seed percentage; PG: germination percentage. SHD = significant honest difference. Values with similar letters in the columns are statistically equal (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

tadísticamente similares a los observados con los tratamientos de hipoclorito de sodio al 2%. Aunque los valores obtenidos no muestran diferencias estadísticas, numéricamente se observa una superioridad para hipoclorito de sodio al 5% en sus distintos tiempos de exposición. Para los tratamientos con Metacaptan, los valores observados fueron estadísticamente similares a los obtenidos para hipoclorito de sodio al 2%, con excepción de la dosis a 90 g cuyo valor promedio fue similar estadísticamente a los valores obtenidos con hipoclorito de sodio al 5% (Cuadro 2). Los tratamientos de hidróxido cúprico mostraron un mayor control cuando se utilizan dosis bajas (200 g); sin embargo, los resultados obtenidos no son satisfactorios debido al alto porcentaje de semillas infectadas (55% de semilla

of products, it can be generally observed that treatments with hydrogen peroxide and copper hydroxide have the lowest germination percentages and are directly related to the control of the incidence; they are also the treatments with the lowest control in this study.

In the case of the control, the mean germination percentage is statistically similar to that of all the chemical treatments, when all the treatments were conjunctly analyzed; showed that the time interval or the product dose has a significant influence in the response of seed germination. The germination value of the check is not affected as it happens in the treatments to which some chemical product is applied though there is no control of bacteria incidence in the check. These results agree with the

infectada). En el caso del tratamiento con peróxido de hidrógeno, se observaron valores de infección muy altos siendo estadísticamente similares los tres tiempos utilizados para este tratamiento. El tratamiento testigo mostró el mayor porcentaje de semillas infectadas (93.9 %) como se esperaría, el control de la infección por bacterias fue estadísticamente nulo. Sin embargo, en el PG fue superior en más del 10% con respecto al PG obtenido por el tratamiento del Hidróxido cúprico 300 g/100 kg de semilla (Cuadro 2).

Para la variable PG, se observó un comportamiento similar al control observado en PSI. El mayor porcentaje de germinación se tuvo con hipoclorito de sodio al 5% a 1 min siendo su valor promedio de 82%; este valor es similar estadísticamente al obtenido con hipoclorito de sodio a 2 min lo cual, al compararlos con los valores de PSI, se tienen los mejores controles de bacteria. No obstante, que la variación en la respuesta promedio de los tratamientos para PG son más contrastantes entre y dentro de grupos de productos, es posible observar de manera general que, en los tratamientos con peróxido de hidrógeno e Hidróxido cúprico se tienen los menores porcentajes de germinación cuya relación directa en el control de la incidencia, también son los que menor control tienen en este estudio. En el caso del testigo, el porcentaje promedio de germinación muestra similitud estadística con todos los tratamientos químicos, lo cual, al analizar a todos los tratamientos en su conjunto, se observa que el tiempo o dosis de producto influye significativamente en la respuesta a la germinación de las semillas, y dado que, en el testigo, aunque no se tiene control de la incidencia de bacterias, su valor de germinación no se ve afectado, como ocurre en los tratamientos donde se aplica algún producto químico. Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Lozano-Ramírez *et al.* (2006), quienes indican que al aplicar a la semilla de trigo la mezcla

results reported by Lozano-Ramírez *et al.* (2006), who indicated that when a mixture of four active ingredients (carboxine+captan+thiram+tebuconazole) was used to control *Fusarium graminearum*, the germination percentage was affected and reduced to 85.5% compared to that of the control (97%).

Currently, with the re-emergence of phytopathological problems caused by bacteria, as pointed out by Adhikari *et al.* (2011) and Kandel *et al.* (2012); considering that one of the main means of bacterial diseases dispersal is seed, germplasm exchange and seed movement from one site to another, as indicated by Navarrete-Maya *et al.* (2014), Gitaitis and Walcott (2007); and, because of the short availability of genetically resistant wheat germplasm (Sapkota *et al.*, 2020), chemical treatments can be one of the most viable measures for seed treatment, as indicated by Munkvold (2009), which entails the decrease of the level of incidence and dispersal of bacterial and phytopathogenic fungi in wheat crops, since these factors limit the yield potential of the genotype.

Although the best bacterial control was achieved with 5% sodium hypochlorite (Cloralex commercial product), when the seed is exposed for long periods, the percentage germination is affected. Maeso and Walasek (2012) reported an effective control (99%) using sodium hypochlorite 1% of active chlorine in a treatment applied to tomato seed to protect it against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, without affecting germination. Currently, the main objective of seed treatments is to control fungi. Yet, it is also important to consider bacteria, and, for this reason, a treatment with Metacaptan (Metoxicloro+Captan) at a higher dose (90 g/100 kg/seed) than the recommended (80 g/100 kg/ of seed) is a viable option. Regarding copper hydroxide, Forster and Schaad (1988) reported an effective control in *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*

de cuatro ingredientes activos (carboxina+captan+thiram+tebuconazole) para el control de *Fusarium graminearum*, el porcentaje de germinación fue afectada disminuyendo en un 84.5% en comparación con el testigo que fue de un 97%.

En la actualidad con el resurgimiento de los problemas fitopatológicos causados por bacterias como lo indican Adhikari *et al.* (2011) y Kandel *et al.* (2012) considerando que uno de los principales medios de propagación de las enfermedades causadas por bacterias es por medio de la semilla, por el intercambio de germoplasma y por el movimiento de esta de un sitio a otro como lo indican Navarrete-Maya *et al.* (2014) y Gitaitis y Walcott (2007) y, debido a la limitada disponibilidad de germoplasma de trigo con resistencia genética (Sapkota *et al.*, 2020), el tratamiento químico puede ser una de las medidas más viables para el tratamiento de semilla como lo indica Munkvold (2009) y que conlleva a disminuir la incidencia y diseminación de bacterias y hongos fitopatógenos en el cultivo de trigo, que afectan la calidad fisiológica de la semilla y que limitan explotar el potencial de rendimiento del genotipo.

El mejor control de bacterias se obtuvo con hipoclorito de sodio al 5% (producto comercial Cloralex), aunque a tiempos prolongados de exposición de la semilla, el porcentaje de germinación se ve afectado. Maeso y Walasek (2012) reportaron un control efectivo (99%) con hipoclorito de sodio 1% de cloro activo, para el tratamiento de semilla de tomate contra cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, sin efecto en la germinación. En la actualidad el principal objetivo de tratar la semilla es para el control de hongos; pero es importante considerar también a las bacterias, por lo que el tratamiento con Metacaptan (Metoxicloro+Captan) a una dosis más alta (90 g/100 kg/semilla) de la recomendada (80 g/ 100 kg/ semilla) es una opción viable. Para el Hidróxido

(Syn. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*) in seed treatments at a dose of 260 mL/100 kg of seed. However, in this study, the obtained results were not satisfactory because other products were more effective (5% sodium hypochlorite). It is important to consider the combination of chemotherapy and thermotherapy studies in further research since these could provide a more effective control.

Based on the results of this study, the best product (effective and low-cost) for controlling bacteria was 5% sodium hypochlorite at 2 and 3 min, followed by 2% sodium hypochlorite at 2 min, and Metacaptan at 90 g. However, when using 5% sodium hypochlorite at 3 min, germination was reduced by 17%. The least effective product was hydrogen peroxide at 2 min, but none of the products used was 100% effective for controlling bacteria. Currently, it is important to highlight that the genetic improvement programs should take into consideration the diseases caused by bacteria given that the crop yield and economic losses are significant and there is no genetic resistance to address this problem.

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

cúprico Forster y Schaad (1988), reportaron un control efectivo para *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Syn. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*), tratando la semilla de trigo a una dosis de 260 mL/100 kg de semilla, no obstante, en el presente estudio los resultados no fueron satisfactorios ya que otros productos tuvieron mayor efectividad (hipoclorito de sodio al 5%). Es importante considerar para futuros estudios conjuntar quimioterapia y termoterapia lo que podría llegar a un control más eficiente.

Con el presente estudio, se determinó que el mejor producto (eficiente y de bajo costo) para el control de bacterias fue hipoclorito de sodio al 5% a 2 y 3 min, seguido de hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y Metacaptan a 90 g; sin embargo, hipoclorito de sodio al 5% durante 3 min afectó la germinación en un 17%. El producto menos efectivo fue peróxido de hidrógeno a 2 min; no obstante, ningún producto aplicado funcionó al 100% en el control de bacterias. En la actualidad es importante considerar en los programas de mejoramiento genético a las enfermedades causadas por bacterias, ya que las pérdidas del rendimiento y económicas están siendo significativas y no existe resistencia genética para esta problemática.

## LITERATURA CITADA

- Adhikari TB, Hansen JM, Gurung S and Bonman JM. 2011. Identification of new sources of resistance in winter wheat to multiple strains of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Plant Disease. 95:582-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0760>
- Avila-Quezada GD, Esquivel JF, Silva-Rojas HV, Leyva-Mir SG, Garcia-Avila C de J, Noriega-Orozco L, Rivas-Valencia P, Ojeda-Barrios D and Castillo AM. 2018. "Emerging Plant Diseases under a Changing Climate Scenario: Threats to Our Global Food Supply". Emirates Journal of Food and Agriculture. 30 (6):443-450. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i6.1715>
- Beddow JM, Pardey PG, Chai Y, Hurley TM, Kriticos DJ, Braun HJ, Park RF, William SC and Yonow T. 2015. Research investment implications of shifts in the global geography of wheat stripe rust. Nature Plants. 1:15132. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.132>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Diciembre 2018).
- Forster RL and Schaad NW. 1988. Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. Plant Disease 72:935-938. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0935>
- Gitaitis R and Walcott R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology. 45:371-397. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-45.062806.094321>
- Hortelano- Santa Rosa R, Espitia-Rangel E, Martínez-Cruz E, Villaseñor-Mir HE, Huerta-Espino J y Mariscal-Amaro L. 2016. Productividad y calidad industrial de trigos harineros en relación a enfermedades. Agrociencia. 50:1027-1039. <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2016/nov-dic/art-7.pdf>
- Kandel YR, Glover KD, Tande CA and Osborne LE. 2012. Evaluation of spring wheat germplasm for resistance to bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Plant Disease. 96:1743-1748. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0303-RE>
- Lozano-Ramírez N, Mezzalama M, Carballo-Carballo A y Hernández-Livera A. 2006. Efectos de fungicidas en la calidad fisiológica de la semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y su eficacia en el control de *Fusarium graminearum* Schwabe [*Gibberella zeae* (Schwein.) Petch.] y *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker [*Cochliobolus sativus* S. Ito y Kurib.] Revista Mexicana de Fitopatología. 24: 115-121. <http://www.redalyc.org/html/612/61224205/>
- Maeso D y Walasek W. 2012. Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Agrociencia Uruguay 16:134-141. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2301-15482012000100016](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100016)
- Mezzalama, M. 2013. Sanidad de semilla: Promover la distribución segura de semilla de maíz y de trigo: Lineamientos generales. Tercera edición. México, D. F: CIMMYT. 50 pp.
- Munkvold PG. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. Annual Review of Phytopathology. 47:285-311. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081916>
- Navarrete-Maya R, Aranda-Ocampo S, Rodríguez-Mejía ML, Moya-Hernández SL y González-Ochoa MG. Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. 2014. Revista Mexicana de Fitopatología. 32: 75-88. [http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_01.pdf](http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_01.pdf)
- Sapkota S, Mergoum M, Liu Z. 2020. The translucens group of *Xanthomonas translucens*: Complicated and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. Molecular Plant Pathology. 00:1-12. <https://doi.org/10.1111/mpp.12909>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Singh RP, Singh PK, Rutkoski J, Hodson DP, Lee X, Jorgensen LN, Hovmoller MS and Huerta-Espino J. 2016. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. Annual Review of Phytopathology. 54:303-322. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095835>
- Valencia-Botín AJ and Cisneros-López ME. 2012. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. International Journal of Agronomy 4:5. <https://doi.org/10.1155/2012/692350>
- Villaseñor MHE, y Espitia RE. 2000. Características de las áreas productoras de trigo de temporal: Problemática y condiciones de producción. In: El trigo de temporal en México. Villaseñor MHE, y Espitia RE, (eds.). Chapingo, Edo. de Méx., México, SAGAR, INIFAP, CEVAMEX. Libro Técnico No. 1. pp 85-97. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1821>
- Warham EJ, Butler LD y Sutton RC. 1997. Ensayo para la semilla de maíz y de trigo: Manual de laboratorio. CIMMYT, México. 84p. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/579/67049.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

# Identification of associated fungi to diseases in *Cereus jamacaru* and *Cereus hildmannianus*

## Identificación de hongos asociados a las enfermedades de *Cereus jamacaru* y *Cereus hildmannianus*

Rommel dos Santos Siqueira-Gomes\*, José Thiago Aires-Souza, Program of Graduate in Agronomy, Federal University of Paraíba, Rodovia PB 079-Km 12-Caixa Postal 66 - CEP 58397-000-Areia, Brazil; **Gabriel Ginane-Barreto**, Bachelor in Biological Sciences, Center of Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, Brazil; **Luciana Cordeiro do-Nascimento**, Department of Plant Science and Environmental Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, Brazil. \*Corresponding author: pratacca@gmail.com.

Recibido: 06 de Febrero, 2020.

Aceptado: 19 de Marzo, 2020.

dos Santos Siqueira-Gomes R, Aires-Souza JT, Ginane-Barreto G and Cordeiro-do Nascimento L. 2020. Identification of associated fungi to diseases in *Cereus jamacaru* and *Cereus hildmannianus*. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 250-257.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-3

Primera publicación DOI: 01 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 01, 2020.

**Resumen.** Aunque los cactus están bien adaptados a los climas semiáridos brasileños, corren el riesgo de verse afectados por importantes problemas fitosanitarios, causando graves daños a su desarrollo. Por lo tanto, el diagnóstico correcto del agente etiológico es el paso más importante para apoyar la recomendación de estrategias de control eficientes. El objetivo de este estudio fue identificar agentes etiológicos causantes de enfermedades en cladodios de mandacaru (*Cereus jamacaru*) y mandacaru sin espinas (*C. hildmannianus*). Los

**Abstract.** Although cacti are well adapted to the climatic rigors of the Brazilian semiarid region, they run the risk of being affected by important phytosanitary problems. These problems cause serious damage during their development. Therefore, the correct diagnosis of the etiologic agent is the most important step to enable the recommendation of efficient control strategies. The objective of this study was to identify etiological agents that caused diseases in mandacaru cladodes (*Cereus jamacaru*) and mandacaru spineless (*C. hildmannianus*). The cladodes were collected from infected plants in the field in the Sítio Paraíso community, in the municipality of Prata, State of Paraíba, Brazil. They were analyzed at the Phytopathology Laboratory/CCA/UFPB. The fungal structures were observed under optical microscopy, from vegetative and reproductive structures of the fungi grown in PDA (potato-dextrose-agar) medium at 25 ± 2 °C and under a photoperiod of 12 h of light. The genera were observed: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia*



cladodios se recolectaron de plantas infectadas en condiciones de campo en la comunidad de Sítio Paraíso, en el municipio de Prata, Estado de Paraíba, Brasil, y se enviaron para su análisis en el Laboratorio de Fitopatología/CCA/UFPB. Las estructuras fúngicas se observaron bajo el microscopio óptico, a partir de estructuras vegetativas y reproductivas de los hongos cultivados en medio PDA (papa-dextrosa-agar) a  $25 \pm 2$  °C y bajo 12 h de fotoperíodo de luz. Los géneros que se observaron fueron: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Scytalidium lignicola*. Los hongos *Colletotrichum* sp. y *S. lignicola* se consideran los primeros informes en cladodios de *Cereus jacamaru* y *C. hildemannianus* en el Estado de Paraíba, Brasil.

**Palabras clave:** Cactaceae, mandacaru, noroeste, sanidad, semiárido brasileiro

La familia de las cactáceas es endémica del continente americano, donde presenta una alta riqueza de especies y abundancia. La familia incluye más de 1,500 especies distribuidas a nivel mundial, habitando diferentes ambientes, desde tierras secas hasta selvas húmedas. Han evolucionado hasta adaptarse morfológicamente y fisiológicamente a climas extremos (Cavalcante *et al.*, 2013). Las cactáceas suelen ser usadas como plantas ornamentales, aunque también crecen como plantas salvajes en regiones áridas y semiáridas. Además, pueden ser usadas como parte importante de la nutrición humana, debido a la calidad y el sabor de sus frutos, que se pueden consumir frescos, y los jóvenes cladodios pueden ser usados como vegetales en ensaladas (Shetty *et al.*, 2012).

El mandacaru (*Cereus jamacaru*) y otras cactáceas nativas presentan una amplia distribución en

sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. and *Scytalidium lignicola*. The fungi *Colletotrichum* sp. and *S. lignicola* are considered the first reports of episodes of *Cereus jacamaru* and *C. hildemannianus* in State of Paraíba, Brazil.

**Key words:** Cactaceae, mandacaru, northeast, health, Brazilian semiarid region

The family Cactaceae is native to the American continent, where it displays high species richness and abundance. The family includes over 1,500 species distributed worldwide, inhabiting different environments from drylands to wet forests. They have evolved to be morphologically and physiologically adapted to extreme climates (Cavalcante *et al.*, 2013). Cacti often used as ornamental plants, but they also grow as wild plants in arid and semiarid regions. Moreover, they can be used as an important part of human nutrition due to the quality and flavor of their fruit, which can be consumed fresh, and the use of young cladodes as vegetables in salads (Shetty *et al.*, 2012).

Mandacaru (*Cereus jamacaru*) and other native cacti are widely distributed in the Caatinga biome, and their presence is important to the fauna and flora of the ecosystem. Mandacaru is used as a source of water during long droughts. In Brazil, it is also used as a strategic forage resource by producers to meet the nutritional demand of ruminants in the dry season (Silva *et al.*, 2010). *Cereus hildemannianus*, a spineless type of mandacaru, is used as an ornamental plant, and it is nutritious for animals due to its high protein content of 10.7% (Silva *et al.*, 2017). As a forage alternative, the spineless mandacaru may represent an advance in animal nutrition. The absence of spines facilitates its cultivation as well as the feeding process to livestock (Santos and Souza, 2016).

el bioma de Caatinga y su presencia es importante para la fauna y la flora del ecosistema. El mandacaru es utilizado como Fuente de agua durante sequías prolongadas. En Brasil, también se usa como forraje estratégico por parte de productores para satisfacer la demanda nutricional de rumiantes en épocas de sequía (Silva *et al.*, 2010). *Cereus hildmannianus*, un tipo de mandacaru sin espinas, es usado como planta ornamental y es nutritivo para los animales, debido a su elevado contenido de proteínico de 10.7% (Silva *et al.*, 2017). Como alternativa de forraje, el mandacaru sin espinas puede representar un avance en la nutrición animal. La ausencia de espinas facilita su cultivo, así como el proceso de alimentación de ganado (Santos y Souza, 2016).

Estas cactáceas son sujetas a ataques de patógenos, en especial de hongos, que preferencialmente afectan la porción apical del cladodio. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dichotomophthora cactacearum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma* sp., *Phytophthora* sp., y *Scytalidium lignicola*, fueron identificados entre otros como patógenos de plantas de mandacaru (*C. jamacaru*) en el estado brasileño de Ceará (Freire, 2009). Sin embargo, pocos estudios han descrito el daño causado por enfermedades fúngicas a plantas del género *Cereus*. Tales estudios podrían identificar la etiología de la enfermedad y coadyuvar en el desarrollo de estrategias de manejo.

La introducción de nuevas variedades de plantas ornamentales se ha visto acelerada, en especial mediante el uso de semillas, cortes y otros propágulos sin certificación. Estos pueden ingresar nuevos patógenos al país. Por ende, la presencia de hongos puede conducir a pérdidas significativas relacionadas con enfermedades, debido al uso de semillas o propágulos contaminados o infectados (Barreto *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue identificar agentes causales de enfermedades en cladodios de mandacaru y mandacaru sin espinas.

These cacti are subject to pathogen attacks, particularly fungi, that preferentially affect the apical portion of the cladode. Identified *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dichotomophthora cactacearum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma* sp., *Phytophthora* sp., *Scytalidium lignicola*, among others, as pathogens of mandacaru (*C. jamacaru*) plants in the Brazilian state of Ceará (Freire, 2009). However, few studies have described the damage caused by fungal diseases to plants of the genus *Cereus*. Such studies could clarify the etiology of the disease and aid in the development of management strategies.

The introduction of new ornamental plants varieties has accelerated, particularly through the use of seeds, cuttings and other propagules without certification. These can carry new pathogens into the country. Thus, the presence of fungi can lead to significant disease-related losses due to the use of contaminated or infected seeds or propagules (Barreto *et al.*, 2011). The objective of this study was to identify causative agents of diseases in cladodes of mandacaru and spineless mandacaru.

Cladodes were collected in the sampling point 07° 44' 36.8" S and 37° 03' 16.4" W at the Sítio Paraíso community, located in the municipality of Prata, State of Paraíba, Brazil. The infected cladodes were transported to the Laboratory of Phytopathology, in the Department of Plant and Environmental Sciences, Federal University of Paraíba, located in the city of Areia.

Cladodes that presented symptoms of the disease were washed and air-dried at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). Tissue fragments were removed using a sterile scalpel to collect parts of the infected cladode tissue. The fragments were disinfected using 70% ethanol for 30 seconds, followed by 1% sodium hypochlorite for 1 minute, and they were rinsed with sterile deionized water. Five tissue fragments were incubated in potato-dextrose-agar

Se colectaron cladodios en el punto de muestreo 07° 44' 36.8" S y 37° 03' 16.4" O en la comunidad de Sítio Paraíso, ubicada en el municipio de Prata, estado de Paraíba, Brasil. Los cladodios infectados fueron transportados al Laboratorio de Fitopatología, en el Departamento de Ciencias Vegetales y Ambientales, Universidad Federal de Paraíba, ubicada en la ciudad de Areia.

Los cladodios que presentaron síntomas de la enfermedad se lavaron y secaron al aire a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Se removieron fragmentos de tejidos con un bisturí para recolectar partes del tejido de cladodio infectados. Los fragmentos se desinfectaron usando etanol al 70% durante 30 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, y luego se enjugaron con agua esterilizada desionizada. Se incubaron cinco fragmentos de tejido en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA) a 25 °C, con un fotoperiodo de 12 h de luz:12 h de oscuridad en una cámara de demanda de oxígeno bioquímica.

La identificación de los hongos se llevó a cabo después de 7 días de incubación, basada en la separación física de los hongos promovidos por el tejido hospedante, usando un microscopio óptico y un estereoscopio. Las estructuras morfológicas y reproductivas de los hongos se compararon con las descripciones en la literatura (Seifert *et al.*, 2011). Por último, se determinó la ocurrencia de hongos asociados con cualquier tipo de mandacaru.

En la prueba de patogenicidad se utilizaron plantas sanas, de 90 días de edad, sembradas en invernadero en macetas de 1.5 dm<sup>3</sup> llenas de tierra estéril. Se usaron aislamientos de plantas sintomáticas obtenidas por aislamiento indirecto, siguiendo las indicaciones descritas anteriormente, dando un total de cinco plantas por aislamiento. Las plantas fueron inoculadas por la aspersión de los cladodios con una suspensión de conidios a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup> de los *Colleto-*

(PDA) medium at 25 °C, with a photoperiod of 12 h light:12 h dark in a biochemical oxygen demand chamber.

Fungi identification was performed after seven days of incubation based on the physical separation of the fungi promoted by the host tissue, using an optical microscope and stereoscope. The morphological and reproductive structures of the fungi were compared with literature descriptions (Seifert *et al.*, 2011). Lastly, the occurrence of fungi associated with either type of mandacaru was determined.

Healthy plants aged 90 days, grown in the greenhouse in 1.5 dm<sup>3</sup> pots filled with sterile soil were used in the pathogenicity test. Isolates from symptomatic plants obtained through indirect isolation as described above were used, totaling five plants per isolate. Plants were inoculated by spraying the cladodes with a conidia suspension at  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of the *Colletotrichum* sp. and *Scytalidium lignicola* because it was the fungi that had the highest disease intensity in the evaluated cladodes. Controls were sprayed with sterile deionized water. After spraying using a manual spray bottle to the point of dripping, cladodes were covered with polyethylene bags wetted with sterile deionized water and incubated in a moist chamber for 24 h. The inoculated cladodes were kept under greenhouse conditions until the onset of symptoms.

Based on the micro-morphological characteristics of the conidia, the following fungi were identified: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., and *Scytalidium lignicola* in *Cereus jamacaru* cladodes and *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Scytalidium lignicola*, *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp. in material isolated from *C. hildmannianus*. Similar fungi were identified by Freire (2009) in a study of mandacaru pathogens

*trichum* sp. y *Scytalidium lignicola*, debido a que fue el hongo con la mayor intensidad de la enfermedad en los cladodios evaluados. Los testigos fueron rociados con agua estéril desionizada. Después de rociar con una botella de espray manual hasta el punto de goteo, los cladodios se cubrieron con bolsas de polietileno humedecidas con agua estéril desionizada e incubados en una cámara húmeda por 24 h. Los cladodios incubados se mantuvieron bajo condiciones de invernadero hasta el inicio de los síntomas.

Con base en las características micromorfológicas de los conidios, se identificaron los siguientes hongos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., y *Scytalidium lignicola* en *Cereus jamacaru* cladodes y *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Scytalidium lignicola*, *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. en material aislado de *C. hildmannianus*. Hongos similares fueron identificados por Freire (2009) en un estudio de patógenos de mandacaru, y por Souza *et al.* (2017) en un estudio que identificó hongos en nopales (*Opuntia ficus-indica*).

Con base en los aparentes síntomas en los cladodios de ambos tipos de mandacaru (*C. jamacaru* y *C. hildmannianus*), las enfermedades identificadas fueron antracnosis, causada por *Colletotrichum* sp. y pudrición escamosa, causada por *Scytalidium lignicola* (Figura 1 y 2).

Según Freire (2009), la antracnosis en el mandacaru es una enfermedad esporádica que ocurre especialmente durante la temporada de humedad. Fue en este momento que se observaron síntomas en las porciones terminales de las plantas recolectadas en Ceará. La enfermedad causó lesiones extendidas y azuladas, que a veces presentaba líneas concéntricas (Figura 1b).

Hasta la fecha, ningún estudio ha reportado *S. lignicola* como el agente causal de la pudrición escamosa en mandacaru sin espinas. Por ende,

and by Souza *et al.* (2017) in a study that identified fungi in giant prickly pear (*Opuntia ficus-indica*).

Based on the apparent symptoms in the cladodes of both types of mandacaru (*C. jamacaru* and *C. hildmannianus*), the identified diseases were anthracnose, caused by *Colletotrichum* sp., and squamous rot caused by *Scytalidium lignicola* (Figure 1 and 2).

According to Freire (2009), anthracnose in mandacaru is a sporadic disease that occurs particularly during the wet season. This is when the symptoms were observed in the terminal portions of plants collected in Ceará. The disease caused extended, bluish lesions, which at times displayed concentric lines (Figure 1b).

To date, no study has reported *S. lignicola* as the causative agent of squamous rot in spineless mandacaru. Thus, this is the first report for the studied pathosystem (Figure 2). According to Souza *et al.* (2010) and Lopes (2012), the disease is characterized by the appearance of wavy spots that resemble scales, which grow over areas of dry rot, starting at the base of the pads at the point of connection and insertion of areoles. The disease can potentially affect the entire *O. ficus-indica* cladode. These symptoms are similar to those observed in the spineless mandacaru (Figures 2 a, b, c and d).

Lopes (2012) suggested that squamous rot can be attributed to *S. lignicola* based on the identification of morphological macro and microstructures. This is an anamorphous form of *Botryosphaeria* spp., which has high genetic variability (Crous *et al.*, 2006) and has been associated with other crops, causing spots in vanilla (*Vanilla planifolia*) leaves, stems, and fruits (Verzignassi *et al.*, 2007) and black rot in cassava (*Manihot esculenta*) roots (Silva *et al.*, 2017).

The rotting of cladodes and roots may be associated with the high incidence of *Scytalidium* sp. widespread squamous rot leads to decreased





**Figura 1.** Síntomas de antracnosis en la porción terminal de los cladodios (a y b) y en frutas (c) de mandacaru (*Cereus jamacaru*); características micro-morfológicas de conidios de *Colletotrichum* sp. (d).  
**Figure 1.** Symptoms of anthracnose in the terminal portion of the cladodes (a and b) and on fruits (c) of mandacaru (*Cereus jamacaru*); micro-morphological features of conidia from *Colletotrichum* sp. (d).

este es el primer reporte para el patosistema estudiado (Figura 2). Según Souza *et al.* (2010) y Lopes (2012), la enfermedad se caracteriza por la apariencia de manchas onduladas que parecen escamas, las cuales crecen sobre áreas de pudrición seca, comenzando por la base de las almohadillas al punto de conexión e inserción de las areolas. La enfermedad puede, potencialmente, afectar el cladodio entero de *O. ficus-indica*. Estos síntomas a los observados en el mandacaru sin espinas (Figuras 2 a, b, c y d).

Lopes (2012) sugirió que la raíz escamosa puede ser atribuida a *S. lignicola*, con base en la identificación de estructuras morfológicas macro y micro. Esta es una forma anamórfica de *Botryosphaeria* spp., que tiene una alta variabilidad genética (Crous *et al.*, 2006) y ha sido asociada con otras cosechas, causando manchas en hojas, tallos y frutos de vainilla (*Vanilla planifolia*) (Verzignassi *et al.*, 2007) y pudrición negra en yuca (*Manihot esculenta*) roots (Silva *et al.*, 2017).

productivity, hindering cultivation. This effect potentially intensifies and worsens under high humidity and moderate temperatures conditions (Lopes, 2012; Souza *et al.*, 2017).

According to Souza *et al.* (2010), among the main phytosanitary problems that affect prickly pear (*O. ficus-indica*) crops in the semiarid region in Paraíba, several diseases were observed, particularly squamous rot caused by the fungus *S. lignicola*.

Symptoms typical of anthracnose and squamous rot in cladodes of mandacaru with and without spines were reproduced in this study. Anthracnose symptoms appeared in the upper part of the cladodes as necrotic lesions accompanied by soft rot in the fruits, in both species of *Cereus*, with and spineless. *S. lignicola* was observed only in spineless mandacaru plants (*C. hildmannianus*) as rotting of cladodes and roots and gallery openings on the cladodes. In both diseases, symptoms started up to 10 days after inoculation of pathogens. To confirm





**Figura 2.** Síntomas de pudrición escamosa en plantas de mandacaru sin espinas (*Cereus hildmannianus*) (a) y galerías (b y c) causados por *Scytalidium lignicola*; y estructuras de conidios de *S. lignicola* (d).  
**Figure 2.** Symptoms of squamous rot in spineless mandacaru plants (*Cereus hildmannianus*) (a) and gallery openings (b and c) caused by *Scytalidium lignicola*; and *S. lignicola* conidia structure (d).

La pudrición de cladodios y raíces podría estar asociada con la alta incidencia de *Scytalidium* sp. La pudrición escamosa extendida conduce a una menor productividad, dificultando la cultivación. Este efecto potencialmente se intensifica y empeora bajo condiciones de humedad elevada y temperaturas moderadas (Lopes, 2012; Souza *et al.*, 2017).

Según Souza *et al.* (2010), entre los principales problemas fitosanitarios que afectan al cultivo del nopal (*O. ficus-indica*) en la región semiárida en Paraíba, se observaron varias enfermedades, en especial la pudrición escamosa causada por el hongo *S. lignicola*.

En este estudio se reprodujeron síntomas típicos de antracnosis y pudrición escamosa en cladodios de mandacaru con y sin espinas. Síntomas de antracnosis aparecieron en la parte superior de los cladodios como lesiones necróticas acompañadas por una pudrición suave en las frutas, en ambas especies de *Cereus*, con y sin espinas. Únicamente se observó *S. lignicola* en plantas mandacaru sin espinas (*C. hildmannianus*) como la pudrición de

the disease etiology, re-isolation was performed from the symptoms, in PDA culture medium and observation of morphological structures under microscopy.

The genera were observed: *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. and *S. lignicola*. The fungi *Colletotrichum* sp. and *S. lignicola* are considered the first reports of episodes of *C. jacamaru* and *C. hildemmannianus* in State of Paraíba, Brazil.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), the Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) of UFPB.

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

cladodios y raíces y galerías en los cladodios. Para ambas enfermedades, los síntomas comenzaron hasta 10 días después de la inoculación de los patógenos. Para confirmar la etiología de la enfermedad, se realizó un re-aislamiento desde los síntomas en un medio de cultivo PDA y se observaron estructuras morfológicas bajo el microscopio.

Los géneros observados fueron *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *S. lignicola*. Los hongos *Colletotrichum* sp. y *S. lignicola* son considerados los primeros reportes de episodios de *C. jacamaru* y *C. hildemannianus* en el estado de Paraíba, Brasil.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) y la Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) de UFPB.

#### LITERATURA CITADA

- Barreto SS, Rezende DV, Blum LEB. 2011. Fungos em sementes de plantas ornamentais. *Revista Brasileira de Sementes*. 33: 561-573.
- Cavalcante A, Teles M, Machado M. 2013. Cactos do Semiárido do Brasil: Guia ilustrado. 1ed. Campina Grande; pp. 1-103.
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55(1):235-253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>.
- Freire FCO. 2009. Patógenos associados ao mandacaru (*Cereus jamacaru* Dc.) no Estado do Ceará. 1 ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fortaleza. Comunicado Técnico 148.
- Lopes EB. 2012. Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no Semiárido Nordeste. 1 ed. Emepa/Faepa, João Pessoa. 130p.
- Santos JIG, Souza DD. 2016. O mandacaru como fonte alimentar para caprinos no período de seca no Semiárido. *Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade*. 9(5): 5-14.
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. 1 ed. CBS Knaw Fungal Biodiversity Centre, Utrecht. 27, 119 p.
- Shetty AA, Rana MK, Preetham SP. 2012. Cactus: a medicinal food. *Journal of food science and technology*. 49(5): 530-536. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0462-5>
- Silva JAT, Medeiros EV, Silva JM, Tenório DA, Moreira KA, Nascimento TCES, Souza MC. 2017. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Scytalidium lignicola* CMM 1098 and antioxidant enzymatic activity in cassava. 45(2):219-225. *Phytoparasitica*. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0578-x>.
- Silva JGM, Lima GFC, Paz LG, Matos MMS, Barreto MFP. 2010. Utilização de cactáceas nativas associadas à silagem de sorgo na alimentação de bovinos no semiárido nortero-grandense. *Revista Eletrônica Científica Centauro*. 1(1): 1-9.
- Souza AEF, Nascimento LC, Araújo E, Lopes EB, Souto MF. 2010. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no Semiárido paraibano. *Biotemas*. 23(3):11-20. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n3p11>.
- Souza AEF, Nascimento LC, Souza BO. 2017. Principal components of the intensity of squamous rot on prickly pear plantations in the semiarid region of the state of Paraíba, Brazil. *Revista Caatinga*. 30(2):370-376. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252017v30n212rc>.
- Verzignassi JR, Poltronieri LS, Benchimol RL, Moura MF. 2007. *Scytalidium lignicola* causando manchas em folhas, hastes e frutos de baunilha. *Fitopatologia Brasileira*. 32(1): 84-97. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000100015>

# Fungicides, biocontrollers and resistance inducers in commercial bell pepper hybrids inoculated with *Phytophthora capsici*

## Fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia en híbridos comerciales de pimiento morrón inoculados con *Phytophthora capsici*

Rafael Godínez-Paoli<sup>1</sup>, Santos Gerardo Leyva-Mir<sup>2</sup>, María del Rosario García-Mateos<sup>1</sup>, Jesús Magdaleno-Villar<sup>1</sup>, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia<sup>1</sup>, Micología Agrícola, Departamento de Parasitología Agrícola<sup>2</sup>, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, Km 38.5, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Oscar Cruz-Alvarez, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Avenida Pascual Orozco, Campus 1, s/n, Chihuahua, Chihuahua, CP 31350, México. María Teresa Martínez-Damián<sup>1\*</sup>. \*Autor para correspondencia: teremd13@gmail.com

Recibido: 04 de Febrero, 2020.

Aceptado: 02 de Abril, 2020.

Godínez-Paoli R, Leyva-Mir SG, García-Mateos MR, Magdaleno-Villar J, Cruz-Álvarez O and Martínez-Damián MT. 2020. Fungicides, biocontrollers and resistance inducers in commercial bell pepper hybrids inoculated with *Phytophthora capsici*. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 258-268.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-1

Primera publicación DOI: 09 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 09, 2020.

**Resumen.** El objetivo de esta investigación fue evaluar el nivel de resistencia de diferentes híbridos comerciales de pimiento morrón (Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Pimiento Olvera, Sympathy, California wonder y PS16364212), a *P. capsici* mediante el uso de fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia. El ensayo se realizó bajo condiciones de invernadero en bolsas de polietileno

**Abstract.** The aim of this research was to evaluate the resistance level of different commercial bell peppers hybrids (Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Pimiento Olvera, Sympathy, California wonder y PS16364212), to *P. capsici* by using fungicides, biocontrollers and inducers of resistance. The essay was carried out under greenhouse conditions in black polyethylene bags with tezontle sand as substrate. The products were applied according to the manufacturer's recommended dose, applied 10 and 20 days after transplantation. Subsequently, the plants were inoculated with a solution of mobile zoospores at a concentration of  $1 \times 10^{-6}$ . Three visual evaluations were carried out to record incidence, severity and AUDSC. It was found that PS16364212 presented better resistance to *P. capsici* attack with 14.9% incidence and 15.7% day<sup>-1</sup> (AUDSC) compared to California wonder (44.2% incidence). The application of Metalaxil-M and Acibenzolar-S-methyl showed the lowest AUDSC (0.8 and

negro con arena de tezontle como sustrato. Los productos se aplicaron de acuerdo con la dosis recomendada por el fabricante, aplicándose a los 10 y 20 días después del trasplante. Posteriormente, las plantas se inocularon con una solución de zoosporas móviles a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$ . Se realizaron tres evaluaciones visuales para el registro de incidencia, severidad y ABCPE. Se encontró que PS16364212 presentó mejor resistencia al ataque de *P. capsici* con 14.9% de incidencia y  $15.7\% \text{ día}^{-1}$  (ABCPE) respecto a California wonder (44.2% de incidencia). La aplicación de Metalaxil-M y Acibenzolar-S-metil mostraron la menor ABCPE (0.8 y  $6.8\% \text{ día}^{-1}$ , respectivamente), por lo que ambos productos pueden ser considerados como una alternativa para su empleo dentro del manejo integrado de la marchitez del chile.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, oomicetes, marchitez, Acibenzolar-S-metil, activador de defensa, resistencia sistémica

*Capsicum annuum* es una de las especies de chile con mayor diversidad morfológica y superficie cultivada a nivel mundial. En México, se cultivan en condiciones de campo abierto e invernadero, en la que se destacan los tipos “jalapeño”, “pimiento morrón” y “poblano”, donde el volumen de producción asciende a 3,296,875 t y las entidades federativas con mayor producción son Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas y San Luis Potosí (SIAP, 2018). El país es el principal exportador de pimiento morrón con 150,303 t, cuyos principales mercados son los Estados Unidos, Canadá y Japón (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019). Sin embargo, la producción de chile, no solo de pimiento morrón, se ven afectadas por la presencia del Oomiceto *Phytophthora capsici* en el suelo (Barchenger *et al.*, 2018).

El patógeno *P. capsici* ocasiona la marchitez o secadera del chile, producto de la pudrición radicular,

$6.8\% \text{ día}^{-1}$ , respectively), so that both products can be considered as an alternative for their use within the integrated management of wilt of the chili.

**Key words:** *Capsicum annuum*, oomycetes, wilting, Acibenzolar-S-methyl, defense activator, systemic resistance

*Capsicum annuum* is one of the pepper species with the highest morphological diversity and surface planted on a global scale. In Mexico, they are planted under open field conditions and in greenhouses, in which the “jalapeño”, “bell pepper” y “poblano” types stand out, since the production volume amounts to 3,296,875 t, and the states with the highest production levels are Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas and San Luis Potosí (SIAP, 2018). Mexico is the main exporter of bell peppers, with 150,303 t, and the main importing countries are the United States, Canada and Japan (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019). However, the production of chili peppers, and not just bell peppers, are affected by the presence of the Oomycete *Phytophthora capsici* in the soil (Barchenger *et al.*, 2018).

The pathogen *P. capsici* causes the wilting or drying of peppers, produced by the rotting of the root, chlorosis and falling of leaves, affecting between 10 and 100% of all plants (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018), which depends on the prevailing weather conditions and the timely application of fungicides that help inhibit the fungal reproductive cycle; notwithstanding, the constant use of chemical products has led to the resistance of the pathogen, as well as environmental deterioration (soil, water and air) and an increase in production costs (Fernández-Herrera *et al.*, 2007).

Among the strategies used to reduce the negative effect of *P. capsici*, is the use of resistant rootstock; however, its use is limited by the type of rootstock, edaphoclimatic conditions and the



clorosis y caída de hojas con niveles de afectación entre 10 y 100% de las plantas (Jiménez-Camargo *et al.*, 2018), lo cual se encuentra en función de las condiciones climáticas prevalecientes y la aplicación oportuna de fungicidas que permitan inhibir el ciclo de reproducción del hongo; no obstante, el empleo constante de productos químicos ha causado la resistencia del patógeno, así como deterioro ambiental (suelo, agua y aire) e incremento de los costos de producción (Fernández-Herrera *et al.*, 2007).

Entre las estrategias empleadas para disminuir el efecto negativo de *P. capsici*, se encuentra el uso de portainjertos resistentes; no obstante, su uso se ve limitado por el tipo de portainjerto, condiciones edafoclimáticas y la especie o variedad empleada como injerto (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015). En este sentido, lo más práctico y útil es el aprovechamiento de los mecanismos de defensa físicos (ceras, cutícula, paredes celulares, tamaño, forma y ubicación de aperturas naturales, entre otras) y químicos pre-existentes (etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y nutrimentos esenciales) (Huallanca y Cadenas, 2014), así como la inducción de mecanismos de defensa que son activadas antes y después de la penetración del patógeno (Qi *et al.*, 2012), proporcionando una mejor respuesta de la planta a un posterior ataque (Castro *et al.*, 2012).

En la actualidad, a nivel comercial existen productos de origen natural y sintético (biocontroladores) e inductores de resistencia (sintéticos) que mediante su aplicación actúan sobre la planta e impiden o retrasan la entrada del patógeno y con ello limitan su actividad en el tejido u órgano infectado, pero sin tener un efecto directo o actividad específica sobre los fitopatógenos (Huallanca y Cadenas, 2014). Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue evaluar el nivel de resistencia de diferentes híbridos comerciales de pimiento morrón a *P. capsici* mediante el uso de fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia.

species or variety used as a graft (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015). In this sense, the most practical and useful thing is the use of the pre-existing physical (waxes, cuticles, cell walls, size, shape and location of natural apertures, among others) and chemical defense mechanisms (ethylene, jasmonic acid, salicylic acid, and essential nutrients) (Huallanca and Cadenas, 2014), as well as the induction of defense mechanisms that are activated before and after the penetration of the pathogen (Qi *et al.*, 2012), providing a better response by the plant to a later attack (Castro *et al.*, 2012).

Nowadays, products from natural or synthetic sources (biocontrollers) and resistance inducers (synthetic) are available in the market, and with their application on the plant, they act on it and stop or delay the entrance of the pathogen, limiting its activity on the infected tissue or organ, without having a direct effect or specific activity on the phytopathogens (Huallanca and Cadenas, 2014). Therefore, the aim of this research was to evaluate the level of resistance of different commercial bell pepper hybrids to *P. capsici* with the use of fungicides, biocontrollers and resistance inductors.

The experiment was set up in a tunnel-like greenhouse, P-5, located in the Experimental Agricultural Field in the Universidad Autónoma Chapingo (UACH), State of Mexico, Mexico (19° 29' 33" N, 98° 52' 21" W), at an altitude and with an annual average temperature of 2,267 masl and 15.9 °C, respectively. The plant material used consisted of commercial bell pepper hybrids: Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Olvera pepper, Sympathy, California Wonder and PS16364212. On the other hand, the commercial name, active ingredient and doses of fungicides, biocontrollers and resistance inductors are described in Table 1.

The plants were sown in expanded polystyrene trays with 128 pits, using peat moss and perlite (1:2) as a substrate. The essay was carried out under greenhouse conditions, using 384, 60-



El experimento se estableció en el invernadero P-5 tipo túnel ubicado en el Campo Agrícola experimental del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Estado de México, México (19° 29' 33" N, 98° 52' 21" O) con una altitud y temperatura media anual de 2,267 m y 15.9 °C, respectivamente. El material vegetal empleado consistió de los híbridos comerciales de pimiento morrón: Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Pimiento Olvera, Sympathy, California Wonder y PS16364212. Por otro lado, el nombre comercial, ingrediente activo y dosis de los fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia se describen en el Cuadro 1.

La siembra se realizó en charolas de poliestireno expandido con 128 cavidades, en la que se empleó peat moss (turba) y perlita (1:2) como sustrato. El ensayo se realizó en condiciones de invernadero, empleándose 384 plántulas con 60 días de edad, las cuales fueron trasplantadas en bolsas de polietileno negro con capacidad de 10 L rellenas con arena de tezontle como sustrato. La nutrición se llevó a cabo mediante un sistema de riego por goteo, cuya solución nutritiva tuvo una composición nutrimental (mg L<sup>-1</sup>): N (250), P (60), Ca (250), K (250), Mg

day old seedlings, which were grafted in black polyethylene bags, with a capacity of 10 L, filled with tezontle sand as a substrate. Nutrition was carried out by a drip irrigation system, the nutrient solution of which had a nutritional composition of (mg L<sup>-1</sup>): N (250), P (60), Ca (250), K (250), Mg (60), S (205), Fe (3), Mn (1), B (0.5), Cu (0.1) and Zn (0.5), where the volume of applied irrigation was of one liter per plant per day, distributed in two irrigations (morning and afternoon) with a duration of 30 minutes.

An experimental design of plots divided with a factorial 6 x 8 factorial treatments was used, and for this we considered 1) six commercial hybrids (Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Pimiento Olvera, Sympathy, California wonder and PS16364212), 2) eight treatments (Acibenzolar methyl (ASM) + inoculation, *Bacillus subtilis* (BS) + inoculation, distilled water (TEST) + inoculation, Metalaxil-M (METM) + inoculation, *Trichoderma* spp. (TRICH) + inoculation, Potassium phosphonate (FP) + inoculation, Fosetyl-Al (FAL) + inoculation and distilled water (TESTAB) without inoculating). The experimental unit was composed of a plant with eight repetitions per treatment. The products

**Cuadro 1. Nombre comercial, ingrediente activo y dosis aplicados de los productos utilizados para el control de *P. capsici* en pimiento morrón.**

**Table 1. Commercial name, active ingredient and applied doses of the products used for the control of *P. capsici* in bell peppers.**

| Nombre comercial                 | Ingrediente activo                                         | Dosis ha <sup>-1</sup>                                                  |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Actigard 50 GS <sup>x</sup>      | S-metilbenzo [1,2,3]tiadiazol-7-carbotioato                | 50 g                                                                    |
| Fitoprón <sup>x</sup>            | Anhídrido fosfórico, óxido de potasio y fosfonato potásico | 2 L                                                                     |
| Serenade ASO <sup>y</sup>        | <i>Bacillus subtilis</i> cepa QAT 713                      | 1.5 kg                                                                  |
| Espectro Trico-Bio <sup>y</sup>  | <i>Trichoderma</i> spp.                                    | 2 L                                                                     |
| Ridomil Gold 480 SL <sup>z</sup> | Metil N-(metotoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-D-alaninato         | 0.5 L (1 <sup>a</sup> aplicación)<br>1.25 L (2 <sup>a</sup> aplicación) |
| Aliette <sup>z</sup>             | Tris-O-etil fosfonato de aluminio.                         | 2.5 kg                                                                  |
| Testigo sin tratamiento          | Agua destilada                                             | 2 L                                                                     |
| Testigo absoluto sin inocular    | Agua destilada                                             | 2 L                                                                     |

<sup>x</sup>Inductor de resistencia, <sup>y</sup>Biocontrolador y <sup>z</sup>Fungicida químico / <sup>x</sup>Resistance inductor, <sup>y</sup>Biocontrollerr and <sup>z</sup>Chemical fungicide.

(60), S (205), Fe (3), Mn (1), B (0.5), Cu (0.1) y Zn (0.5), donde el volumen de riego aplicado fue de un litro por planta por día, distribuidos en dos riegos (mañana y tarde) con media hora de duración.

Se empleó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo de tratamientos factorial 6 x 8, para ello se consideró: 1) seis híbridos comerciales (Caoba rojo, Dicaprio amarillo, Pimiento Olvera, Sympathy, California wonder y PS16364212), 2) ocho tratamientos (Acibenzolar metil (ASM) + inoculación, *Bacillus subtilis* (BS) + inoculación, agua destilada (TEST) + inoculación, Metalaxil-M (METM) + inoculación, *Trichoderma* spp. (TRICH) + inoculación, Fosfonato de potasio (FP) + inoculación, Fosetil-Al (FAL) + inoculación y agua destilada (TESTAB) sin inoculación). La unidad experimental se constituyó de una planta con ocho repeticiones por tratamiento. Los productos fueron aplicados de acuerdo con la dosis indicada por el fabricante (Cuadro 1) y donde se consideró una densidad de 2.5 plantas m<sup>-2</sup>. La aplicación de los tratamientos se realizaron a los 10 y 20 días después del trasplante, respectivamente. Con excepción de Actigard 50 GS y Aliette, el resto de productos fueron aplicados mediante la inyección directa al sustrato (área de la base del tallo). Las plantas fueron inoculadas con 50 mL de una solución de zoosporas móviles a una concentración de 1x10<sup>6</sup>.

En este trabajo se empleó la cepa 6143 de *P. capsici*, misma que fue proporcionada por el área de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, la cual fue re-sembrada en medio de cultivo de jugo V8-agar. Una vez que se desarrolló el patógeno, se procedió a su multiplicación mediante la siembra de cuadros de 0.5x0.5 cm en caja Petri con medio de cultivo de jugo V8-agar, dejándose reposar por 24 h a temperatura ambiente (19 °C), posteriormente se colocaron dentro de una incubadora a 28 °C durante seis días.

were applied according to the dosage indicated by the manufacturer (Table 1), which considered a density of 2.5 plants m<sup>-2</sup>. Treatments were applied 10 and 20 days after transplant, respectively. With exception from Actigard 50 GS and Aliette, the remaining products were applied by injecting directly into the substrate (stem base area). Plants were inoculated with 50 mL of a solution of mobile zoospores at a concentration of 1x10<sup>6</sup>.

In this experiment, we used the 6143 *P. capsici* strain, which was provided by the Plant Health-Pathology area of the Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, which was replanted in a V8 juice-agar medium. Once the pathogen developed, its multiplication was carried out by planting 0.5x0.5 cm squares in Petri dishes with a V8 juice-agar culture medium, and letting it stand for 24h at room temperature (19 °C), followed by incubation at 28 °C for six days.

Out of the total of experimental units, 336 were inoculated with 50 mL of a solution of mobile zoospores, at a concentration of 1x10<sup>6</sup> zoospores mL<sup>-1</sup>. Samples were taken at random from the roots of 10 plants with typical symptoms of chili wilting, which were washed with running water and disinfested with a 0.5% sodium hypochlorite solution for five minutes, to later be placed in the V8 juice-agar culture medium (Singleton *et al.*, 1992).

The samples that developed isolations consisting of cottonlike white mycelia, were morphologically characterized. After corroborating the presence of the oomycete in the analyzed samples, the method was repeated to obtain sporangia. Subsequently, 50 mL of a solution of zoospores were prepared, at a concentration of 1x10<sup>6</sup> zoospores mL<sup>-1</sup>, and directly applied on the roots of 10 Caoba rojo, hybrid plants, 60 days to transplant, in order to satisfy Koch's postulates; two transplanting plants were used as controls.

Visual evaluations were carried out 8, 16 and 24 days after inoculation (dai) in order to detect

Del total de unidades experimentales, 336 fueron inoculadas con 50 mL de una solución de zoosporas móviles a una concentración de  $1 \times 10^6$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ . Se tomaron al azar muestras de raíz de 10 plantas con síntomas típicos de marchitez del chile que fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por cinco minutos y después fueron enjuagadas con agua destilada estéril, para posteriormente ser colocadas en medio de cultivo jugo V8-agar (Singleton *et al.*, 1992).

Las muestras que desarrollaron aislados consistentes con micelio blanco algodonoso, se caracterizaron morfológicamente. Una vez corroborada la presencia del oomiceto en las muestras analizadas se repitió la metodología para la obtención de esporangios. Posteriormente se prepararon 50 mL de solución de zoosporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ , la cual se aplicó directamente a la raíz de 10 plantas del híbrido Caoba Rojo con 60 días al trasplante, con la finalidad de cumplir con los postulados de Koch, dos plantas se emplearon como testigo.

Las evaluaciones visuales se realizaron a los 8, 16 y 24 días después de la inoculación (ddi) con la finalidad de detectar plantas con síntomas de marchitez o secadera. La evaluación de incidencia se realizó mediante la identificación de plantas con síntomas típicos de la enfermedad respecto del número total de plantas y mientras que para el porcentaje de daño que presentó cada planta se propuso una escala visual (Figura 1).

Con los datos obtenidos del nivel de daño, se calculó la severidad de ataque del oomiceto y se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), para lo cual se empleó el método de integración trapezoidal propuesto por Shaner y Finney (1977). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de rango múltiple de

plants with symptoms of wilting or dryness. The evaluation of incidence was carried out by identifying plants with typical symptoms of the disease in comparison with the total number of plants, and for the percentage of damage presented for each plant, a visual scale was proposed (Figure 1).

Using the data obtained on the damage levels, we calculated the severity of the attack of the oomycete, and the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was determined, using the trapezoidal research method proposed by Shaner and Finney (1977). The data underwent an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey-Kramer multiple range test of comparison of averages ( $p \leq 0.05$ ), using the SAS® 9.0 statistical package.

According to Koch's test, all plants inoculated with the *P. capsici* zoospore solution presented a loss in turgency until their complete wilting, whereas the control, which only received distilled water, displayed no symptoms. Initial results displayed an incidence of 19.5% of *P. capsici* on the hybrids, increasing to 38.8 and 48.9%, respectively for the second and third evaluations (Table 2). In this sense, it has been reported that the attack of the oomycete begins with the segregation of proteins within the host, causing physiological alterations (Thines and Kamoun, 2010). During the evaluation, hybrid PS16364212 presented an incidence of 14.9% in comparison with California wonder, with 44.2%, and that has a longer time of use, and therefore has a lower resistance to the attack of the pathogen (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019).

Plants inoculated with the *B. subtilis* treatment displayed a damage severity of 33.5%, regarding Metalaxil-M and Acibenzolar-S-Metil (0% in both cases). At the end of 16 dai, this value increased to 80.4%; by contrast, Metalaxil-M registered 0.4%. In the last evaluation (24 dai), an increase was observed in the severity for plants treated with

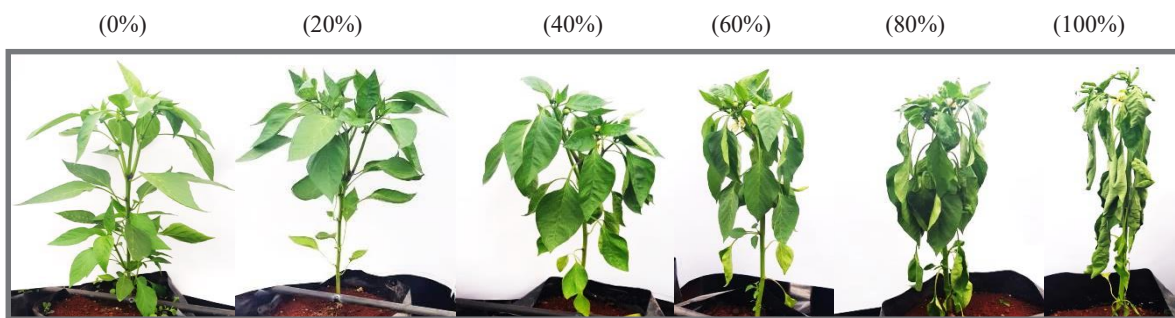


Figura 1. Guía visual para evaluación de incidencia y nivel de daño (%) causado por *P. capsici* en plantas de pimiento morrón.  
Figure 1. Visual guide for incidence evaluation and damage level (%) caused by *P. capsici* in bell pepper plants.

Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ), en la que se empleó el paquete estadístico SAS® versión 9.0.

De acuerdo con la prueba de Koch, todas las plantas inoculadas con la solución de zoosporas de *P. capsici* presentaron pérdida de turgencia hasta una marchitez total, mientras que el testigo al que únicamente se le aplicó agua destilada, no presentó síntomas. Los resultados iniciales registraron 19.5% de incidencia de *P. capsici* sobre los híbridos, incrementándose a 38.8 y 48.9%, respectivamente para la segunda y tercera evaluación (Cuadro 2). En este sentido, se ha reportado que el ataque del oomiceto inicia con la segregación de proteínas al

*B. subtilis* (92.9%), which agrees with reports by Huallanca and Cadena (2014). In addition, a slight increase appeared in the severity after applying Metalaxil-M and Acibenzolar-S-Metil, with values of 0.8 and 7.0%, respectively (Cosme-Velázquez *et al.*, 2015).

The analysis of variance displayed highly significant effects on the hybrid x treatment interaction ( $p < 0.0001$ ) (data not shown). In general terms, the six hybrids displayed a lower AUDPC when they were given Acibenzolar-S-Metil (resistance inducer) and Metalaxil-M (fungicide) with values of 6.8 and 0.8% respectively, in

**Cuadro 2. Incidencia de marchitez en híbridos de pimiento morrón inoculados con *P. capsici*.**

**Table 2. Incidence of wilting in bell pepper hybrids inoculated with *P. capsici*.**

| Híbrido           | Días después de inoculación |        |        |
|-------------------|-----------------------------|--------|--------|
|                   | 8                           | 16     | 24     |
| Caoba rojo        | 2.2 d <sup>z</sup>          | 4.2 bc | 5.3 ab |
| Dicaprio amarillo | 2.5 cd                      | 4.2 bc | 4.8 bc |
| Pimiento Olvera   | 1.6 ab                      | 4.1 ab | 5.2 ab |
| Sympathy          | 1.9 d                       | 4.4 b  | 6.3 a  |
| California wonder | 2.5 cd                      | 5.0 ab | 5.8 ab |
| PS16364212        | 1.1 e                       | 1.4 de | 2.0 d  |

<sup>z</sup>Letras iguales en columnas indican que no existe diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ) / Equal letters in the columns indicate that there are no statistically significant differences according to Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ).

interior del hospedante, lo que ocasiona alteraciones fisiológicas (Thines y Kamoun, 2010). Durante la evaluación se pudo observar que el híbrido PS16364212 presentó 14.9% de incidencia con respecto a California wonder con 44.2% quien al ser un material vegetal que cuenta con largo de tiempo de uso, ve mermada su resistencia al ataque del patógeno (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019).

Con respecto a la severidad de daños, plantas inoculadas con el tratamiento *B. subtilis* mostraron 33.5%, esto respecto a Metalaxil-M y Acibenzolar-S-Metil (0% en ambos casos). A los 16 ddi, este valor se incrementó a 80.4%, en contraste, Metalaxil-M registró 0.4%. En la última evaluación (24 ddi) se observó un incremento en la severidad para las plantas tratadas con *B. subtilis* (92.9%), lo cual concuerda con lo reportado con Huallanca y Cadenas (2014), además también se presentó un ligero incremento en la severidad con la aplicación de Metalaxil-M y Acibenzolar-S-Metil con valores de 0.8 y 7.0%, respectivamente (Cosme-Velázquez *et al.*, 2015).

El análisis de varianza mostró efectos altamente significativos en la interacción híbrido x tratamiento ( $p < 0.0001$ ) (datos no mostrados). En términos generales los seis híbridos presentaron menor ABCPE cuando se aplicó Acibenzolar-S-Metil (inductor de resistencia) y Metalaxil-M (fungicida) con valores de 6.8 y 0.8% respectivamente, esto en relación con el TEST. Entre los tratamientos, el uso de Metalaxil-M mostró ABCPE (Cuadro 3), comportamiento que se asocia con la acción sistémica de este fungicida, es decir, interfiere la incorporación de la uridina durante el proceso de síntesis de ARN (Barchenger *et al.*, 2018). En estudios realizados con Metalaxil-M, se ha demostrado que este es eficiente al reducir el daño ocasionado por el oomiceto *P. capsici* (Fernández-Herrera *et al.*, 2007); sin embargo, es importante buscar otras alternativas de control, pues la eficacia de este fungicida se ha

relation to the TEST. Among the treatments, the use of Metalaxil-M displayed an AUDPC (Table 3), a behavior related to the systemic action of this fungicide, i.e., it interferes with the incorporation of uridine during the RNA synthesis process (Barchenger *et al.*, 2018). Studies performed with Metalaxil-M have shown its efficiency in reducing the damage caused by the oomycete *P. capsici* (Fernández-Herrera *et al.*, 2007); however, it is important to search for other alternatives of control, since the effectiveness of this fungicide has been affected by some cases of resistance to the oomycete (Qi *et al.*, 2012).

The use of Acibenzolar-S-methyl presented no statistical differences with Metalaxil-M and the TESTAB, since it displayed the lowest AUDPC among the treatments (Table 3). In this sense, Malolepsza (2006) reports that Acibenzolar-S-methyl acts in a similar way to salicylic acid, since it is composed of analogous molecules, where the former is highly related to the acquired systemic resistance, given its interaction with the activity of enzymes related to the manifestation of resistance in plants.

In regards to hybrids, the values of the AUDPC fluctuated between 15.7 and 100.8 (% day<sup>-1</sup>), where the most outstanding was PS16364212 (Table 3). This behavior may be linked to the synthesis of secondary metabolites with different chemical natures, including proteins and amino-acids, which help the plant create a level of resistance against the attack of *P. capsici* (Barchenger *et al.*, 2018). In some circumstances, these defense mechanisms are activated by the compounds segregated by the pathogens in the plant when attacked (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015).

The activator of defenses Potassium phosphonate and the fungicide Fosetyl-Al displayed a similar growth in AUDPC (Table 4). In this sense, Huallanca and Cadenas (2014) indicate that



**Cuadro 3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de *P. capsici* en plantas de pimiento morrón sometidas con fungicidas, biocontroladores e inductores de resistencia.**

**Table 3. Area under the disease progress curve (AUDPC) for *P. capsici* in bell pepper plants treated with fungicides, bio-controllers and resistance inductors.**

| Tratamiento                 | ABCPE (% día <sup>-1</sup> ) |                   |                 |          |                   |            |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------|----------|-------------------|------------|
|                             | Caoba rojo                   | Dicaprio amarillo | Pimiento Olvera | Sympathy | California wonder | PS16364212 |
| Acibenzolar-S-Metil         | 22.5 fg <sup>z</sup>         | 18.8 fg           | 0.0 g           | 0.0 g    | 0.0 g             | 0.0 g      |
| <i>B. subtilis</i>          | 195.0 a                      | 182.5 a           | 170.0 ab        | 173.8 ab | 195.0 a           | 45.0 dg    |
| Agua destilada              | 157.5 ab                     | 195.0 a           | 170.0 ab        | 157.5 ac | 170.0 ab          | 32.5 eg    |
| Metalaxil-M                 | 5.0 g                        | 0.0 g             | 0.0 g           | 0.0 g    | 0.0 g             | 0.0 g      |
| <i>Trichoderma</i> spp.     | 118.8 ac                     | 126.3 ad          | 128.8 ad        | 157.5 ac | 167.5 ab          | 28.8 eg    |
| Fosfonato potásico          | 22.5 fg                      | 43.8 dg           | 42.5 dg         | 87.5 bg  | 105.0 af          | 3.8 g      |
| Fosetil-Al                  | 60.0 dg                      | 50.0 dg           | 42.5 dg         | 87.5 bg  | 68.8 cg           | 0.0 g      |
| Agua destilada <sup>y</sup> | 0.0 g                        | 0.0 g             | 0.0 g           | 0.0 g    | 0.0 g             | 0.0 g      |

<sup>z</sup>Sin inoculación. <sup>z</sup>Letras iguales en columnas indican que no existe diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Without inoculation. <sup>e</sup>Equal letters in the columns indicate that there are no statistically significant differences according to Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ).

visto afectada por algunos casos de resistencia del oomiceto (Qi *et al.*, 2012).

La aplicación de Acibenzolar-S-metil no presentó diferencia estadística respecto a Metalaxil-M y al TESTAB, al mostrar los valores de ABCPE más bajos entre los tratamientos (Cuadro 3). En este sentido, Malolepsza (2006) reporta que el modo de acción del Acibenzolar-S-metil es similar al ácido salicílico al ser moléculas análogas, donde el primero se encuentra muy asociado con la resistencia sistémica adquirida, dada su interacción con la actividad de enzimas asociadas con la manifestación de resistencia en las plantas.

Con relación a los híbridos, los valores de ABCPE fluctuaron entre 15.7 y 100.8 (% día<sup>-1</sup>), donde el más sobresaliente fue PS16364212 (Cuadro 3). Comportamiento que podría vincularse con la síntesis de metabolitos secundarios con diferente naturaleza química, entre éstas, proteínas y aminoácidos, las cuales le permiten a la planta generar un nivel de resistencia en contra del ataque de *P. capsici* (Barchenger *et al.*, 2018), en algunas circunstancias, estos mecanismos de defensa son activa-

Potassium phosphonate is a product with a limited efficiency in the control of *P. capsici*. The use of Fosetyl-Al has been reported to reduce the level of severity of the oomycete attack, although it does not surpass the use of Metalaxyl-M (Fernandez-Herrera *et al.*, 2007), which, in this study, displayed an AUDPC of 0.5%. On the other hand, the use of biocontrollers (*Trichoderma* spp. and *B. subtilis*) created the greatest AUDPC, similar to what was observed in the TEST, therefore its effectiveness was minimal to suppress the oomycete, which agrees with reports by Huallanca and Cadena (2014).

With an AUDPC of 4.3%, the use of Acibenzolar-S-Methyl displayed a good control of the disease, although it did not improve on observations for Metalaxyl. In this regard, Cosme-Velázquez *et al.* (2015) point out that Acibenzolar-S-Methyl, is a reducer of systemic resistance, and therefore reduces the AUDPC significantly, but does not eliminate the infection. On the other hand, Baysal (2005) reports that the reduction of the damage caused by *P. capsici* is linked to the induction

das por los compuestos que los patógenos segregan dentro de la planta al ser atacadas (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015).

El activador de las defensas Fosfonato potásico y el fungicida Fosetil-Al mostraron un ABCPE de crecimiento similar (Cuadro 4). En este sentido, Huallanca y Cadenas (2014) indican que el Fosfonato potásico es un producto que muestra una efectividad limitada en el control de *P. capsici*. Se ha reportado que la aplicación de Fosetil-Al disminuye el nivel de severidad del ataque del oomiceto, sin embargo, no supera al uso de Metalaxil-M (Fernandez-Herrera *et al.*, 2007), que en este estudio presentó un ABCPE de 0.5%. Por otro lado, el uso de biocontroladores (*Trichoderma* spp. y *B. subtilis*), desarrollaron la mayor ABCPE similar a lo observado con el TEST, por lo que su efectividad fue mínima para suprimir al oomiceto, lo que coincide con lo reportado por Huallanca y Cadena (2014).

Con 4.3% de ABCPE, la aplicación Acibenzolar-S-Metil mostró buen control de la enfermedad, no obstante, no superó lo observado con Metalaxil. Al respecto, Cosme-Velázquez *et al.* (2015) señalan

of the product with the creation and synthesis of enzymes, phenolic compounds and PR proteins, reported as responsible for the effectiveness of defense mechanisms in plants against the attack of pathogens.

In this research and the specific conditions of evaluation, the bell pepper hybrid PS16364212 displayed the best results for resistance to the attack of *P. capsici*. The use of Metalaxyl-M and Acibenzolar-S-methyl displayed an efficient control, as opposed to Potassium phosphonate, Fosetyl-Al and the biocontrollers (*B. subtilis* and *Trichoderma* spp.).

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

que el Acibenzolar-S-Metil al ser un inductor de la resistencia sistémica, reduce de manera significativa el ABCPE, pero, no elimina la infección. Por su parte, Baysal (2005) reporta que la disminución

**Cuadro 4. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de *P. capsici* en híbridos de pimiento morrón.**  
**Table 4. Area under the disease progress curve (AUDPC) for *P. capsici* in hybrid bell pepper plants.**

| Tratamiento                            | ABCPE (% día <sup>-1</sup> ) |
|--|------------------------------|
| Acibenzolar-S-Metil + inoculación      | 6.9 d <sup>z</sup>           |
| <i>Bacillus subtilis</i> + inoculación | 160.2 a                      |
| Testigo (agua destilada + inoculación) | 146.9 ab                     |
| Metalaxil-M + inoculación              | 0.8 d                        |
| <i>Trichoderma</i> spp. + inoculación  | 121.3 b                      |
| Fosfonato potásico + inoculación       | 52.2 c                       |
| Fosetil-Al + inoculación               | 51.5 c                       |
| Agua destilada (TESTAB)                | 0.0 d                        |

<sup>z</sup>Letras iguales en columnas indican que no existe diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ) / Equal letters in the columns indicate that there are no statistically significant differences according to Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ).

del daño provocado por *P. capsici* se vincula a la inducción del producto con la generación y síntesis de enzimas, compuestos fenólicos y proteínas PR, reportadas como responsables con la efectividad de los mecanismos de defensa en las plantas en contra del ataque de patógenos.

En esta investigación y las condiciones específicas de evaluación, el híbrido de pimiento morrón PS16364212 mostró los mejores resultados de resistencia al ataque de *P. capsici*. El uso de Metalaxil-M y Acibenzolar-S-metil mostraron un control eficiente, en contraste con el Fosfonato potásico, Fosetil-Al y los biocontroladores (*B. subtilis* y *Trichoderma* spp.).

## LITERATURA CITADA

- Barchenger DW, Lamour, KH, and Bosland, PW. 2018. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science* 9: 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00628>
- Baysal O, Turgut C, and Mao G. 2005. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biología Plantarum* 49 (4): 599-604. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0055-0>
- Castro RA, Fernández PSP y Osuna ÁP. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 49-65. [http://rmf.smf.org.mx/Contenido\\_Vol\\_30\\_1\\_2012.html](http://rmf.smf.org.mx/Contenido_Vol_30_1_2012.html)
- Cosme-Velázquez Y, Guzmán-Plazola RA, Sandoval-Islas S, Corona-Torres T y Mendoza-Pérez D. 2015. Efecto del acibenzolar-S-metil en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum*) infectadas con *Phytophthora capsici* en diferentes edades. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(2): 156-172. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3322015/AC/AC3.pdf>
- Fernández-Herrera E, Acosta-Ramos M y Pinto, VM. 2007. Efecto de aplicaciones de fungicidas sobre la incidencia de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo.) del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(2): 186-189. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n2/v25n2a14.pdf>
- Huallanca VCA y Cadenas GCA. 2014. Control de *Phytophthora capsici* Leonian en *Capsicum annuum* cv. Papriking con fungicidas, fertilizantes y biocontroladores. *Anales Científicos* 75 (1): 130-137. <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v75i1.94>
- Jiménez-Camargo A, Valadez-Moctezuma E y Lozoya-Saldaña H. 2018. Antagonismo de *Penicillium* sp. contra *Phytophthora capsici* Leonian. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(2). <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-2/5a.pdf>
- Malolepsza U. 2006. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and O-hydroxyethylrutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Protection* 25: 956-962. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.12.009>
- Qi R, Wang T, Zhao W, Li P, Ding J, and Gao Z. 2012. Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to metalaxyl. *Journal of Phytopathology* 160(11-12): 717-722. <https://doi.org/10.1111/jph.12009>
- Sánchez-Chávez E, Torres-González A, Flores-Córdova MA, Preciado-Rangel P y Márquez-Quiroz C. 2015. Uso de portainjerto sobre el rendimiento, calidad del fruto y resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento morrón. *Nova Scientia* 7(15) 227-244. <https://doi.org/10.21640/ns.v7i15.302>
- Sánchez-Gurrola C, Gómez-Dorantes N, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP y Ávila-Quezada G. 2019. Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(No. Esp. 1): 65-71. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-4>
- SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y pecuaria (SIAP). Ciudad de México. 215 p. [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)
- Shaner G and Finney RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056. <https://doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>
- Singleton LL, Mihail JD and Rush CM. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. ALS press. Minesota, USA. 265 p.
- Thines M and Kamoun S. 2010. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.001>

# Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*)

## Aislamiento e identificación de patógenos causantes de la pudrición del tallo de la higuera (*Ficus carica*)

Sheyla Natali Jahén-Rivera, Olga Gómez-Rodríguez, David Espinosa-Victoria\* Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, CP 56230. \*Autor para correspondencia: despinos@colpos.mx

Recibido: 24 de Enero, 2020.

Aceptado: 09 de Abril, 2020.

Jahén-Rivera SN, Gómez-Rodríguez O and Espinosa-Victoria D. 2020. Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*). Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 269-279.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-6

Primera publicación DOI: 15 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 15, 2020.

**Resumen.** En México, el sistema de producción intensivo de higo (*Ficus carica*) var. “Nezahualcoyotl” requiere de densidades de 12,500 plantas ha<sup>-1</sup> para rendimientos superiores a 100 t ha<sup>-1</sup>. La propagación asexual de esta variedad mediante estacas no está exenta de enfermedades. El objetivo de esta investigación fue identificar los agentes causales de la pudrición de estacas de la variedad “Nezahualcoyotl” y generar la correspondiente escala de severidad. La patogenicidad de los aislamientos se corroboró a través de los postulados de Koch. La secuenciación de las regiones ITS1-ITS4 indicó que los aislamientos estuvieron altamente emparentados con *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*

**Abstract.** In Mexico, the intensive production system of fig (*Ficus carica*) var. “Nezahualcoyotl” requires densities of 12,500 plants ha<sup>-1</sup> for yields greater than 100 t ha<sup>-1</sup>. The asexual propagation of the fig through cuttings in the nursery is not exempt from diseases. The objective of this investigation was to identify the causal agents of the rot of cuttings of the variety “Nezahualcoyotl” and to generate the corresponding severity scale. The pathogenicity of the isolates was corroborated through Koch’s postulates. The sequencing of the ITS1-ITS4 regions indicated that the isolates were highly related to *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Pythium ultimum*. A severity scale with five levels of damage induced by *F. solani* and *A. alternata* and three by *P. ultimum* is reported for the first time. Inoculation separately with *F. solani* and *A. alternata* promoted 100% cortex damage between 21-25 days after inoculation (DAI). The coinoculation of the three pathogens induced earlier (between 11-13 DAI) necrosis of the epidermis (85%) and the cortex (80%). The severity scale will be a valuable help in the quantification and monitoring of the rot of the fig tree stem.

y *Pythium ultimum*. Se reporta por primera vez una escala de severidad con cinco niveles de daño inducidos por *F. solani* y *A. alternata* y tres por *P. ultimum*. La inoculación por separado con *F. solani* y *A. alternata* promovió el 100% de daño de la corteza entre los 21-25 días después de la inoculación (DDI). La coinoculación de los tres patógenos indujo más tempranamente (entre los 11-13 DDI) la necrosis de la epidermis (85%) y de la corteza (80%). La escala de severidad será un valioso auxilio en la cuantificación y seguimiento de la pudrición del tallo de la higuera.

**Palabras clave:** Propagación, higo, necrosis, severidad, Oomicetos, Ascomicetos.

La higuera (*Ficus carica*) llegó a México durante la conquista en el siglo XVI (Flaishman *et al.*, 2008) y fueron las higueras comunes las que se adaptaron mejor, ya que no requerían de polinización para el desarrollo de siconos. Sin embargo, a través del tiempo las variedades originales experimentaron variaciones fenotípicas como el tamaño, color y consistencia. Una de estas nuevas variedades fue descrita y nombrada cultivar “Nezahualcōyotl” por García *et al.* (2013). Este material vegetativo es utilizado para la producción intensiva bajo cubierta, debido a su rápido crecimiento, fácil manejo y alta productividad que permite tener densidades de 12 500 plantas ha<sup>-1</sup> con rendimientos superiores a 100 t ha<sup>-1</sup> (Mendoza *et al.*, 2017). La implementación de este sistema de producción requiere veinte veces más plantas que los sistemas convencionales, y que éstas se encuentren libres de plagas y enfermedades. La principal forma de propagar la higuera es mediante estacas de tallos leñosos podados después de la cosecha (Boliani *et al.*, 2019). Las plantas producidas en vivero pueden presentar pudrición del tallo y raíces asociada

**Key words:** Propagation, fig, necrosis, severity, Oomycetes, Ascomycetes.

Fig trees (*Ficus carica*) arrived in Mexico during the Spanish conquest in the 16th Century (Flaishman *et al.*, 2008), and it was the common fig trees that adapted best, since they required no pollination for the development of syconia. However, with time, the original varieties underwent phenotypical variations, such as size, color and consistency. One of these new varieties was described and named the “Nezahualcōyotl” cultivar by García *et al.* (2013). This vegetative material is used for the intensive production, under cover, due to its quick growth, simple handling and high productivity, which helps obtain densities of 12,500 plants ha<sup>-1</sup> with yields of over 100 t ha<sup>-1</sup> (Mendoza *et al.*, 2017). The implementation of this production system requires twenty times as many plants than conventional systems, and for them to be free of pests and diseases. The main way to disseminate fig trees is using a cuttling of a ligneous stem trimmed after harvest (Boliani *et al.*, 2019). The plants produced in the greenhouse may display rotting of the stem and roots, related to the pathogens of the damping off complex (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* and *Phytophthora*), which is favored by a relative humidity of 80%, a temperature of 25 °C and high densities (García *et al.*, 2008).

In order to carry out a disease control plan, the priority is to identify the causal agents, as well as to create guides that help understand the symptoms and the progress of the disease. The severity scales are useful to standardize and quantify the disease, which will help implement management plans (Hernández and Sandoval, 2015). The aim of this investigation was to isolate and identify the causal agents of stem rot in fig trees, as well as to create scales for the evaluation of the severity of the causal



a patógenos del complejo damping off (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora*), que es favorecida por la humedad relativa de 80%, temperatura de 25 °C y altas densidades (García *et al.*, 2008).

Para realizar un plan de control de la enfermedad, es primordial llevar a cabo la identificación de los agentes causales, así como elaborar guías que permitan conocer los síntomas y el avance de la enfermedad. Las escalas de severidad son útiles para estandarizar y cuantificar la enfermedad, lo que permitirá implementar planes de manejo (Hernández y Sandoval, 2015). El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes causales de la pudrición del tallo de plantas de higuera, así como elaborar escalas para la evaluación de severidad de los agentes causales que sirvan como guías en futuros estudios epidemiológicos.

Para el aislamiento de los agentes causales, se emplearon 50 individuos distribuidos completamente al azar, de un lote de plantas propagadas por estacas de 20 días de edad, que mostraron lento crecimiento, clorosis, marchitamiento, caída de hojas y pudrición de tallo y raíces. Las plantas se tomaron del invernadero de propagación del Campo Experimental de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo a 19° 29' 30.8" Latitud Norte, 98° 52' 22.0" Longitud Oeste y una altitud de 2266 m. Las plantas fueron lavadas con agua corriente y jabón. Posteriormente, se retiró la epidermis con un bisturí para dejar expuesta la corteza donde se notaban lesiones de color marrón-rojizo en los extremos de la estaca (Figura 1). Con ayuda de un bisturí se cortaron cuatro secciones de cada estaca en los bordes de las lesiones, de 0.3 x 0.3 cm de lado y 0.1 cm de grosor (Leslie y Summerell, 2006), 200 secciones en total. Se tomaron cuatro secciones por cada tallo, que fueron sumergidas en agitación constante en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5% durante un minuto. Posteriormente, se

agents to serve as guides in future epidemiological studies.

For the isolation of the causal agents, 50 individuals, distributed totally at random were chosen out of a plot of trees grown out of 20-day-old cuttings, which displayed slow growth, chlorosis, wilting, fallen leaves and rot in stems and roots. The plants were taken from the propagation greenhouse in the Fitotecnia Experimental Field of the Universidad Autónoma Chapingo at 19° 29' 30.8" latitude North, 98° 52' 22.0" longitude West, and an altitude of 2,266 m. The plants were washed with running water and soap. Later, the epidermis was removed using a scalpel to expose the cortex, which showed reddish-brown lesions on the ends of the cutting (Figure 1). Using a scalpel, we cut four sections on each cutting on the edge of the lesions, 0.3 x 0.3 cm each side, and 0.1 cm thick (Leslie and Summerell, 2006), for a total of 200 sections. Four sections were taken for each stem, which were submerged while constantly shaking in a sodium hypochlorite solution (NaClO) at 0.5% for one minute. They were then rinsed three times in sterile distilled water and dried on sterile paper



**Figura 1.** Lesiones color marrón-rojizo en la corteza (flechas) de una estaca de *F. carica* inoculadas con *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*.

**Figure 1.** Reddish-brown lesions on the cortex (arrows) of a cutting of *F. carica* inoculated with *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum*.

enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron sobre toallas de papel estériles dentro de una campana de flujo laminar. Bajo condiciones de asepsia, se colocaron las secciones de tejido de cada tallo en placas de medio Papa Dextrosa Agar, PDA (BD Bioxon®) y fueron incubadas a 28 °C durante cinco días. Se aislaron dos tipos de hongos y un oomiceto, que se purificaron mediante la técnica de punta de hifa y monoesporángios e identificaron morfológicamente mediante microcultivos de cada aislamiento en bloques de medio PDA, sembrado por punción e incubados a temperatura ambiente. Las muestras se tiñeron con azul de metileno y fueron observadas bajo microscopio óptico a 40X, e identificadas morfológicamente con las claves de Barnett y Hunter (1998).

Se reprodujeron los postulados de Koch empleando los aislamientos microbianos asociados a la pudrición del tallo. Se usaron estacas de higuera frescas de 8 cm de largo, con al menos una yema axilar, que fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas en una solución de NaOCl al 1% durante dos minutos. En seguida, las estacas fueron enjuagadas con agua destilada estéril y posteriormente expuestas a alcohol etílico al 96% durante un minuto y enjuagadas nuevamente. Las estacas fueron secadas sobre toallas de papel estériles dentro de una campana de flujo laminar. Después, las estacas fueron colocadas en cámaras húmedas, inoculadas por triplicado con los microorganismos aislados, e incubadas a 28 °C. Al cabo de diez días se tomaron muestras de tejido para re-aislar al microorganismo inoculado y registrar la sintomatología de cada una de las estacas infectadas. La cámara húmeda consistió de un vaso de plástico de 240 mL transparente con tapa, dentro del cual se colocó una estaca de higo sostenida por una base de unicel. El inóculo consistió de tres discos de 0.5 cm de diámetro de siete días de crecimiento, para inoculaciones individuales, 1.5 discos de cada medio en inoculaciones

towels inside a laminar flow hood. Under aseptic conditions, the sections of tissue from each stem were placed in Potato-Dextrose-Agar, or PDA, medium plates (BD Bioxon®), and they were incubated at 28 °C for five days. Two types of fungi were isolated, along with one oomycete, all of which were purified using the hyphal tip method and monosporangia, and were morphologically identified by microcultivations of each isolation in PDA medium blocks, re-sown by puncture and incubated at room temperature. The samples were dyed using methylene blue, observed under an optical microscope at a magnification of 40X, and identified morphologically with the keys by Barnett and Hunter (1998).

Koch's postulates were reproduced using the microbial isolations related to stem rot. Fresh fig tree cuttings, 8 cm in length, were used, which were washed with running water and disinfested in a 1% NaOCl solution for two minutes. Next, the cuttings were rinsed with sterile distilled water, and exposed to ethyl alcohol at 96% for one minute and rinsed again. The cuttings were dried on sterile paper towels inside a laminar flow hood. The cuttings were then placed in wet chambers, inoculated in triplicate with the isolated microorganisms, and incubated at 28 °C. After ten days, tissue samples were taken to re-isolate the inoculated microorganism and record the symptomatology of each one of the infected cuttings. The wet chamber consisted of a transparent 240 mL cup with a lid, inside of which a fig cutting was placed, held up with a styrofoam base. The inoculant consisted of three discs, 0.5 cm in diameter, with 7 days of growth, for individual inoculations, 1.5 discs of each medium in double inoculations, and one disc of each medium for triple inoculations. The discs were placed on a 5 x 5 cm sterile, damp paper towel and 7 x 7 piece of aluminum foil, attached to the base of the cutting with Parafilm "M"®.

dobles y un disco de cada medio en inoculaciones triples. Los discos fueron colocados sobre una toalla de papel húmeda de 5 x 5 cm y papel aluminio de 7 x 7 cm estériles, sujetos a la base de la estaca con Parafilm "M"®. El fondo del vaso se cubrió con una toalla de papel húmeda de 10 x 10 cm y la tapa fue sellada con Parafilm "M"®.

Para la identificación molecular, los aislamientos se incubaron a 27 °C durante siete días para después extraer el ADN. Mediante PCR, se amplificaron las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 de hongos y oomicetos, utilizando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Para los hongos se empleó un ciclo inicial de 94 °C durante cinco minutos, seguidos de 35 ciclos (94 °C, 30 segundos; 56 °C, 45 segundos y 72 °C, dos minutos) y una elongación final a 72 °C durante cinco minutos. Para los oomicetos, se empleó un ciclo inicial de 95 °C durante cuatro minutos, 34 ciclos (95 °C, un minuto; 55 °C, un minuto y 72 °C, dos minutos) y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos (White *et al.*, 1990). Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Las secuencias se ensamblaron y editaron con el programa BioEdit y fueron comparadas contra las secuencias contenidas en la base de datos del GeneBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLAST para determinar las posibles especies de cada aislamiento.

Por otro lado, Se colocaron estacas frescas de aproximadamente ocho centímetros de largo en cámaras húmedas de forma individual, igual que en las pruebas de patogenicidad. Las estacas fueron inoculadas individualmente con los patógenos aislados, así como con todas las combinaciones, estableciéndose quince repeticiones por tratamiento, lo cual resultó en un total de 120 unidades experimentales. Se incubaron a 28 °C y se seleccionaron al

The bottom of the cup was covered with a 10 x 10 cm damp paper towel and the lid was sealed with Parafilm "M"®.

For the molecular identification, the isolations were incubated at 27 °C for seven days, to then extract the DNA. By means of PCR, we amplified the internal transcribed regions ITS1 and ITS4 of fungi and oomycetes, using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). For the fungi, we used an initial cycle of 94 °C for five minutes, followed by 35 cycles (94 °C, 30 seconds; 56 °C, 45 seconds and 72 °C, two minutes) and a final extension at 72 °C for five minutes. For the oomycetes, we used an initial 95 °C cycle lasting four minutes, 34 cycles (95 °C, one minute; 55 °C, one minute and 72 °C, two minutes) and a final extension step at 72 °C for 10 minutes (White *et al.*, 1990). The amplified products were separated by electrophoresis in agarose gels at 0.8%. The sequences were assembled and edited using the program BioEdit, and they were compared with the sequences contained in the GeneBank database of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) using BLAST to determine the possible species of each isolation.

On the other hand, fresh cuttlings, approximately eight centimeters long, were placed in wet chambers individually, as in the pathogenicity tests. The cuttlings were inoculated individually with the isolated pathogens, as well as with all the combinations, establishing fifteen repetitions per treatment, which resulted in a total of 120 experimental units. They were incubated at 28 °C and three cuttlings or repetitions of each treatment were chosen at random with time, in order to determine the levels of severity (scale of severity).

Finally, the percentage of rotting was evaluated. This was measured by measuring the area of the rot in the cuttling, both in the cortex and the

azar tres estacas o repeticiones de cada tratamiento a través del tiempo, para determinar los niveles de severidad (escala de severidad).

Finalmente, se evaluó el porcentaje de pudrición, el cual se calculó midiendo el área de pudrición de la estaca tanto de la corteza como de la epidermis, así como el área total de la corteza y de la epidermis, obteniendo su relación con la siguiente fórmula:  $(A2 \times 100)/A1$ , donde A2 es el área total de la epidermis o de la corteza de la estaca y A1 es el área de la epidermis o de la corteza con pudrición. Las mediciones se hicieron por triplicado, se determinó el promedio y se propuso un rango de porcentaje de daño para cada nivel de severidad con cada tratamiento. Las mediciones se hicieron con ayuda del software de procesamiento de imágenes IMAGE J versión 1.50i desarrollado por el National Institute of Health (Rasband, 2018).

Los aislamientos resultaron altamente emparentados con *F. solani* (99% de similitud) con 95% de frecuencia en estacas enfermas, *A. alternata* (99% de similitud) con 72% de frecuencia y *P. ultimum* (100% de similitud) con 80% de frecuencia. Los postulados de Koch confirmaron que *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* fueron los agentes causales en la pudrición de las estacas de la higuera, ya que se observaron síntomas similares a los encontrados en el campo. El re-aislamiento de los dos hongos y el oomiceto correspondieron a los que se inocularon inicialmente en un 95%.

El Cuadro 1, corresponde a la escala de severidad donde se muestra el porcentaje de daño ocasionado por *F. solani*, *A. alternata*, y *P. ultimum* individualmente, así como el daño inducido por sus combinaciones a través del tiempo en la corteza y epidermis de la estaca. En general, se establecieron cinco niveles de daño visualmente diferentes entre sí. Sin embargo, para *P. ultimum* se establecieron solamente tres, debido a que solo se detectó avance de la enfermedad hasta los 32 días después de la















epidermis, as well as the total area of the cortex and the epidermis, obtaining the proportion with the following formula:  $(A2 \times 100)/A1$ , where A2 is the total area of the epidermis or of the cortex of the cuttling, and A1 is the area of the epidermis or of the cortex with rot. The measurements were carried out in triplicate, the average was calculated and damage percentage range was proposed for each level of severity with each treatment. The measurements were taken using the image processing software IMAGE J, version 1.50i, developed by the National Institute of Health (Rasband, 2018).

The isolations turned out to be highly related to *F. solani* (99% similarity) with a 95% frequency in diseased cuttings, *A. alternata* (99% similarity) with a 72% frequency, and *P. ultimum* (100% similarity) with an 80% frequency. Koch's postulates confirmed that *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* were the causal agents in the rotting of the fig cuttings, since similar symptoms were observed to those found on the field. The re-isolation of the two fungi and oomycetes matched those inoculated initially at 95%.

Table 1 shows the scale of severity, including the percentage of damage caused by *F. solani*, *A. alternata*, and *P. ultimum* individually, as well as the damage induced by its combinations with time in the cortex and epidermis of the cuttling. In general, five visually different levels of damage were established. However, for *P. ultimum*, only three were established, since the progress of the disease was only detected 32 days after inoculation (DAI). To date, there are no reports of the presence of these three pathogens in fig cuttings, although they are present in other crops with similar symptoms under greenhouse conditions.

*Fusarium solani* attacks adult mango plantations, displaying symptoms of wilting in the stem apex and necrosis in vascular tissues (Khanzada *et al.*, 2004). Likewise, in apple trees, it causes smut

**Cuadro 1. Escala de severidad en el que se observa el porcentaje de daño en estacas de *Ficus carica* inducido por *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Pythium ultimum* inoculados individualmente y en combinación.****Table 1. Scale of severity showing the percentage of damage on *Ficus carica* cuttings induced by *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Pythium ultimum* inoculated individually and in combination.**

| Patosistema  | Nivel | % de daño |         | DDI <sup>2</sup> | Epidermis   | Corteza   |
|--|-------|-----------|---------|------------------|---|---|
|  |       | Epidermis | Corteza |                  |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>F. solani</i>  | 1     | 0         | 0-2     | 0-4              |    |    |
|  | 2     | 0-4       | 3-12    | 5-9              |   |   |
|  | 3     | 5-23      | 13-20   | 10-12            |   |   |
|  | 4     | 24-56     | 21-50   | 13-20            |   |   |
|  | 5     | 57-70     | 51-100  | 21-25            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>A. alternata</i>   | 1     | 0         | 0-1     | 0-4              |    |    |
|  | 2     | 0         | 2-12    | 5-9              |   |   |
|  | 3     | 0         | 13-35   | 10-14            |   |   |
|  | 4     | 0         | 36-50   | 15-21            |   |   |
|  | 5     | 0-8       | 51-100  | 22-25            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>P. ultimum</i>   | 1     | 0         | 0-1     | 0-4              |   |   |
|  | 2     | 0         | 2-20    | 5-18             |   |   |
|  | 3     | 0         | 21-30   | 19-32            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x<br><i>A. alternata</i>                     | 1     | 0         | 0-4     | 0-4              |  |  |
|  | 2     | 0         | 5-37    | 5-8              |   |   |
|  | 3     | 0         | 38-50   | 9-12             |   |   |
|  | 4     | 0-4       | 51-73   | 13-16            |   |   |
|  | 5     | 5-40      | 74-80   | 17-20            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x<br><i>P. ultimum</i>                       | 1     | 0         | 0-5     | 0-4              |  |  |
|  | 2     | 0-18      | 6-18    | 5-12             |   |   |
|  | 3     | 19-35     | 19-40   | 13-14            |   |   |
|  | 4     | 36-45     | 41-55   | 15-16            |   |   |
|  | 5     | 46-63     | 56-100  | 17-20            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>A. alternata</i> x<br><i>P. ultimum</i>                    | 1     | 0         | 0-7     | 0-4              |  |  |
|  | 2     | 0-20      | 8-12    | 5-8              |   |   |
|  | 3     | 21-38     | 13-54   | 9-12             |   |   |
|  | 4     | 39-42     | 55-80   | 13-20            |   |   |
|  | 5     | 43-63     | 81-100  | 21-25            |   |   |
| <i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x<br><i>A. alternata</i> x <i>P. ultimum</i> | 1     | 0-8       | 0-4     | 0-3              |  |  |
|  | 2     | 9-40      | 5-10    | 4-6              |   |   |
|  | 3     | 41-55     | 11-38   | 7-8              |   |   |
|  | 4     | 56-60     | 39-60   | 9-10             |   |   |
|  | 5     | 61-85     | 61-80   | 11-13            |   |   |

<sup>2</sup>Días después de la inoculación / Days after inoculation.



inoculación (DDI). A la fecha, no hay reportes de la presencia de estos tres patógenos en estacas de higuera, aunque éstos se encuentran presentes en otros cultivos con sintomatología similar bajo condiciones de invernadero.

*Fusarium solani* ataca plantaciones adultas de mango, mostrando síntomas de marchitez de puntas de tallos y necrosis en tejidos vasculares (Khanzada *et al.*, 2004). Igualmente, en manzanos causa tizón y caída de hojas (Wang *et al.*, 2010). Este hongo, produce enzimas como cutinasas, celulasas, quitosanasas, pectinasas y otras que degradan fitoalexinas (Leslie y Summerell, 2006). Debido a este mecanismo, *F. solani* puede afectar fácilmente los tejidos blandos y lignificados, como los tallos de higuera, que manifestaron los primeros síntomas de pudrición a los cinco días después de la inoculación (DDI). Los síntomas de las especies patogénicas del género *Fusarium*, son marchitamiento vascular y pudrición de tallos y raíces (Torres, 2000). En el presente trabajo, los más altos porcentajes de pudrición de epidermis y corteza, la presencia de micelio en el exterior de la estaca, así como el desprendimiento de la epidermis ocurrieron en el nivel 5 de la escala de severidad, mostrando de 57-70 y 51-100 % de daño en epidermis y corteza, respectivamente, entre los 21 y 25 DDI.

Por otra parte, la especie más importante del género *Alternaria* es *A. alternata* que puede manifestarse como patógeno, oportunista o saprofito (Logrieco *et al.*, 2009). En plantas adultas de higuera se han reportado daños causados por especies de *Alternaria*, sin embargo, siempre se asocian a daños en hojas y siconos, así como en frutos de manzano, cítricos, olivos y tomates (López *et al.*, 2016). Todas las especies patogénicas de *Alternaria* producen fitotoxinas específicas y no específicas para sus hospederos, entre las toxinas no específicas se encuentra el zinniol que induce necrosis (Lou *et al.*, 2013). El más alto porcentaje de necrosis de la corteza en las estacas de higuera, promovida por

and defoliation (Wang *et al.*, 2010). This fungus produces enzymes such as cutinases, cellulases, chitinases, pectinases and others that degrade phytoalexins (Leslie and Summerell, 2006). Due to this mechanism, *F. solani* can easily affect soft and lignified tissues, such as the fig tree stems, which displayed their first symptoms of rotting five days after inoculation (DAI). The symptoms of the pathogenic species of the genus *Fusarium* are vascular wilting and the rotting of stems and roots (Torres, 2000). In this investigation, the highest percentages of rotting of the epidermis and cortex, the presence of mycelia on the surface of the cuttling, and the detachment of the epidermis took place in stage 5 of the scale of severity, showing 57-70 and 51-100% of damage on the epidermis and cortex, respectively, between 21 and 25 DAI.

On the other hand, the most important species of the genus *Alternaria* is *A. alternata*, which can appear as a pathogen, an opportunist or a saprophyte (Logrieco *et al.*, 2009). In adult fig trees, damages caused by species of *Alternaria* have been reported, although they are always related to damages in leaves and syconia, as well as in apple, citrus, olive and tomato fruits (López *et al.*, 2016). All the pathogenic species of *Alternaria* produce phytotoxins that are specific and non-specific to their hosts; among the non-specific toxins is the zinniol, which induces necrosis (Lou *et al.*, 2013). The highest percentage of necrosis on the cortex of fig tree cuttings, promoted by *A. alternata* was displayed on level 5 of the severity scale, with 51-100% of damage, between 22 and 25 DAI. However, the epidermis only displayed 8% rotting on level 5. The presence of gray mycelia was also observed on the outside of the cuttling. The separate inoculation with *F. solani* and *A. alternata* induced 100% of damage on the cortex between 22 and 25 DDI.

The oomycete *P. ultimum* is a member of the damping off complex, which causes the death

*A. alternata* se presentó en el nivel 5 de la escala de severidad, con 51-100% de daño, entre los 22-25 DDI. Sin embargo, la epidermis presentó solo 8% pudrición hasta el nivel 5. Se observó también presencia de micelio de color gris oscuro en el exterior de la estaca. La inoculación por separado con *F. solani* y *A. alternata* indujo 100% de daño de la corteza entre 22-25 DDI.

Para el caso del oomiceto *P. ultimum* es miembro del complejo damping off, causante de la muerte de plántulas de muchas especies de importancia agrícola. Este oomiceto es de las especies más agresivas dentro de su género (Mavrodi *et al.*, 2012). *Pythium ultimum* se asocia a la pudrición de raíces de plantas adultas, portainjertos y plántulas de manzano (Mazzola *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016). En este trabajo, *P. ultimum* promovió de 21-30% del daño de la corteza entre los 19-32 DDI. También se observó presencia de micelio en la parte superior de la estaca, que al ser tocado se desprendió con facilidad. La epidermis no presentó pudrición ni desprendimiento.

Los porcentajes más altos de daño se presentaron en un rango de menor tiempo (de 17-20 DDI) cuando se hicieron inoculaciones mixtas de *F. solani* + *A. alternata* y *F. solani* + *P. ultimum*. La manifestación drástica más temprana de la necrosis de epidermis (61-85%) y corteza (61-80%) ocurrió entre los 11-13 DDI, cuando se inocularon conjuntamente *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*. Lo anterior podría explicarse por el efecto sinérgico de las enzimas que cada patógeno sintetiza, lo que facilita el progreso de la enfermedad. Las estacas testigo, mostraron daño ligero debido a la oxidación por el corte. En campo, la necrosis del tallo de la higuera está asociado a la diseminación de esporas y micelio a través del agua, viento o herramientas. No obstante, en vivero, la alta densidad podría favorecer la diseminación de propágulos e infestación, ya que las plántulas se encuentran

of seedlings of various species of agricultural importance. This oomycete is one of the most aggressive species in its genus (Mavrodi *et al.*, 2012). *Pythium ultimum* is related to the rotting of roots in adult plants, rootstocks and apple seedlings (Mazzola *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016). In this investigation, *P. ultimum* promoted 21-30% of the damage on the cortex 19-32 DAI. The presence of mycelia was also observed in the upper section of the cuttings, and it detached easily when touched. The epidermis presented no rotting or detaching.

The highest damage percentages appeared in a lower time range (17 to 20 DAI), when mixed inoculations were carried out with *F. solani* + *A. alternata* and *F. solani* + *P. ultimum*. The drastic appearance of necrosis on the epidermis (61-85%) and cortex (61-80%) took place between 11-13 DAI, when *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* were inoculated together. This could be explained by the synergic effect of the enzymes that each pathogen synthesizes, helping the disease to progress. The control cuttings showed slight damage due to oxidation from the cut. On the field, the necrosis of the fig tree stem is related to the dissemination of spores and mycelia through water, wind or tools. Notwithstanding this, in the greenhouse, the high density may favor the dissemination of propagules and infestation, since the seedlings are near each other in the processes of propagation, climatization and transportation.

This work is the first time in which *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* are reported as causal agents of the rotting of fig tree cuttings. The symptoms found in the cuttings evaluated *in vitro* were similar to those presented in propagation greenhouse seedlings, thus confirming Koch's postulates. The proposed scale of severity will help identify the degree of damage caused by *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum*, whether individually or combined, in intensive fig production systems.

próximas en los procesos de propagación, climatización y transporte.

Este es el primer trabajo en el que se reporta a *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* como agentes causales de la pudrición de las estacas de la higuera. Los síntomas encontrados en las estacas evaluadas *in vitro* fueron similares a los presentados en plántulas en invernadero de propagación, confirmando así los Postulados de Koch. La escala de severidad propuesta permitirá identificar el grado de daño causado por *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*, de forma individual o combinada, en los sistemas de producción intensivos de higo. De esta investigación se deriva la necesidad de validar las escalas de severidad en el sistema de propagación de higo en invernadero. Así, al verificarse su precisión y exactitud, podrán emplearse exitosamente en la evaluación de los daños en esta especie. Por otro lado, la identificación de los patógenos *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* permitirá realizar un control fitosanitario adecuado, y ofrecer plantas de mejor calidad que permitan el establecimiento óptimo de sistemas intensivos.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta aportación forma parte de una investigación de Maestría en Ciencias del programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, que fue apoyada económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

#### LITERATURA CITADA

- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 200p.
- Boliani AC, Ferreira AFA, Monteiro LNH, Silva MSACD and Rombola AD. 2019. Advances in propagation of *Ficus carica* L. Revista Brasileira de Fruticultura 41:1-13. doi: 10.1590/0100-29452019026
- Flaishman MA, Rodov V and Stover E. 2007. The fig: botany, horticulture, and breeding. Horticultural Reviews 34:113-196. doi: 10.1002/9780470380147.ch2
- García V, Iriarte A, Flores S y Lesino G. 2008. Monitoreo higrotérmico de un edificio acondicionado para propagación agámica de plantas. Avances en energías renovables y medio ambiente 12:29-36. Recuperado de <https://>

This investigation leads to the need to validate the scales of severity in the fig propagation system in the greenhouse. In this way, when verifying their precision and accuracy, they may be used successfully in the evaluation of damages of this species. On the other hand, the identification of the pathogens *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* will help carry out an adequate phytosanitary control, and offer better-quality plants that allow an optimum establishment of intensive systems.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This contribution is part of an investigation for a Master in Science degree from the Soil Science program of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, which was economically funded by the National Science and Technology Council (Conacyt).

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

- [www.mendoza-conicet.gob.ar/asades/modulos/averma/trabajos/2008/2008-t002-a005.pdf](http://www.mendoza-conicet.gob.ar/asades/modulos/averma/trabajos/2008/2008-t002-a005.pdf)
- García RMT, Mendoza CVM, Valadez ME y Muratalla LA. 2013. Initial assessment of natural diversity in Mexican fig landraces. Genetics and Molecular Research 12:3931-3943. doi: 10.4238/2013.September.23.12
- Hernández RL y Sandoval IJS. 2015. Escala diagramática de severidad para el complejo mancha de asfalto del maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 33:95-103. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100095&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100095&lng=es&tlng=es).
- Khanzada MA, Lodhi AM and Shahzad S. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pakistan Journal of Botany 36:181-190. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Saleem\\_Shahzad/publication/266069789\\_Pathogenicity\\_of\\_Lasiodiplodia\\_theobromae\\_and\\_Fusarium\\_solani\\_on\\_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Saleem_Shahzad/publication/266069789_Pathogenicity_of_Lasiodiplodia_theobromae_and_Fusarium_solani_on_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf)
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. USA. 388p.
- Logrieco A, Moretti A and Solfrizzo M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal 2:129-140. doi: 10.3920/WMJ2009.1145

- López P, Venema D, de Rijk T, de Kok A, Scholten JM, Mol HG and de Nijs, M. 2016. Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control* 60:196-204. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.032
- Lou J, Fu L, Peng Y and Zhou L. 2013. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules* 18:5891-5935. doi: 10.3390/molecules18055891
- Mavrodi OV, Walter N, Elateek S, Taylor CG and Okubara PA. 2012. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control* 62:93-102. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.03.013
- Mazzola M, Andrews PK, Reganold JP and Levesque CA. 2002. Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.6.669
- Mendoza CVM, Vargas CJM, Calderón ZG, Mendoza CMD, and Santacruz VA. 2017. Intensive production systems of fig (*Ficus carica* L.) under greenhouse conditions. *Experimental Agriculture* 53:339-350. doi: 10.1017/S0014479716000405
- Rasband WS. 2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- Torres GA. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17:11-16. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/24385/>
- Wang PH, Chen YS, Lin MJ, Tsou YJ and Ko WH. 2010. Severe decline of wax apple trees caused by *Fusarium solani* in northern Taiwan. *Botanical Studies* 51:75-80. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11455/68359>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego USA. 482p. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Zhu Y, Shin S and Mazzola M. 2016. Genotype responses of two apple rootstocks to infection by *Pythium ultimum* causing apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38:483-491. doi: 10.1080/07060661.2016.1260640

# Radial graphics to characterize PRSV-P symptoms in *Carica papaya*

## Gráficos radiales para caracterizar síntomas de PRSV-P en *Carica papaya*

David Sósol-Reyes, Juan A. Villanueva-Jiménez\*, Francisco Osorio-Acosta, Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Programa de Posgrado en Agroecosistemas Tropicales, Km 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Manlio F. Altamirano, Veracruz, CP 91690, México; Juan C. Noa-Carrazana, Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, (INBIOTECA) Avenida de las Culturas Veracruzanos No. 101. Colonia Emiliano Zapata, C.P. 91090, Xalapa, Veracruz, México. \*Autor para correspondencia: javj@colpos.mx

Recibido: 13 de Diciembre, 2019.

Aceptado: 10 de Abril, 2020.

Sósol-Reyes D, Villanueva-Jiménez JA, Osorio-Acosta F and Noa-Carrazana JC. 2020. Radial graphics to characterize PRSV-P symptoms in *Carica papaya*. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 280-292.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1912-1

Primera publicación DOI: 17 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 17, 2020.

**Resumen.** El *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) produce diferentes síntomas, los que podrían variar con las condiciones ambientales y con la severidad. El objetivo fue caracterizar la diversidad de síntomas mediante gráficos radiales y analizar la evidencia patogénica como soporte de la variabilidad poblacional de PRSV-P presente en plantaciones comerciales de papayo var. Maradol roja en la zona Centro del estado de Veracruz. Se revisaron visualmente los síntomas prevalentes en  $\approx 200$  plantas por parcela. Se colectaron hojas que conformaron seis grupos diferenciales de síntomas. Por cada grupo se

**Abstract.** The *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) produces different symptoms, which might vary, depending on the environmental conditions and severity. The aim was to characterize the diversity of symptoms using radial graphs and analyze the pathogenic evidence to support the population variability of PRSV-P present in commercial plantations of papaya var. Red Maradol in the Central area of the Veracruz state. Symptoms prevalent in  $\approx 200$  plants per orchard were visually revised. Collected leaves were classified into six groups differentiated by symptoms. For each group of symptoms, a representative leaf was taken to mechanically inoculate ten papaya plants in the greenhouse. The identity of the virus was confirmed by RT-PCR. It was recorded when the same symptoms appeared in the inoculated plants, and if the behavior and severity of each collect were observed during two seasons of the year. Thus, six collections were characterized by the group of symptoms observed inside the greenhouse, and then they were presented in radial diagrams to facilitate



tomó una hoja representativa para inocular mecánicamente diez plantas de papayo en invernadero. La identidad del virus se confirmó por RT-PCR. Se registró en tiempo en el que se presentaron los mismos síntomas en las plantas inoculadas, así como el comportamiento y la severidad de cada colecta en dos épocas del año. Por tanto, se caracterizaron seis colectas por grupo de síntomas mostrado a nivel invernadero, los cuales se presentan en diagramas radiales para facilitar su uso como guía de campo. La manifestación de síntomas del PRSV-P en huertas presentó variabilidad respecto a los síntomas mostrados en invernadero, e incluso se presentó menor severidad durante primavera-verano; esto podría ser un indicador de la variabilidad genética del virus y de su respuesta a la temperatura ambiente prevaleciente.

**Palabras clave:** diversidad de síntomas, papayo, severidad, variabilidad, virus.

Una de las principales limitantes de la producción de los agroecosistemas con papayo (*Carica papaya*) es la enfermedad ocasionada por el virus de la mancha anular del papayo (PRSV-P) (Rivas-Valencia *et al.*, 2008). Este virus pertenece al género *Potyvirus* y se transmite de manera no persistente por diferentes especies de áfidos, presentes en plantas arvenses en áreas cercanas o dentro de la parcela. La enfermedad se manifiesta con clorosis en las hojas jóvenes, moteado amarillo y verde, aclaramiento de las nervaduras, manchas aceitosas en los peciolas, tallo y frutos; más avanzada la enfermedad, se observa la deformación y reducción del área foliar (Chalak *et al.*, 2017). Estos síntomas acompañan una disminución en la calidad de la hoja y puede ocasionar pérdidas del 30 al 100% de la producción (Hernández-Castro *et al.*, 2015). El control químico dirigido a la eliminación de

their use as a field guide. PRSV-P symptoms from orchards presented variability in relation to those shown in the greenhouse, been also less severe during the spring-summer season; this might be an indicator of the genetic variability of the virus and its response to the prevailing environmental temperature.

**Key words:** diversity of symptoms, papaya, severity, variability, virus.

One of the major constraints to papaya (*Carica papaya*) production agroecosystems is the disease caused by the *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) (Rivas-Valencia *et al.*, 2008). This virus belongs to the *Potyvirus* genus and is transmitted in a non-persistent manner transmitted by different aphid species present in weeds, in the plot or nearby areas. Symptoms of the disease are chlorosis on young leaves, yellow and green mottling, clearing along leaf veins, and oily spots on the petioles, stems, and fruit. In advanced stages, the disease causes deformation and reduction of the leaf area (Chalak *et al.*, 2017). These symptoms reduce the quality of leaves and cause production losses ranging from 30 to 100% (Hernández-Castro *et al.*, 2015). Chemical control to eliminate the vectors has proven to be ineffective. Cultural control seeks to identify and eliminate plants that have been recently infected acting as a source of inoculum. These measures are intended to delay viral incidence and partially reduce crop damage (Hernández-Castro *et al.*, 2010). In Mexico, the genetic variability of PRSV-P can be as wide as the diversity of ecological niches where papaya is grown (Ordáz-Pérez *et al.*, 2017). This variability can cause some strains to develop different symptoms (Spetz *et al.*, 2003). Cabrera-Mederos *et al.* (2008) state that the symptoms depend on the viral isolate. On their part, González

vectores, es ineficiente; el control cultural busca identificar y eliminar plantas recientemente infectadas, que actúan como fuente de inóculo; medidas que están dirigidas a retrasar la incidencia viral y disminuir parcialmente el daño al cultivo (Hernández-Castro *et al.*, 2010). En México, la variabilidad genética del PRSV-P puede ser tan amplia como la diversidad de los nichos ecológicos en donde se cultiva papayo (Ordáz-Pérez *et al.*, 2017). Esta variabilidad puede ocasionar que algunas cepas tengan distintos síntomas (Spetz *et al.*, 2003). Cabrera-Mederos *et al.* (2008) afirman que los síntomas dependen del aislado viral. Por su parte, González *et al.* (2003) lograron distinguir diferencias en la sintomatología producida por cepas atenuadas y severas de PRSV-P al inocularlas mecánicamente en distintas especies de hospederos. Noa-Carrazana *et al.* (2006) reportaron al menos tres aislados diferentes del virus, provenientes de los municipios de Tierra Blanca, Cotaxtla, La Antigua, Paso de Ovejas, todos de la zona central de Veracruz, que conforman la principal zona productora de esta fruta. Por lo tanto, se planteó como objetivo caracterizar la diversidad de síntomas mediante gráficos radiales y analizar la evidencia patogénica como soporte de la variabilidad poblacional de PRSV-P presente en plantaciones comerciales de papayo var. Maradol roja en la zona Centro del estado de Veracruz.

Se colectó tejido foliar de plantas de papayo var. Maradol roja de ocho a quince meses de edad en parcelas comerciales en los municipios de La Antigua, Cotaxtla, Tlalixcoyan y Tierra Blanca, Veracruz, México. Las plantas mostraban los siguientes síntomas característicos de PRSV-P: aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas, mosaico liso, parches verdes, islas verdes, estrías, clorosis general y sectorial, arropollamiento, epinastia y filiformidad. Se inspeccionaron cinco parcelas de cada municipio, donde se observaron  $\approx 200$  plantas enfermas por parcela, lo cual permitió distinguir

*et al.* (2003) were able to distinguish differences in the symptomatology produced by attenuated and severe strains of PRSV-P when they were mechanically inoculated in different host species. Noa-Carrazana *et al.* (2006) reported at least three different virus isolates collected in Tierra Blanca, Cotaxtla, La Antigua and Paso de Ovejas municipalities, all of them located in the central zone of the State of Veracruz, which include the main papaya producing area. Therefore, the objective of this study was to characterize the diversity of symptoms using radial graphics and analyze the pathogenic evidence to support the variability of PRSV-P populations found in commercial orchards of papaya Maradol Roja variety in the central zone of Veracruz.

For the experiment, foliar tissue of 8-15-month-old plants of papaya Maradol Roja variety was collected in the municipalities of La Antigua, Cotaxtla, Tlalixcoyan and Tierra Blanca, Veracruz, Mexico. The plants had the following symptoms characteristic to PRSV-P: clearing and ramification of the main leaf veins, smooth mosaic, green patches and isles, streaks, general and sectorial chlorosis, bunchy appearance, epinasty and filiformity. In the five plots that were inspected in each municipality,  $\approx 200$  infected plants were observed, which made it possible to distinguish the differences or similarities of the symptoms in the field. Two leaves per infected plant showing differential disease severity were collected. They were kept in hermetic plastic bags in a cooler with cooling gels until they were used later for mechanical transmission. In the laboratory, six groups of leaves with symptoms and differential severity were formed. From each group of similar symptoms, the most representative leaf was taken for mechanical transmission in 10 three-month-old healthy papaya plants. For this, papaya seeds of the Maradol Roja variety were sown (Semillas del Caribe®). Seedbed trays were washed and

las diferencias o similitudes en síntomas presentes en campo. Se colectaron dos hojas por planta enferma, que mostraban severidad diferencial de la enfermedad; se mantuvieron en bolsas herméticas en una hielera con geles refrigerantes, para su uso posterior en transmisión mecánica. En laboratorio, se conformaron seis grupos de hojas con síntomas y severidad diferencial. Por cada grupo de síntomas similares se tomó la hoja más representativa para la transmisión mecánica en 10 plantas de papayo sanas de tres meses de edad. Para ello, se sembraron semillas de papayo var. Maradol Roja (Semillas del Caribe®). Las charolas para almácigo se lavaron y desinfectaron (NaClO 5%), y se llenaron con el sustrato Cosmo Peat®. Las plántulas se trasplantaron a bolsa negra para vivero (40 x 40 cm, calibre 600), en una mezcla 1:1 de sustrato Cosmo Peat® y suelo rico en materia orgánica; se llevaron a un invernadero con malla antiáfidos del Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados. Se aplicó imidacloprid en drench a las plantas para prevenir que cualquier áfido pudiera enfermar a las plantas, y abamectina para prevenir la presencia de ácaros; las aplicaciones se realizaron cada siete días.

Para la inoculación se maceraron 2 g de hoja infectada y se le agregaron 10 mL de una solución tampón fosfato de potasio 0.01 M pH 7. En las tres primeras hojas completamente expandidas del ápice de la planta sana, se causó una lesión con carborundum; inmediatamente se aplicó la solución tampón con las partículas virales, con la ayuda de un hisopo (Valderrama *et al.*, 2015). En total se inocularon 60 plantas, 10 plantas por grupo de síntomas, además, se separaron 10 plantas sanas como testigo. Se consideró como colecta al virus inoculado en 10 plantas, lo cual se corroboró mediante análisis molecular. En el Cuadro 1 se propone una nomenclatura que describe cada síntoma foliar producido por el PRSV-P en las plantas inoculadas. Para observar si los síntomas caracterizados al momento

desinfectado with 5% NaClO, and then filled with Cosmo Peat® substrate. Papaya seedlings were transplanted to black plastic bags (40 x 40 cm, 600 gauge) filled with a 1:1 mixture of Cosmo Peat® substrate and soil rich in organic matter. Later, they were taken to a greenhouse with anti-aphid mesh at Campus Veracruz of Colegio de Postgraduados. Imidacloprid was applied in drench to the plants to protect them against aphids, and abamectin was applied every seven days to protect them against mite attack.

For inoculation, 2 g of infected leaves were macerated, and 10 mL of a pH 7, 0.01 M potassium phosphate buffer solution were added. A lesion to the first three completely expanded leaves of healthy plants was made with carborundum, and a buffer solution containing viral particles was immediately applied using a cotton swab (Valderrama *et al.*, 2015). A total of 60 plants were inoculated, 10 plants per group of symptoms; 10 healthy plants were separated and used as the control. The virus inoculated in 10 plants was considered as a virus collection, which was corroborated by conducting a molecular analysis. In Table 1 we propose a nomenclature for each foliar symptom produced by PRSV-P in the plants that were inoculated. To observe if the symptoms characterized during the plant field-collection could be replicated in the greenhouse, they were ordered based on a scale for disease severity (Table 2) (Flores-Bautista *et al.*, 2018). Radial graphics were constructed using Sigma Plot® software to facilitate the characterization of the symptoms system and associate it with each collection. The graphics make it possible to observe and compare the relative values among collections with an initial central point that indicates a leaf with no-symptoms.

For molecular identification, a RT-PCR test was conducted using the plants inoculated in the

**Cuadro 1. Descripción de síntomas observados en invernadero.**  
**Table 1. Description of the symptoms observed in the greenhouse.**

| Síntoma                             | Descripción                                                                                                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aclaramiento nervaduras principales | Aclaramiento o amarillamiento de nervaduras primarias                                                         |
| Aclaramiento nervaduras ramificadas | Aclaramiento o amarillamiento de nervaduras secundarias                                                       |
| Mosaico liso                        | Zonas claras distribuidas en la superficie de la hoja                                                         |
| Parches verdes                      | Zonas verde intenso que alternan en la superficie de la hoja                                                  |
| Islas verdes                        | Zonas abultadas de color verde intenso hacia la parte superficial                                             |
| Estrías                             | Tejidos de la lámina foliar atrofiados, formando líneas sinuosas blanquecinas                                 |
| Clorosis general                    | Amarillamiento de la lámina foliar                                                                            |
| Clorosis sectorial                  | Amarillamiento en zonas puntuales de la lámina foliar                                                         |
| Arrepollamiento                     | “Dedos” de las hojas no desplegados, de consistencia crespada, que en su conjunto dan una apariencia apretada |
| Epinastia                           | Concavidad en márgenes de la hoja que dirigen el foliolo al haz                                               |
| Filiformidad                        | Reducción de la lámina foliar o “mano de chango”                                                              |

de la colecta en campo se replicaban en el invernadero, éstos se ordenaron de acuerdo a una escala de severidad del daño (Cuadro 2) (Flores-Bautista *et al.*, 2018). Se elaboraron gráficos radiales con el programa Sigma Plot® para facilitar la caracterización del sistema de síntomas y relacionarlo con cada colecta. Con los gráficos se pueden observar y comparar los valores relativos entre colectas, respecto a un punto central inicial, el cual indica una hoja sin presencia de síntomas.

Para la identificación molecular, se realizó la prueba RT-PCR a las plantas inoculadas en invernadero para identificar la presencia de PRSV-P. Se utilizó un termociclador Multigene Labnet® con el producto de Promega RT-PCR System®. El ARN del virus se obtuvo con el kit de extracción Zymo Research®, según las indicaciones del fabricante. Para amplificar el gen de la proteína de la cápside (CP), se utilizaron los primers descritos por Noa-Carranza *et al.* (2006): 3F (5'GACCATGGTCCTAGAATGAAGCTGTGGATG 3') y 11R (3'TTTTTTTTCTCTCATTCTAAGAGGCTC 5'). Se utilizó un programa de un ciclo de 45 min a 45 °C, un ciclo de 2 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 68 °C; y un ciclo de

greenhouse to detect the presence of PRSV-P. For the test, a Multigene Labnet® thermocycler and the Promega RT-PCR System® product were used. The viral RNA was obtained using the Zymo Research® extraction kit, following the manufacturer's instructions. To amplify the capsid protein (CP) gene, the primers described by Noa-Carranza *et al.* (2006) were used: 3F(5' GACCATGGTCCTAGAATGAAGCTGTGGATG 3') and 11R (3'TTTTTTTTCTCTCATTCTAAGAGGCTC 5'). The amplification program

**Cuadro 2. Escala de severidad para evaluación de síntomas producidos por PRSV-P en plantas de papayo, propuesta por Flores-Bautista *et al.* (2018).**

**Table 2. Severity scale proposed by Flores-Bautista *et al.* (2018) to evaluate the symptoms produced by PRSV-P in papaya plants.**

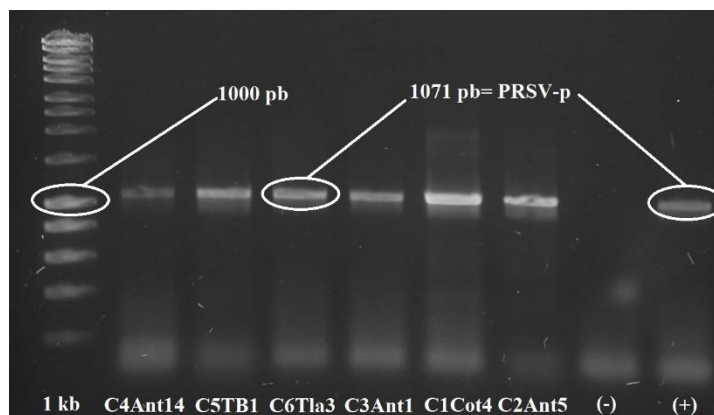
| Severidad | Rango de severidad (%) | Promedio para calcular severidad (%) |
|-----------|------------------------|--------------------------------------|
| 0         | 0                      | 0                                    |
| 1         | 1-9                    | 5                                    |
| 2         | 10-24                  | 17                                   |
| 3         | 25-50                  | 38                                   |
| 4         | 51-75                  | 63                                   |
| 5         | 76-100                 | 88                                   |

extensión final de 7 min a 68 °C. Los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Los fragmentos de interés se purificaron con el kit de Zymo Research®; se secuenciaron con el equipo AB 3130® mediante la técnica de Sanger y tecnología capilar en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., México. Las secuencias se compararon con otras de aislamientos mexicanos en el GenBank® (DQ008449.1, DQ008448.1 y DQ00847.1), con 92 a 98% de identidad, lo que corroboró la identidad del virus.

La presencia de PRSV-P se confirmó mediante la observación de amplicones positivos de 1071 pares de bases, correspondiente a la región de la cápside viral (CP) (Figura 1). Los primeros síntomas aparecieron a los 40 días posteriores a la inoculación (dpi) mecánica; se observaron cambios en la sintomatología, así como el incremento en la severidad de algunos síntomas hasta los 60 dpi. Chávez-Calvillo *et al.* (2016) también observaron el mayor daño de PRSV-P a los 60 dpi, con mayor deformación de la hoja, aclaramiento de nervaduras

consisted of one cycle at 45 ° for 45 min, one cycle at 94 °C for 2 min, 40 cycles at 94 °C for 30 s, 1 min at 60 °C and 2 min at 68 °C; and one final extension cycle at 68 °C for 7 min. The amplified products were visualized by electrophoresis in 1% agarose gel. The amplified fragments were purified using the Zymo Research® kit, sequenced with an AB 3130® equipment applying the Sanger technique and capillary technology at Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Mexico. The sequences obtained were compared to other sequences of Mexican isolates stored in the GenBank® (DQ008449.1, DQ008448.1 and DQ00847.1), and 92-98% identity was found, corroborating the virus identity.

The presence of PRSV-P was confirmed by observing positive amplicons of 1071 base pairs that corresponded to the region of the viral capsid (CP) (Figure 1). The first symptoms appeared 40 days after mechanical inoculation (dai). Changes in symptomatology and a severity increase in some of the symptoms were not observed until 60 dai. Chávez-Calvillo *et al.* (2016) also observed the



**Figura 1.** Amplicones positivos a la proteína de la cápside de PRSV-P analizados por RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1X en tampón TAE. (1 kb): marcador de peso molecular; (+): control positivo; (-): control negativo; (C4Ant14, C5TB1, C6Tla3, C1Cot4, C2Ant5): Colectas del virus con sistema de síntomas diferenciado (Cuadro 1).  
**Figure 1.** Positive amplicons to the capsid protein of PRSV-P, analyzed by RT-PCR. Electrophoresis in 1X agarose gel, run in TAE buffer. (1 kb): molecular weight marker; (+): positive control; (-): negative control; (C4Ant14, C5TB1, C6Tla3, C1Cot4, C2Ant5): Virus collections with a differentiated symptoms system (Table 1).



y mosaico severo. Singh *et al.* (2017) mencionan que el PRSV-P produjo síntomas sistémicos de mosaico y deformación de las hojas en *C. papaya* y otros hospederos. Las escalas de severidad de diversos autores catalogan a los síntomas de manera genérica, mientras que en este trabajo se presenta una caracterización detallada de cada síntoma foliar del PRSV-P observado (Figura 2). Algunos síntomas producidos por el PRSV-P coinciden con los registrados por Hernández-Castro *et al.* (2010),

highest level of damage caused by PRSV-P at 60 dai, associated with the highest level of leaf deformation, clearing along leaf veins and severe mosaic. Singh *et al.* (2017) mention that PRSV-P caused systemic mosaic and leaf deformation symptoms in papaya and other hosts. The severity scales of different authors catalog the symptoms in a generic way, while our study provide a detailed characterization of each foliar symptom caused by PRSV-P (Figure 2). Some of the symptoms produced by PRSV-P

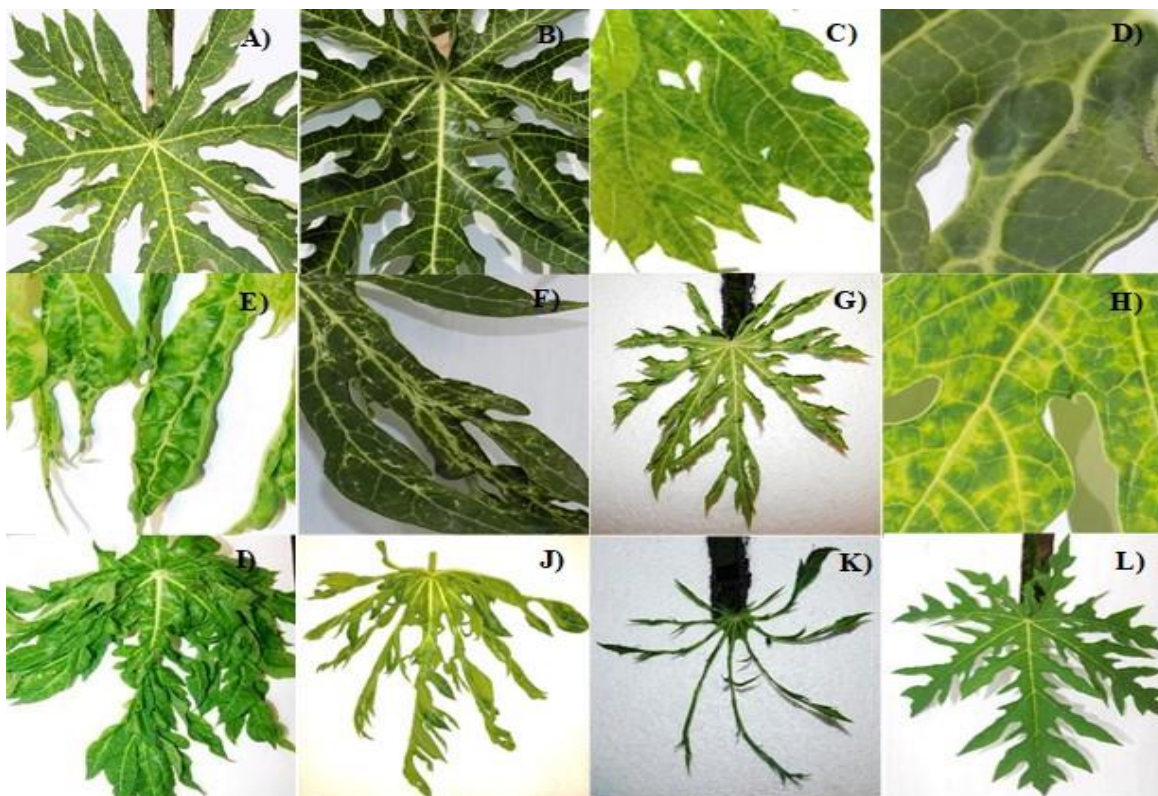


Figura 2. Caracterización de síntomas foliares del PRSV-P inoculado mecánicamente en plantas de papayo var. Maradol Roja de tres meses de edad, en invernadero, de diciembre 2018 a mayo 2019. Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados. A) Aclaramiento nervaduras principales; B) aclaramiento nervaduras ramificadas; C) mosaico liso; D) parches verdes; E) islas verdes; F) estrias; G) clorosis general; H) clorosis sectorial; I) arrepollamiento; J) epinastia; K) filiformidad; L) hoja sana.

Figure 2. Characterization of PRSV-P foliar symptoms mechanically-inoculated in three-month-old plants of papaya Maradol Roja variety under greenhouse conditions, from December 2018 to May 2019. Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados. A) Clearing of the main veins; B) clearing of ramified leaf veins; C) smooth mosaic; D) green patches; E) green isles; F) streaks; G) general chlorosis; H) sectorial chlorosis; I) bunched appearance; J) epinasty; K) filiformity; L) healthy leaf.

como clorosis, mosaico y reducción de lámina foliar; en contraste, la caracterización propuesta en este trabajo presenta dos tipos de clorosis y cuatro síntomas asociados a mosaico.

Rodríguez *et al.* (2014) observaron síntomas de aclaramiento de nervaduras, mosaico, ampollas y deformación de la hoja a 45 dpi; adicionalmente, en el presente estudio se caracterizaron al mosaico liso, a las islas verdes, a tres tipos de deformación foliar y dos tipos de aclaramiento de nervaduras (Figura 2). Además, se observó una diferenciación en la sintomatología de cada una de las plantas inoculadas en invernadero respecto a campo (Cuadro 3). La representación de los síntomas en gráficos radiales (Figuras 3 y 4) permitió caracterizar las colectas de forma diferencial, y observar los distintos grados de severidad de cada uno de los síntomas. La Figura 3 muestra los síntomas presentados en otoño-invierno, diferenciándose las colectas C4Ant14 (36% de severidad en aclaramiento de nervaduras

are similar to those recorded by Hernández-Castro *et al.* (2010), including chlorosis, mosaic and leaf blade reduction. Conversely, the characterization proposed in this study shows two types of chlorosis and four symptoms associated with mosaics.

Rodríguez *et al.* (2014) observed clearing of leaf veins, mosaic, blisters, and foliar deformation symptoms at 45 dai. In the present study, smooth mosaic, green isles, three types of leaf deformation, and two types of clearing of leaf veins also were characterized (Figure 2). Additionally, a differentiation of symptomatology was made between each plant inoculated in the greenhouse and the plants collected in the field (Table 3). Representing the symptoms in radial graphics (Figures 3 and 4) made it possible to characterize each collection in a differential way and observe the different levels of severity of each symptom. Figure 3 shows the symptoms that appear in fall-winter; where collections C4Ant14 (36% severity

**Cuadro 3. Síntomas diferenciales de cada colecta de PRSV-P observados en campo e invernadero, en planta de papayo.**  
**Table 3. Differential symptoms of each PRSV-P collection under greenhouse conditions and in the field in papaya plants.**

| Colecta | Síntomas característicos en campo                                                     | Síntomas característicos en invernadero                                                                                                     | Municipio de origen |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| C1Cot4  | Epinastia, clorosis general y aclaramiento de nervaduras principales                  | Epinastia, mosaico liso, clorosis general y sectorial, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas                                 | Cotaxtla            |
| C2Ant5  | Filiformidad, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas                    | Filiformidad, epinastia, mosaico liso, parches verdes, islas verdes, clorosis general, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas | La Antigua          |
| C3Ant1  | Filiformidad y aclaramiento de nervaduras principales                                 | Filiformidad, epinastia, clorosis general, parches verdes, islas verdes, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas               | La Antigua          |
| C4Ant14 | Aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas                                  | Clorosis general, arrepollamiento, mosaico liso, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas                                       | La Antigua          |
| C5TB1   | Clorosis sectorial, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas              | Filiformidad, arrepollamiento, clorosis general y sectorial, mosaico liso, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas             | Tierra Blanca       |
| C6TLA3  | Filiformidad, clorosis general, mosaico liso y aclaramiento de nervaduras principales | Filiformidad, clorosis general, islas verdes, parches verdes, mosaico liso, aclaramiento de nervaduras principales y ramificadas            | Tlalixcoyan         |

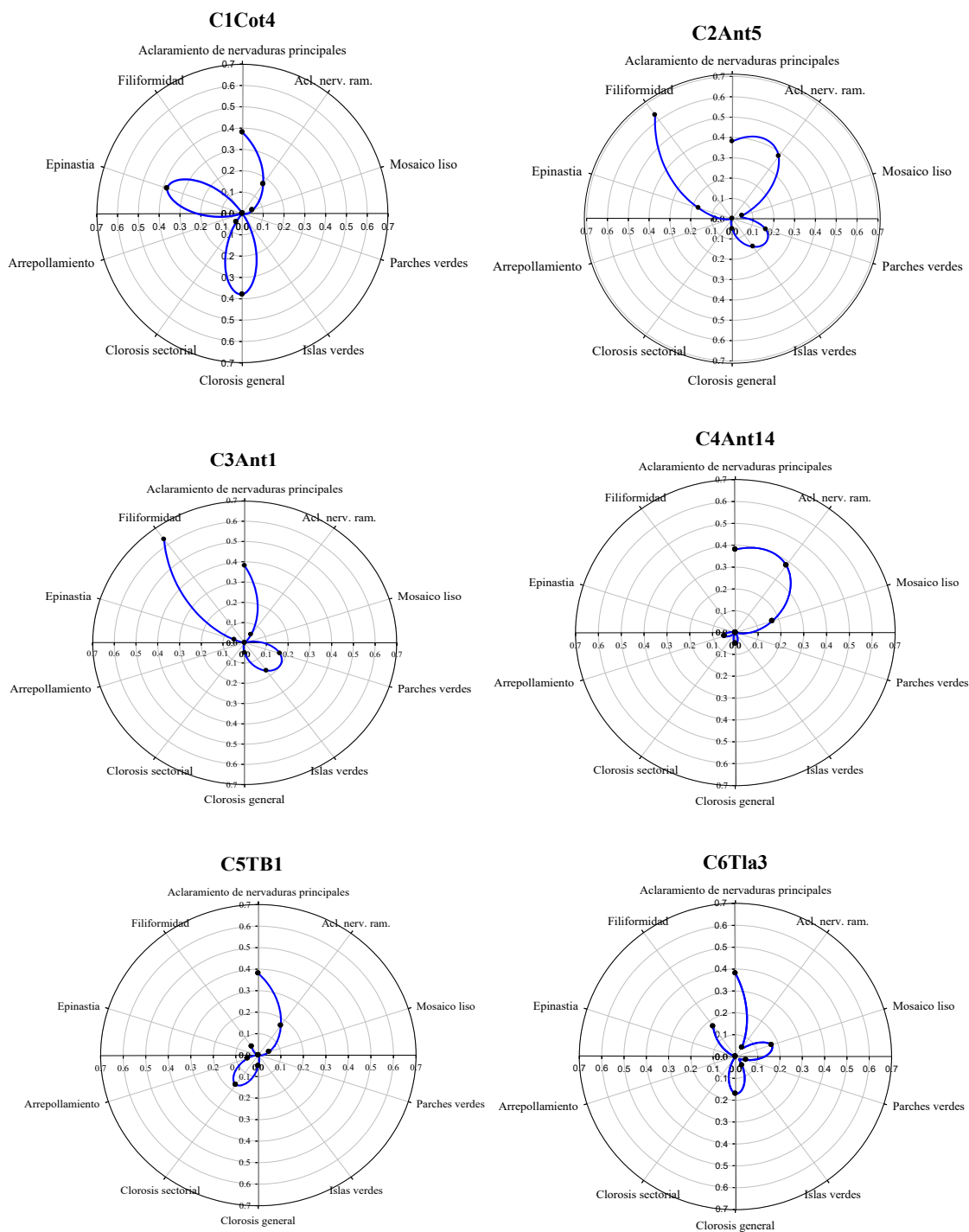


Figura 3. Diagramas radiales de severidad de síntomas foliares producidos por seis colectas del PRSV-P en *C. papaya* en el ciclo otoño-invierno 2018, 55 días posteriores a la inoculación mecánica.

Figure 3. Radial diagrams of foliar symptoms severity produced by six PRSV-P collections in *C. papaya* in the 2018 fall-winter cycle, 55 days after mechanical inoculation.

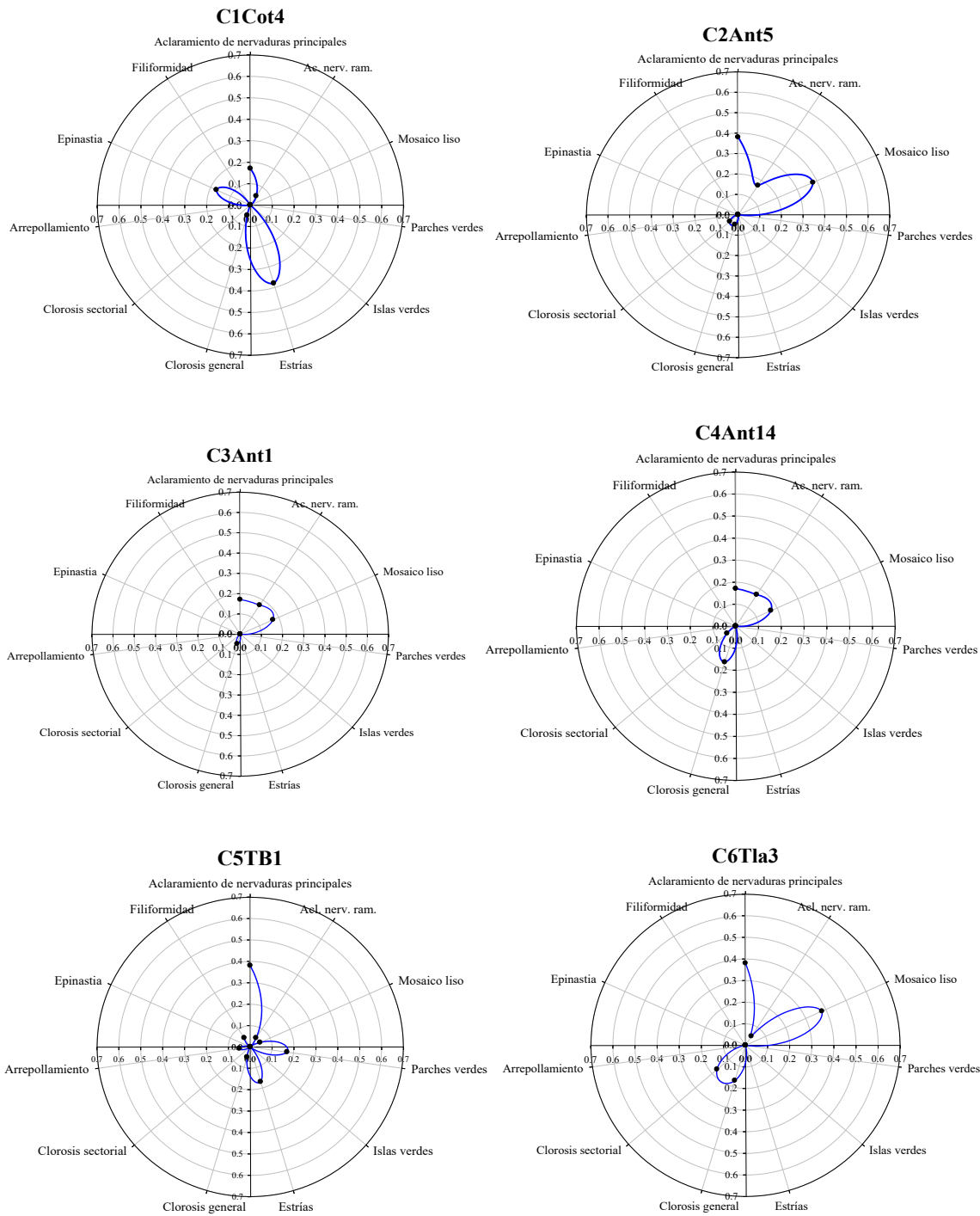


Figura 4. Diagramas radiales de severidad de síntomas foliares producidos por seis colectas del PRSV-P en *C. papaya* en el ciclo primavera-verano 2019, 195 días posteriores a la inoculación mecánica.

Figure 4. Radial diagrams of foliar symptoms severity produced by six PRSV-P collections in *C. papaya* in the 2019 spring-summer cycle, 195 days after mechanical inoculation.



principales y ramificadas) y C5TB1 (36% de severidad en aclaramiento de nervaduras principales), concentrándose la longitud de las curvas en la parte superior derecha, en donde se encuentran los síntomas moderados, que manifiestan menor daño a la planta.

Las colectas C1Cot4, C2Ant5, C3Ant1 y C6Tla3 muestran curvas con una tendencia hacia la parte superior izquierda del gráfico, zona donde se grafican los síntomas que tipifican la deformación del área foliar; además, en estas colectas también se observó la asociación de síntomas. Tal y como lo sugieren Rodríguez *et al.* (2014), se observó una relación entre la severidad de síntomas y la temperatura, los cuales fueron menos severos a temperaturas superiores a 35 °C. En la temporada primavera-verano 2019 (Figura 4) se lograron observar “estrías” en las colectas C1Cot4 y C5TB1, síntoma que no se presentó en la época de temperaturas frescas (23 °C, otoño-invierno).

Es posible que la disminución en la severidad y la atenuación de síntomas en las seis colectas estuvo asociada a temperaturas mayores de 35 °C, tal y como lo mencionan Ordáz-Pérez *et al.* (2017). La colecta C5TB1 presentó mayor severidad en los primeros 60 dpi de esta temporada, con síntomas de filiformidad y epinastia, los cuales causan mayor daño en la planta. Cabrera-Mederos *et al.* (2010) observaron algo similar, con un mosaico del PRSV-P más ligero y ausencia de filiformidad cuando se sometieron a las plantas infectadas a 38 °C en invernadero; posteriormente, al reducir la temperatura a 20 °C bajo condiciones controladas, los síntomas se tornaron nuevamente severos. Bau *et al.* (2004) observaron variación en la expresión de síntomas de PRSV-P, de acuerdo a la temporada del año, con un incremento en la época fría (19 °C) y de lluvias (26 °C). En general, el desarrollo de enfermedades virales está asociado a temperatura entre 16 y 30 °C (Cabrera-Mederos *et al.*, 2010);

in the clearing of the main and ramified nerves) and C5TB1 (36% severity in clearing of the main nerves) can be differentiated, even when the length of the curves is concentrated in the upper right-hand side, where moderate symptoms that cause less damage to the plant are found.

The collections C1Cot4, C2Ant5, C3Ant1 and C6Tla3 show curves that tend to concentrate in the upper left-hand side of the graphic, where the typical symptoms of foliar area deformation are plotted. Also, an association of symptoms was observed in these collections. As suggested by Rodríguez *et al.* (2014), there was also a relation between the severity of symptoms and the temperature, with less severe symptoms at temperatures higher than 35 °C. In the 2019 spring-summer cycle (Figure 4), “streaks” were observed in collections C1Cot4 and C5TB1, a symptom that was not observed during the cool temperature season (23 °C, fall-winter).

The reduction of severity and mitigation of symptoms could be associated with temperatures higher than 35 °C, as mentioned by Ordáz-Pérez *et al.* (2017). The C5TB1 collection showed the highest level of severity during the first 60 dai of this season with filiformity and epinasty symptoms, which caused the most damage to the plant. Cabrera-Mederos *et al.* (2010) observed similar PRSV-P symptoms, with slight mosaic and no filiformity when the infected plants were placed in a greenhouse at 38 °C. Later, when the temperature was reduced to 20 °C under controlled conditions, the symptoms became severe again. Bau *et al.* (2004) observed variation in the expression of PRSV-P symptoms, according to the year's season, with an increase in the cold (19 °C) and rainfall seasons (26 °C). Overall, the development of viral diseases is associated with temperatures between 16 and 30 °C (Cabrera-Mederos *et al.*, 2010); higher temperatures cause a low viral concentration, which mitigates the symptoms and the plant apparently



temperaturas superiores provocan una baja concentración viral, lo que resulta en atenuación de síntomas y la aparente recuperación de la planta a la enfermedad.

Las seis colectas de PRSV-P se pudieron separar por sintomatología foliar mediante la caracterización de síntomas propuesta en este trabajo y el uso de gráficos radiales. La mayor severidad de síntomas se presentó en la época de menor temperatura ambiental, respecto a la época de primavera-verano. Las diferencias encontradas entre las distintas colectas podría ser un indicador de la variabilidad genética del virus. Por ello, es necesario realizar estudios con plantas indicadoras para determinar si la sintomatología producida por colecta se replica en diferentes hospederos. Además, con estudios moleculares en regiones que participen en el desarrollo de sintomatología y severidad, como cápside viral (CP) y componente auxiliar (HC-Pro), se podría observar si existe diferencia en los nucleótidos, lo cual pueden producir diferencias en la expresión de síntomas y en la severidad del virus. En conjunto, ensayos biológicos y moleculares podrían determinar diferentes aislados virales, tales como aislados atenuados y severos.

## LITERATURA CITADA

- Bau HJ, Cheng YH, Yu TA, Yang JS, Liou PC, Hsiao CH and Yeh SD. 2004. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* in Taiwan. *Plant Disease* 88:594-599. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.594>
- Cabrera-Mederos D, Cruz M, González JE, Hernández R y Portal O. 2008. Diagnóstico y caracterización biológica de un aislado del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P) procedente de Cienfuegos, Cuba. *Centro Agrícola* 35:91-93. [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V35-Numero\\_2/cag172081614.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V35-Numero_2/cag172081614.pdf)
- Cabrera-Mederos D, García D y Portal O. 2010. Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P): Biología, epifitología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. *Biotecnología Vegetal* 10:67-77. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/273/html>
- Chalak, SU, Hasbnis SN and Supe VS. 2017. *Papaya ringspot disease management: A review*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6: 1911-1914. [https://www.researchgate.net/publication/320324510\\_Papaya\\_ring\\_spot\\_disease\\_management\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/320324510_Papaya_ring_spot_disease_management_A_review)
- Chávez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, Noa-Carrazana JC, Serrano-Rubio AA, Dinkova TD, Carrillo-Tripp M and Silva-Rosales L. 2016. Antagonism or synergism between *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus* in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology* 480:179-191. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.026>
- Flores-Bautista R, Ávila-Reséndiz C, Villanueva-Jiménez JA, Nava-Díaz C y Becerra LEN. 2018. Comportamiento de accesiones nativas de *Carica papaya* inoculadas con PRSV-P mediante *Aphis nerii*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37:147-158. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3712019/RMF1808-5.pdf>
- González A, Trujillo G, y Vegas A. 2003. Uso de hospedantes diferenciales para la identificación de cepas del virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 67-70. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221110>

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

- Hernández-Castro E, Villanueva-Jiménez JA, Mora-Aguilera JA y Nava-Díaz C. 2010. Barreras de maíz en una estrategia de manejo integral para controlar epidemias del virus mancha anular del papayo (PRSV-P). *Agrociencia* 44:339-349. <http://www.redalyc.org/pdf/302/30215552008.pdf>
- Hernández-Castro E, Nava DA, Mora AJA, Villanueva-Jiménez JA, Vargas AD and Palemón FA 2015. Incidence of the *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) and management in the state of Guerrero, Mexico. In: Dimitrov TS and Vitanova II. *Tropical Fruits*. Nova Science Publishers Inc. pp. 119-127. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3437.5203>
- Noa-Carrizana JC, Gonzáles LD, Ruiz-Castro BS, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus* in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*. 90:1004-1 <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Ordáz-Pérez D, Gámez-Vázquez J, Hernández-Ruiz J, Espinosa-Trujillo E, Rivas-Valencia P y I. Castro-Montes. 2017. Resistencia de *Vasconcellea cauliflora* al Virus de la mancha anular de la papaya-potyvirus (PRSV-P) y su introgresión en *Carica papaya*. *Revista Mexicana de Fito patología* 35:571-590. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n3/2007-8080-rmfi-35-03-00571.pdf>
- Rivas-Valencia P, Mora-Aguilera G, Téliz-Ortíz D y Mora-Aguilera A. 2008. Evaluación de barreras vegetales en el manejo integrado de la mancha anular del papayo (PRSV-P) en Michoacán, México. *Summa Phytopathologica* 34:307-312. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000400001>.
- Rodríguez MD, Geraldino DP, González OJ and Figueira A. 2014. Molecular and biological studies of *Papaya ringspot virus* isolates Brazil and Cuba. *American Journal of Agriculture and Forestry* 2:205-218. <https://pdfs.semanticscholar.org/13a8/3c6ebfadc6db33d3ad247bb3cd409f374fa1.pdf>
- Singh S, Awasti LP, Kumar P and Jagre A. 2017. Diagnostic characteristics of *Papaya ringspot virus* isolates infecting papaya (*Carica papaya* L.) in India. *Juniper Online Journal of Immuno Virology* 1:1-9. <https://pdfs.semanticscholar.org/a47a/909a5f62137896cb07feab4e1f28fad7e979.pdf>
- Spetz C, Taboada AM, Darwich S, Ramsell J, Salazar LF and Valkonen JPT. 2003. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the center of origin in Peru. *Journal of General Virology* 84:2565-2578. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19208-0>
- Valderrama S, Cedano C, Tenorio J, Romero J y Carbajal S. 2015. Caracterización sintomatológica y molecular del virus de la mancha anillada del papayo (PRSV) que infecta *Carica papaya* L. en el norte de Perú. *Scientia Agropecuaria* 6:241-246. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.01>

# Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control

## Evaluación de biofungicidas en dos variedades de café para el control de *Hemileia vastatrix*

**Marja Liza Fajardo-Franco, Martin Aguilar-Tlatelpa**, Posgrado en Manejo Sustentable de Recursos Naturales, Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Calle Principal a Lipuntahuaca S/N, Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla, CP 73475, México; **Remigio A. Guzmán-Plazola\***, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230. \*Autor para correspondencia: rguzman@colpos.mx

Recibido: 08 de Enero, 2020.

Aceptado: 12 de Abril, 2020.

Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M and Guzmán-Plazola RA. 2020. Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 293-306.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-1

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 20, 2020.

**Resumen.** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de biofungicidas elaborados con *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* y la combinación de *Bacillus subtilis* con *A. indica* y *Syzygium aromaticum*, en el control de la roya causada por *Hemileia vastatrix*, en las variedades Garnica y Typica. Se establecieron experimentos en condiciones de campo en tres localidades: Lipuntahuaca, Chilocoyo y Cinco de Mayo, con plantas de cinco meses de edad. Se encontraron diferencias significativas entre biofungicidas y el testigo para la incidencia ( $P=0.04$ ), área bajo la curva del

**Abstract.** The objective of this study was to evaluate the effect of biofungicides made with *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* and *Bacillus subtilis* plus *A. indica* plus *Syzygium aromaticum*, for the control of coffee rust caused by *Hemileia vastatrix* in cultivars Garnica and Typica. The experiments were established under field conditions in three localities: Lipuntahuaca, Chilocoyo and Cinco de Mayo, using five-month old plants. Significant differences were found between biofungicides and the control for incidence ( $P=0.04$ ), area under the disease progress curve (AUDPC) ( $P=0.04$ ), and apparent infection rate ( $P=0.03$ ). No differences were found in severity except in the last evaluation. *M. alternifolia* induced the lowest values of incidence (34.4%), AUDPC (61.8) and apparent infection rate (0.028), with percentages of reduction regarding the control of 20.9, 14.2 and 39.1%, respectively. There were no significant differences between the Typica and Garnica cultivars for incidence and severity. The experimental plants in Lipuntahuaca had lower

progreso de la severidad (ABCPE) ( $P=0.04$ ) y tasa de infección aparente ( $P=0.03$ ). No se encontraron diferencias en severidad excepto en la última evaluación. *M. alternifolia* indujo los valores más bajos de incidencia (34.4 %), ABCPE (61.8) y tasa de infección aparente (0.028), con porcentajes de reducción con respecto al testigo de 20.9, 14.2 y 39.1%, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre las variedades Typica y Garnica para incidencia y severidad. Las plantas de la localidad de Lipuntahuaca tuvieron menor incidencia (26.9%) y severidad (2.3%) en comparación con Chilocoyo y Cinco de Mayo con 51.5 y 44.5 % (incidencia) y 4.2 y 3.4% (severidad), respectivamente ( $P<0.0001$ ). Los biofungicidas no suprimieron la infección, pero los resultados sugieren que debe continuarse la investigación en este patosistema.

**Palabras clave:** Severidad, incidencia, roya, *Coffea arabica*, fungicidas botánicos.

El café es uno de los cultivos más importantes en el mundo, debido a que es crucial para la economía de al menos 60 países y es la principal fuente de ingresos de 100 millones de personas (Talhinhas *et al.*, 2017). En México, este cultivo es estratégico ya que en su producción se emplean 500 000 productores en 14 estados y 480 municipios (SAGARPA, 2017). Los principales estados productores de café cereza son Chiapas (357 733 t), Veracruz (192 341 t) y Puebla (112 228 t). En este último, el valor de la producción asciende a 778 526 miles de pesos (SIAP, 2018). Sin embargo, el cultivo es afectado por la roya, enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Los síntomas de la enfermedad se observan en hojas, inicialmente como manchas cloróticas que se tornan necróticas con el avance de la infección. El efecto varía desde defoliación menor

incidencia (26.9%) and severity (2.3%) compared to Chilocoyo and Cinco de Mayo, with a 51.5 and 44.5% (incidence) and 4.2 and 3.4% (severity), respectively ( $P<0.0001$ ). The biofungicides did not suppress the infection but the results suggest that research in this pathosystem should be continued.

**Key words:** Severity, incidence, coffee rust, *Coffea arabica*, botanical fungicides.

Coffee is one of the most important crops around the world because it is crucial for the economy of at least 60 countries and the major source of income for 100 million people (Talhinhas *et al.*, 2017). In Mexico, coffee is a strategic crop since its production employs more than 500,000 producers from 14 states and 480 municipalities (SAGARPA, 2017). The major coffee cherry producing states are Chiapas (357 733 t), Veracruz (192 341 t) and Puebla (112 228 t). In Puebla, coffee production is valued at 778 526 thousand pesos (SIAP, 2018). However, the coffee crop is affected by rust, a disease caused by *Hemileia vastatrix*. The disease symptoms appear on coffee leaves, initially in the form of chlorotic spots that become necrotic as the infection advances. The effect varies from slight defoliation to up 50% yield loss (Avelino *et al.*, 2015, Zambolim, 2016; Talhinhas *et al.*, 2017). Preventive and systemic fungicides containing copper, epoxiconazole or pyraclostrobin are applied in the diverse coffee producing regions to control the pathogen (Zambolim, 2016; Talhinhas *et al.*, 2017). In Mexico, SENASICA ran a control program based on a successful Surveillance System that contained the 2012-2013 regional epidemic outbreak (PVEF-CAFETO, 2018). In the Sierra Norte de Puebla, coffee is traditionally grown with minimum use of inputs, which means that production is under organic management. However, this has

hasta pérdida del 50% en el rendimiento (Avelino *et al.*, 2015, Zambolim, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). La aplicación de fungicidas preventivos y sistémicos que contienen cobre, epoxiconazol o pyraclostrobin es la principal forma de control del patógeno en las diversas regiones productoras (Zambolim, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). En México, el SENASICA impulsó un programa de control basado en un exitoso Sistema de Vigilancia que logró la contención epidémica regional del brote epidémico de 2012-2013 (PVEF-CAFETO, 2018). En la Sierra Norte de Puebla, la cafecultura se realiza tradicionalmente con un uso mínimo de insumos, lo que ha propiciado que la producción se oriente hacia el manejo orgánico, pero ha favorecido que la enfermedad se presente año tras año, causando pérdidas variables en la producción. Las variedades comúnmente utilizadas son Typica, Garnica y Mundo Novo (Benitez-García *et al.*, 2015). Diversas investigaciones han demostrado el uso potencial de biofungicidas. Estos productos son elaborados a partir de plantas y microorganismos para el control de hongos. En México se ha identificado a *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidorosorum*, *Verticillium lecanii*, *Simplicillium* sp. y *Lecanicillium* sp. con potencial para controlar a *H. vastatrix* (Carrión y Rico-Gray, 2002; Gómez-De La Cruz *et al.*, 2018). Otros estudios realizados en condiciones de invernadero y laboratorio han indicado el potencial de biofungicidas formulados a partir de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Corymbia citriodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* y *Allium sativum* para el control de *H. vastatrix*. Este tipo de productos representa una alternativa de manejo para la producción de café orgánico, el cual es valorado a nivel mundial (Borges *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Su aplicación en el control de la

contributed to the disease occurring year after year, causing variable production losses. The varieties most commonly cultivated are Typica, Garnica and Mundo Novo (Benitez-García *et al.*, 2015). Diverse studies have demonstrated the potential use of biofungicides. These products are made from plants and microorganisms fungi control. In Mexico, *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidorosorum*, *Verticillium lecanii*, *Simplicillium* sp. and *Lecanicillium* sp. have been identified as having the potential to control *H. vastatrix* (Carrión and Rico-Gray, 2002; Gómez-De La Cruz *et al.*, 2018). Other studies conducted under greenhouse and laboratory conditions have indicated the potential of biofungicides based on *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Corymbia citriodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* to control *H. vastatrix*. This kind of products offer a management alternative for the production of organic coffee, which is valued worldwide (Borges *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). The use of biofungicides to control rust is a low cost and low environmental impact option that reduces the risk for *H. vastatrix* to develop resistance compared to the use of synthetic fungicides (Avelino *et al.*, 2015; Ibañez and Blackman, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). However, it is necessary to analyze the effect that formulations based on plants or microorganisms have on disease progress in the field in order to come up with recommendations that can be incorporated into integrated management practices. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the effectiveness of biofungicides based on *Azadirachta indica* (neem), *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and the combination of *Bacillus subtilis* with *Azadirachta indica* and *Syzygium aromaticum* (clove) to control rust caused by *H. vastatrix* on



roya es una opción de bajo costo y menor impacto ambiental, con menor riesgo en la generación de resistencia de *H. vastatrix*, en comparación con el uso de fungicidas sintéticos (Avelino *et al.*, 2015; Ibañez y Blackman, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). Sin embargo, es necesario analizar el efecto de formulaciones elaboradas a partir de plantas o de microorganismos en el progreso de la enfermedad bajo condiciones de campo para generar recomendaciones que puedan incorporarse a las prácticas de manejo integrado. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de biofungicidas elaborados con *Azadirachta indica* (neem), *Melaleuca alternifolia* (árbol de té) y la combinación de *Bacillus subtilis* con *Azadirachta indica* y *Syzygium aromaticum* (clavo) en el control de la roya causada por *H. vastatrix* en dos variedades de café.

En 2017, se establecieron experimentos en tres localidades del municipio de Huehuetla, Puebla: a) Lipuntahuaca (20° 04' N y 97° 37' O; 546 msnm), b) Chilocoyo (20° 04' N y 97° 39' O; 907 msnm) y c) Cinco de Mayo (20° 07' N y 97° 37' O; 608 msnm). En este municipio se tiene una precipitación anual de 2900 a 3600 mm, la precipitación del mes más seco es mayor de 40 mm y presenta un clima semicálido húmedo, con un rango de temperatura de 18 a 24 °C (INEGI, 2009). En cada experimento se evaluó el efecto de tres biofungicidas en plantas de café de las variedades Garnica y Typica (Cuadro 1).

Los experimentos se desarrollaron en condiciones de campo, en sitios rodeados con parcelas de café sin aplicación de fungicidas, donde la enfermedad se presenta año tras año. Se utilizaron plantas procedentes de vivero, con cinco meses de edad desde la siembra en el semillero, sin tratamiento con fungicidas. La infección fue natural. Los experimentos en cada localidad se establecieron en un diseño de tratamientos de parcelas subdivididas con tres repeticiones (Villaseñor-Mir *et*

two coffee tree varieties.

In 2017, experiments were established at three sites in the Huehuetla municipality, Puebla: a) Lipuntahuaca (20° 04' N and 97° 37' W; 546 masl); b) Chilocoyo (20° 04' N and 97° 39' W; 907 masl); and c) Cinco de Mayo (20° 07' N and 97° 37' W; 608 masl). In this municipality, annual precipitation is 2900-3600 mm; the precipitation in the driest month is higher than 40 mm, which is a semi-warm and humid climate where the temperature varies from 18 to 24 °C (INEGI, 2009). The effect of three biofungicides on coffee plants of the Garnica and Typica varieties was evaluated in each experiment (Table 1).

The experiments were established in the field in sites surrounded by coffee tree fields to which no fungicides were applied and where the disease occurs year after year. Five-month old plants grown in seedbeds with no fungicide treatment were taken from the nursery for the experiment. Infection was natural. The experiments in each location were established using a treatment design of subdivided plots with three replications (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012). Locations were established in the large plot (3), treatments with and without biofungicide in the intermediate plot (4), and Garnica and Typica (2) in the small plots (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012; Santa-Rosa *et al.*, 2016). Each experiment unit consisted of three plants. Each location had nine plants of each variety per treatment, for a total of 18 plants of the two varieties in each treatment. Disease progress was monitored on all the leaves of each of the 72 plants per location.

The infection caused by *H. vastatrix* occurred naturally. The first signs and symptoms were observed by inspecting the leaves with a 40 X magnifying glass and under a stereoscopic and compound microscope (SENASICA, 2019). The disease progress was monitored by conducting seven evaluations and estimating the following variables (Campbell and Neher, 1994): 1) Incidence,

**Cuadro 1. Biofungicidas evaluados para el control de la roya del café en Huehuetla, Puebla.**  
**Table 1. Biofungicides evaluated to control coffee rust in Huehuetla, Puebla.**

| Biofungicida | Nombre comercial | Composición   | Dosis aplicada          |
|--------------|------------------|---|-------------------------|
| BA+AI+SA     | Roya Out®        | 50% de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> ufc mL <sup>-1</sup> ), 2.5% de <i>Azadirachta indica</i> , 2.5% de <i>Syzygium aromaticum</i> | 1.5 L ha <sup>-1</sup>  |
| AI           | Biogeneser®      | <i>Azadirachta indica</i>   | 2.0 L ha <sup>-1</sup>  |
| MA           | Timorex Gold®    | 23.8% de aceite de <i>Melaleuca alternifolia</i> , equivalente a 222.5 g de i.a. L <sup>-1</sup>  | 1.5 L ha <sup>-1</sup>  |
| TE           | -----            | -----   | Testigo, sin aplicación |

La aplicación de los biofungicidas se realizó con aspersoras manuales de mochila (Antarix modelo AS-18) con boquilla de abanico, cada 22 días (A1= 06 de abril, A2= 28 de abril y A3=20 de mayo), con un total de tres aplicaciones. Las dosis corresponden a la recomendación del fabricante / The biofungicides were applied every 22 days (A1= 06 April, A2= 28 April and A3=20 May) using manual backpack sprayers (Antarix model AS-18) with a fan nozzle. A total of three applications were made. The doses were applied following the manufacturer's recommendations.

al., 2012). En la parcela grande se establecieron las localidades (3), en la mediana los tratamientos con y sin biofungicida (4), mientras que en las parcelas chicas estuvieron las variedades (Garnica y Typica) (2) (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012; Santa-Rosa *et al.*, 2016). Cada unidad experimental estuvo constituida por tres plantas; en cada localidad se contó con nueve plantas por tratamiento en cada variedad, considerando las dos variedades se tuvieron 18 plantas en cada tratamiento. Se dio seguimiento al progreso de la enfermedad en 72 plantas por localidad, en todas las hojas de cada planta.

La infección por *H. vastatrix* se produjo de manera natural; la confirmación de los primeros signos y síntomas fue mediante la inspección de hojas con una lupa de 40 X y observaciones en el microscopio estereoscópico y compuesto (SENASICA, 2019). Se dio seguimiento al progreso de la enfermedad mediante siete evaluaciones y la estimación de las siguientes variables (Campbell y Neher, 1994): 1) Incidencia, calculada como el porcentaje de hojas enfermas respecto al total de hojas por planta; 2) Severidad en hoja, calculada como el porcentaje de área foliar dañada en cada hoja de la planta mediante una escala diagramática (SINAVEF, 2013);

calculated as the percent of infected leaves compared to the total of leaves per plant; 2) severity in leaves, calculated as the percent of damaged foliar area on each leaf using a diagrammatic scale (SINAVEF, 2013); 3) total severity, evaluated based on the average severity observed on each leaf of the plant, on each evaluation date.

The disease was evaluated two days after the first application (dpa), at eight dpa, 16 dpa, 29 dpa, 36 dpa, 43 dpa and at 51 dpa. Based on the total severity values, the area under the disease progress curve was estimated (AUDPC) (Simko and Piepho, 2012) by the following equation:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

AUDPC

Where:

Y<sub>i</sub>= disease intensity

t= evaluation period (time)

n= number of evaluations

The incidence and severity data were subjected to a validation of assumption of normality using Shapiro-Wilk's test and homogeneity of variance

3) Severidad total, evaluada mediante el promedio de la severidad observada en cada una de las hojas en la planta, en cada fecha de evaluación.

La evaluación de la enfermedad se realizó a los dos días después de la primera aplicación (dpa), a los ocho dpa, 16 dpa, 29 dpa, 36 dpa, 43 dpa y a los 51 dpa. Con los valores de severidad total se estimó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Simko y Piepho, 2012) expresada en la siguiente ecuación:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

$Y_i$  = intensidad de la enfermedad

$t$  = periodo de evaluación (tiempo)

$n$  = número de evaluaciones

Los datos de incidencia y severidad se sometieron a la comprobación de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Zar, 1999). Al no resultar datos normales, los porcentajes de incidencia y severidad fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual. Los datos transformados fueron sometidos a un análisis de varianza con el procedimiento ANOVA en el paquete estadístico SAS versión 9.4 (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina) para identificar las diferencias entre localidades y tratamientos, así como las interacciones. Adicionalmente, se realizaron análisis de varianza por cada fecha de evaluación. Las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0.05$ ) (Steel y Torrie, 1985). El análisis incluyó el ANOVA del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con base en la severidad estimada a partir de los datos transformados, así como la estimación de la tasa de infección

using Levene's test (Zar, 1999). Since the tests indicated that the data were not normal, the incidence and severity percents were converted to the arcsine square root of the percent value. The transformed data were subjected to an analysis of variance using ANOVA with the SAS statistical program version 9.4 (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina) to identify the differences between locations and treatments, as well as the interactions. In addition, analyses of variance were conducted for each evaluation date. The means were compared using Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ) (Steel and Torrie, 1985). The analysis included ANOVA of the area under the disease progress curve (AUDPC) based on the severity which was estimated using the transformed data, as well as the estimation of the apparent infection rate with the transformed percentages of infected foliar area using  $\ln(x/(1-x))$  and considering the time during which the disease was monitored (APS, 2019).

Statistically significant differences ( $p \leq 0.01$ ) among locations and biofungicides were observed for both rust incidence and severity. However, there were no differences in the rust incidence among the varieties, although the analysis of variance showed differences in severity (Table 2). At two dpa, the control plants and the plants treated with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* showed 9.5% and 8.7% incidence values, respectively, followed by the plants that were treated with *A. indica* (14.2%) and *M. alternifolia* (18.9%) (Figure 1A). This pattern was also observed at eight dpa and was more associated with natural expression of the disease on aggregation spots than to the effect of the biofungicides (Quiñones-Valdéz *et al.*, 2015). Starting at 16 dpa, the incidence levels increased in all the treatments, but no significant differences were detected. However, the apparent infection rate ( $r$ ) made it possible to differentiate the level of the

aparente con la transformación de los porcentajes del área foliar dañada mediante  $\ln(x/(1-x))$  y considerando el tiempo de seguimiento de la enfermedad (APS, 2019).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre localidades y biofungicidas ( $p \leq 0.05$ ) tanto para la incidencia de la roya como para la severidad. Sin embargo, no se observaron diferencias entre variedades respecto a la incidencia de la roya, aunque el análisis de varianza indicó diferencias para la severidad (Cuadro 2). A los dos dpa las plantas testigo y las tratadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* tuvieron valores de incidencia de 9.5% y 8.7%, respectivamente, seguidas de las plantas tratadas con *A. indica* (14.2%) y *M. alternifolia* (18.9%) (Figura 1A). Este patrón se observó también a los ocho dpa

disease progress between 8 dpa and 16 dpa in each treatment, where the highest rate of infection was observed in plants that were sprayed with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* ( $r=0.16$ ), followed by the control ( $r=0.14$ ), by plants treated with *A. indica* ( $r=0.08$ ) and by plants treated with *M. alternifolia* ( $r=0.04$ ). This indicates that the biofungicide based on *M. alternifolia* reduced the disease progress compared to the other treatments.

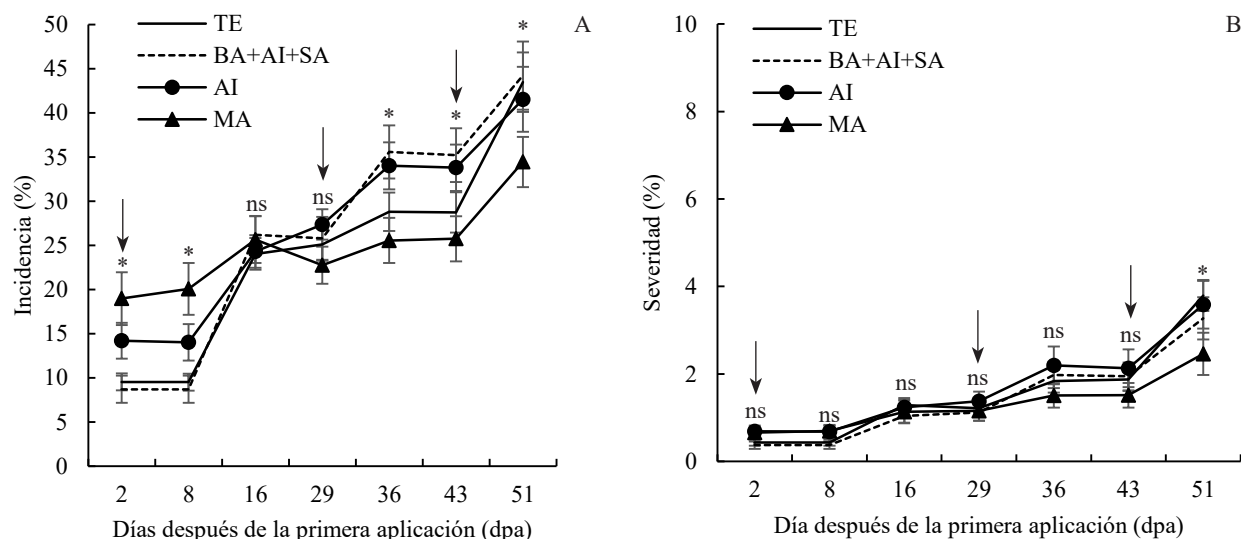
Starting at 29 dpa and up to 51 dpa, the plants treated with *M. alternifolia* had the lowest level of rust incidence ( $p \leq 0.05$  on each evaluation date) compared to the other treatments. This behavior was observed in both varieties and could have been caused by the accumulated effect of the first and second biofungicide applications. At 51 dpa, the incidence in plants treated with *M. alternifolia*

**Cuadro 2. Efecto de tres biofungicidas sobre la incidencia y severidad en dos variedades de café en tres localidades de Huehuetla, Puebla.**

**Table 2. Effect of three biofungicides on the disease incidence and severity on two coffee varieties at three locations in Huehuetla, Puebla.**

| FV           | GL | INC       | SEV     |
|--------------|----|-----------|---------|
| LOC          | 2  | 1407.7 ** | 51.9**  |
| REP (LOC)    | 4  | 5.8 ns    | 3.6 ns  |
| BIO          | 3  | 113.8 *   | 19.7 *  |
| LOC*BIO      | 6  | 71.7 ns   | 16.7 ns |
| REP*BIO(LOC) | 18 | 29.3 ns   | 5.4 ns  |
| VAR          | 1  | 104.8 ns  | 45.9 *  |
| LOC*VAR      | 2  | 18.8 ns   | 3.6 ns  |
| BIO*VAR      | 3  | 22.5 ns   | 9.9 ns  |
| LOC*BIO*VAR  | 6  | 47.8 ns   | 12.5 ns |
| Error        | 23 | 34.9      | 7.2     |

La incidencia y severidad se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis. ns= no significativo; \*=significativo ( $p \leq 0.05$ ); \*\*=altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ). FV=Fuente de variación; GL=grados de libertad; INC=incidencia; SEV=severidad; LOC=Localidad; REP=repeticón; BIO=Biofungicida; VAR=variedad / The incidence and severity were transformed to the arcsine square root before the analysis. ns= not significant; \*=significant ( $p \leq 0.05$ ); \*\*=highly significant ( $p \leq 0.01$ ). FV=Source of variation; GL=degrees of freedom; INC=incidence; SEV=severity; LOC=Location; REP=replication; BIO=Biofungicide; VAR=variety.



**Figura 1.** Progreso de la roya causada por *Hemileia vastatrix* en plantas jóvenes de cafeto tratadas con biofungicidas en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla. A) Incidencia, B) Severidad total. La incidencia y severidad total se compararon estadísticamente con valores transformados (\* =  $p \leq 0.05$ ; ns=no significativo). En la figura se presentan valores no transformados. La flecha indica el momento de la aplicación de fungicida. TE=Testigo, AI= *Azadirachta indica*, MA=*Melaleuca alternifolia* y BA+AI+SA= *Bacillus subtilis* + *A. indica* + *Syzygium aromaticum*. Las barras representan el error estándar de la media en cada evaluación.

**Figure 1.** Progress of rust caused by *Hemileia vastatrix* in young coffee plants treated with biofungicides in the field, in Huehuetla, Puebla. A) Incidence, B) Total severity. Total incidence and severity were statistically compared by using the transformed values (\* =  $p \leq 0.05$ ; ns=not significant). The figure shows the non-transformed values. The arrow indicates the time when the fungicide was applied. TE=Control, AI= *Azadirachta indica*, MA=*Melaleuca alternifolia* and BA+AI+SA= *Bacillus subtilis* + *A. indica* + *Syzygium aromaticum*. The bars represent the standard error of the mean of each evaluation.

y estuvo más asociado a la expresión natural de la enfermedad en focos de agregación que al efecto de los biofungicidas (Quiñones-Valdéz *et al.*, 2015). A partir de los 16 dpa, los niveles de incidencia incrementaron en todos los tratamientos, pero no se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, la tasa de infección aparente ( $r$ ) permitió diferenciar el nivel de avance de la enfermedad entre los ocho dpa y 16 dpa en cada tratamiento, donde la mayor tasa de infección se observó en las plantas asperjadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* ( $r=0.16$ ), seguidas del testigo ( $r=0.14$ ), las tratadas con *A. indica* ( $r=0.08$ ) y las tratadas con *M. alternifolia* ( $r=0.04$ ). Lo anterior indica que el biofungicida elaborado con *M. alternifolia* disminuyó el avance de la enfermedad en comparación con los demás tratamientos.

was 34.4%, while the incidence in the controls was 43.5%; the differences in the final incidence between the control plants and the plants sprayed with *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* (44.2%) and *A. indica* (41.5%) were not significant (Figure 1A).

These results indicate that the application of the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced the infection caused by the fungus on leaves and at the plant level at the three locations. Similar results were reported by Borges *et al.* (2012), who observed a lower level of coffee rust incidence when they applied essential *M. alternifolia* oils compared to the controls and the plants sprayed with *A. indica*. Regarding the total severity, starting at 16 dpa and up to 51 dpa, the plants treated with *M. alternifolia* showed a lower level of severity with values of less



A partir de los 29 dpa y hasta los 51 dpa, las plantas tratadas con *M. alternifolia* fueron las que presentaron la menor incidencia de roya ( $p \leq 0.05$ , en cada fecha de evaluación) en comparación con los otros tratamientos. Este comportamiento se observó en ambas variedades y pudo deberse al efecto acumulado de la primera y segunda aplicación de este biofungicida. A los 51 dpa la incidencia de las plantas tratadas con *M. alternifolia* fue de 34.4%, mientras que en las plantas testigo fue de 43.5%; mientras que las diferencias en la incidencia final entre las plantas testigo y las asperjadas con *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* (44.2%) y *A. indica* (41.5%) no fueron significativas (Figura 1A).

Estos resultados, indican que la aplicación del biofungicida formulado con *M. alternifolia* redujo la infección del hongo entre las hojas y a nivel de planta en las tres localidades. Resultados similares fueron reportados por Borges *et al.* (2012), quienes observaron una reducción de la incidencia de la roya del cafeto al aplicar aceites esenciales de *M. alternifolia* en comparación a las plantas testigo y a las plantas asperjadas con *A. indica*. Respecto a la severidad total, a partir de los 16 dpa y hasta los 51 dpa las plantas tratadas con *M. alternifolia* presentaron menor severidad, con valores menores a 2.5%. Mientras que las plantas tratadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum*, así como las tratadas con *A. indica* y el testigo alcanzaron severidades entre 3.2 y 3.8%. Las diferencias de los valores de severidad entre tratamientos no fueron significativas desde los 2 dpa y hasta los 43 dpa. Sin embargo, en la última evaluación (51 dpa), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), donde las plantas testigo alcanzaron los mayores valores de severidad (3.8%), seguidas de las plantas tratadas con *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* y las tratadas con *A. indica* con severidades de 3.3% y 3.6% respectivamente, los que a su vez fueron iguales estadísticamente

than 2.5%. The plants treated with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum*, and the plants treated with *A. indica* and the control plant had 3.2 and 3.8% severity. The differences in the severity values among treatments were not significant from 2 dpa and up to 43 dpa. However, in the last evaluation (51 dpa), significant differences were observed among the treatments ( $p \leq 0.05$ ), because the control plants reached the highest severity values (3.8%), followed by the plants treated with *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* and the plants treated with *A. indica* that had 3.3% and 3.6% severity, respectively; these were, in turn, statistically the same ( $p \leq 0.05$ ), while the plants treated with *M. alternifolia* had the lowest percent of damaged foliar area (2.5%) (Figure 1B).

These results are in agreement with the results documented by Borges *et al.* (2012), who reported that *M. alternifolia* was more effective in reducing disease progress than *A. indica*, while Haddad *et al.* (2009) reported a lower level of disease intensity when applying *Bacillus* sp. isolates. Medice *et al.* (2007) reported 35.0-62.0% reduction in Asian rust severity (*Phakopsora pachyrhizi*) in different varieties that were treated with essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), citronella (*Cymbopogon nardus*), eucalyptus (*Corymbia citriodora*) and neem (*Azadirachta indica*). In our experiments, the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced *H. vastatrix* incidence by 20.9% compared to the control plants. *M. alternifolia*, *A. indica* y *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* reduced the disease severity by 35.1%, 5.5% and 13.7%, respectively, compared to the severity in the control plants. Borges *et al.* (2012) obtained similar results where the incidence and severity was reduced by 12.1% and 55.4%, respectively, using essential tea tree oils (*M. alternifolia*). No statistically significant differences were found in the severity of the plants that were sprayed with essential neem oil (*A. indica*)

( $p \leq 0.05$ ), mientras que las plantas tratadas con *M. alternifolia* tuvieron los menores porcentajes de área foliar dañada (2.5%) (Figura 1B).

Estos resultados coinciden con lo documentado por Borges *et al.* (2012), quienes reportaron una mayor eficiencia de *M. alternifolia* en la disminución del progreso de la enfermedad en comparación con *A. indica*, mientras que Haddad *et al.* (2009) reportaron una disminución de la intensidad de la enfermedad mediante la aplicación de aislamientos de *Bacillus* sp. Medice *et al.* (2007) reportaron una reducción del 35.0% al 62.0% de la severidad de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en diferentes variedades tratadas con aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) y neem (*Azadirachta indica*). En nuestros experimentos, el biofungicida elaborado con *M. alternifolia*, redujo 20.9% la incidencia de *H. vastatrix* respecto a las plantas testigo. *M. alternifolia*, *A. indica* y *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* redujeron la severidad de la enfermedad 35.1%, 5.5% y 13.7% respectivamente, en comparación con la severidad de las plantas testigo. Borges *et al.* (2012) encontraron resultados similares, donde la incidencia y la severidad se redujo 12.1% y 55.4%, respectivamente, al utilizar aceites esenciales del árbol del té (*M. alternifolia*); no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la severidad de las plantas asperjadas con aceite esencial de neem (*A. indica*) y el testigo. En estos experimentos la aplicación de *M. alternifolia* limitó el progreso de la enfermedad e infección del hongo, pero no evitó incrementos en el tiempo.

El análisis de varianza del ABCPE con base en la severidad y de la tasa de infección aparente indicó diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). Aunque el biofungicida elaborado con *M. alternifolia* disminuyó el progreso de la enfermedad, la prueba de medias no indicó diferencias significativas respecto al testigo, lo cual pudo de-

regarding the control plants. In these experiments, the application of *M. alternifolia* limited the disease progress and fungal infection but did not prevent increases over time.

The analysis of variance of AUDPC based on the severity and the apparent infection rate indicated significant differences among treatments ( $p \leq 0.05$ ). Although the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced the disease progress, the mean comparison test did not show significant differences regarding the control, which could be due to a variation in the levels of severity recorded during the first evaluations as a result of the initial infection process and the recent application of the biofungicide. The comparison of the AUDPC means indicated that the application of *A. indica* did not limit the disease progress and that it was even higher than that of the control (Table 3). However, the means test conducted on the apparent infection rate indicated significant differences among treatments ( $p \leq 0.05$ ), where *M. alternifolia* had the lowest infection rate ( $r=0.028$ ), while the control had the highest value ( $r=0.046$ ). In percentage terms, the reduction in the apparent infection rate compared to that of the control was 39.1% with *M. alternifolia*.

Haddad *et al.* (2009) reported that the application of *Bacillus* sp. was effective in controlling *H. vastatrix*. They also mentioned that certain isolates did not show significant differences due to unfavorable environmental conditions for this biological control agent. It is likely that the response of the isolate in the formulation of the biofungicide based on *Bacillus* sp. was caused by its low adaptative ability to the environmental conditions at the experiment sites. This means that formulations must be prepared with isolates obtained from each coffee producing area, since using commercial formulations made from microorganisms to control the disease can lead to lower effectiveness caused by the effect of the environmental conditions in each area.

berse a la variación en los niveles de severidad registrados en las primeras evaluaciones, como resultado del proceso de infección inicial y de la reciente aplicación del biofungicida. La comparación de medias del ABCPE indicó que la aplicación de *A. indica* no limitó el progreso de la enfermedad e incluso fue superior al testigo (Cuadro 3). Sin embargo, la prueba de medias realizada con la tasa de infección aparente indicó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), donde *M. alternifolia* tuvo la menor tasa de infección ( $r=0.028$ ), mientras que el testigo tuvo el mayor valor ( $r=0.046$ ); en términos porcentuales la reducción de la tasa de infección aparente con respecto al testigo fue 39.1% con *M. alternifolia*.

Haddad *et al.* (2009) reportaron que la aplicación de *Bacillus* sp. fue efectiva para el control de *H. vastatrix*; también mencionaron que ciertos aislamientos no presentaron diferencias significativas debido a condiciones ambientales desfavorables para este agente de control biológico. Es probable que la respuesta del aislamiento en la formulación del biofungicida a base de *Bacillus* sp. se deba a su baja adaptabilidad a las condiciones ambientales de los sitios experimentales. Esto evidencia la nece-

The incidence and severity had significant differences among locations ( $p < 0.01$ ). The Chilocoyo location had the highest final disease incidence and severity values, while Lipuntahuaca had the lowest level of incidence and severity (Figure 2). Plants of the Garnica variety had 29.0% to 55.0% incidence, while the plants of Typica had 24.7% to 48.2% incidence. According to the analysis of variance, Typica and Garnica varieties had no significant differences in the incidence in each of the locations (Figure 2A). Regarding the average severity, the Typica variety reached values between 1.7% and 3.5%, while the Garnica variety had values between 2.9% and 4.8%. These varieties had significant differences in severity only in the Lipuntahuaca location ( $p \leq 0.01$ ), where the Garnica variety was more susceptible to the disease (Figure 2B). According to reports from the Coffee Rust Surveillance Program, varieties Garnica and Typica have been the most severely affected compared to other varieties such as Geisha, Costa Rica and Catimor (PVEF-CAFETO, 2018). The disease was not eradicated with the use of biofungicides, but the applications of *M. alternifolia* reduced the infection caused by the fungus at the

**Cuadro 3. Efecto de la aplicación de biofungicidas en el área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPE) y tasa de infección aparente (r) de la severidad de la roya del cafeto en plantas jóvenes establecidas en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla.**

**Table 3. Effect of the application of biofungicides on the area under the disease progress curve (AUDPC) of the severity and apparent infection rate (r) of coffee rust in young plants established in the field in Huehuetla, Puebla.**

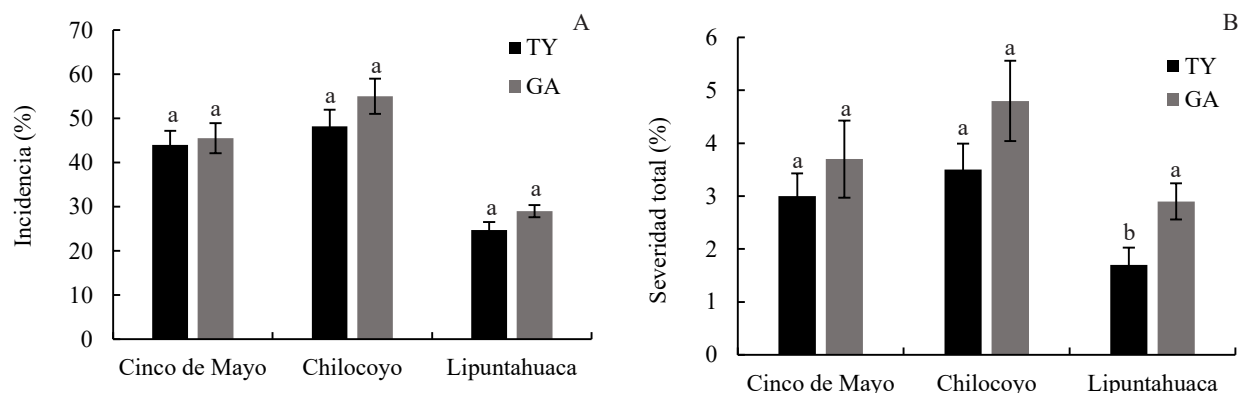
| Tratamiento   | ABCPE   | r        |
|---|---------|----------|
| Testigo (TE)  | 72 ab*  | 0.046 a  |
| <i>B. subtilis</i> + <i>A. indica</i> + <i>S. aromaticum</i> (BA + AI+SA) | 67.3 ab | 0.046 a  |
| <i>Azadirachta indica</i> (AI)  | 79.3 a  | 0.033 ab |
| <i>Melaleuca alternifolia</i> (MA)  | 61.8 b  | 0.028 b  |

\* Valores con la misma letra en la misma columna son iguales estadísticamente (Duncan,  $p \leq 0.05$ ) ♦ Values with the same letter in the same column are statistically the same (Duncan,  $p \leq 0.05$ ).

sidad de generar formulaciones con aislamientos obtenidos en cada zona cafecultora, ya que el control de la enfermedad mediante formulaciones comerciales a base de microorganismos puede llevar a una baja eficiencia en el control por efecto de las condiciones ambientales de cada zona.

La incidencia y severidad presentaron diferencias significativas entre localidades ( $p < 0.01$ ); en la localidad de Chilocoyo se presentaron los mayores valores de incidencia y severidad final de la enfermedad, mientras que la localidad de Lipuntahuaca tuvo la menor incidencia y severidad (Figura 2). Las plantas de la variedad Garnica tuvieron una incidencia en el rango de 29.0% a 55.0% mientras que en las plantas de la variedad Typica los valores estuvieron en el rango de 24.7% a 48.2%; de acuerdo con el análisis de varianza, las variedades Typica y Garnica no presentaron diferencias significativas en los niveles de incidencia en cada una de las localidades (Figura 2A). Respecto a la severidad promedio, la variedad Typica alcanzó valores entre 1.7% y 3.5%, mientras que la variedad Garnica tuvo

plant level. They also showed a tendency to reduce the disease after two applications; that is, 29 days after the first application; also although it did not prevent an increase, it was the treatment with the lowest apparent infection rate ( $r=0.028$ ,  $p \leq 0.05$ ). By using *M. alternifolia*, the percentage of disease reduction compared to the control, at the end of the evaluation, was 20.9% for incidence, 35.4% for severity, 14.2% for AUDPC and 39.1% for apparent infection rate. The Typica and Garnica varieties did not show significant differences in *H. vastatrix* incidence and severity, except in the Lipuntahuaca location, where the Garnica variety had the highest level of foliar damage. The use of *M. alternifolia* extracts to control rust in young coffee plants could be combined with integrated management practices as a compatible alternative aligned with the principles of sustainable organic coffee production. However, these results suggest that further research must be done, considering better inoculum control, alternative doses, reproductive-age plants and periods of higher regional epidemic intensity.



**Figura 2.** Comportamiento de la roya del café en plantas jóvenes de dos variedades evaluadas por localidad en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla. A) Incidencia, B) Severidad. La incidencia y severidad se compararon estadísticamente con valores transformados. En las barras se presentan valores no transformados. TY=Typica, GA=Garnica. Barras con la misma letra en la misma localidad son estadísticamente iguales (Duncan,  $p \leq 0.05$ ). Las barras representan el error estándar de la media en cada evaluación.

**Figure 2.** Behavior of coffee rust in young plants of two varieties evaluated per location in the field in Huehuetla, Puebla. A) Incidence, B) Severity. The incidence and severity were statistically compared using transformed values. The bars show non transformed values. TY=Typica, GA=Garnica. Bars with the same letter in each locality are statistically the same (Duncan,  $p \leq 0.05$ ). The bars represent the standard error of the mean at each evaluation.

valores entre 2.9% y 4.8%. Estas variedades tuvieron diferencias significativas en la severidad únicamente en la localidad de Lipuntahuaca ( $p \leq 0.01$ ), donde la variedad Garnica fue más susceptible a la enfermedad (Figura 2B). De acuerdo con lo reportado en los informes del Programa de Vigilancia de la Roya del Cafeto las variedades Garnica y Typica son las que han sido mayormente afectadas por la roya en comparación con otras variedades como Geisha, Costa Rica y Catimor (PVEF-CAFETO, 2018).

La enfermedad no se erradicó con el uso de los biofungicidas, sin embargo, las aplicaciones de *M. alternifolia* disminuyeron la infección del hongo causante de la roya del cafeto a nivel de planta; además mostraron una tendencia a disminuir el progreso de la enfermedad después de dos aplicaciones, es decir, a los 29 días después de la primera aplicación; aunque no evitó que se incrementara fue el tratamiento con la menor tasa de infección aparente ( $r=0.028$ ,  $p \leq 0.05$ ). Al utilizar *M. alternifolia*, el porcentaje de reducción de la enfermedad con respecto al testigo, al final de la evaluación, fue 20.9% para la incidencia, 35.4% para la severidad, 14.2% en el ABCPE y 39.1% en la tasa de infección aparente. Las variedades Typica y Garnica no presentaron diferencias significativas en la incidencia y severidad de *H. vastatrix*, excepto en la localidad de Lipuntahuaca donde la variedad Garnica tuvo mayor daño foliar debido a la roya. El uso de extractos de *M. alternifolia* para el control de la roya en plantas jóvenes de cafeto podría combinarse con prácticas de manejo integrado, como una alternativa compatible con los principios de la producción sustentable de café orgánico. Sin embargo, estos resultados sugieren que la investigación debe continuar, considerando un mayor control de inóculo, dosis alternativas, plantas en edad productiva y periodo de mayor intensidad epidémica regional.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Programa para el Desarrollo Profesional Docente, for the superior type (PRODEP), for funding this research. And to coffee growers for their cooperation.

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el tipo Superior (PRODEP) por el financiamiento de la investigación. A los cafeticultores por su colaboración.

## LITERATURA CITADA

- APS. 2019. Modelos del progreso de la enfermedad. The American Phytopathological Society. (Consulta, mayo de 2019. <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Epidemiologia/Pages/ModelosProgreso.aspx>)
- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska AJ, Morales C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): Impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7:303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Benitez-García E, Jaramillo-Villanueva JL, Escobedo-Garrido S, Mora-Flores S. 2015. Caracterización de la producción y del comercio de café en el municipio de Cuetzalan, Puebla. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 12:181–198. <https://www.colpos.mx/asyd/volumen12/numero2/asd-13-098.pdf>
- Borges PR, Ciavareli LG, José PF, Alves E. 2012. Essential oils for rust control on coffee plants. *Ciência Agro-tecnologia* 36:16–24. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000100002>
- Campbell CL, Neher DA. 1994. Estimating Disease Severity and Incidence. In: Campbell CL and Benson DM. (eds.). *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg. 339 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9_5)
- Carrión G y Rico-Gray V. 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11: 49–60. [http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD\\_11\\_49-60.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_11_49-60.pdf)
- Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villanueva GLL, Hernández-Leal TI. 2018. Selection in vitro of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36:172–183. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-1>



- Haddad F, Maffia LA, Mizubuti ESG, Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49:114-119. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>
- Ibañez M y Blackman A. 2016. Is eco-certification a win-win for developing country agriculture? *Organic coffee certification in Colombia*. *World Development*. 82:14-27. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2016.01.004>
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Huehuetla, Puebla. Clave geoestadística 21072. INEGI. México. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/21/21072.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21072.pdf)
- Medice R, Alvez E, Tadeu de Assis R, Goulard RMJ, Leite EAGL. 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciencia e Agrotecnologia* 31:83-90. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100013>
- PVEF-CAFETO, Programa de Vigilancia Epidemiológico Fitosanitario del Cafeto. 2018. *Reporte roya del cafeto*. <http://www.royacafe.lanref.org.mx> (Consulta, junio 2018).
- Quiñones-Valdéz R, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildozola A, Cristóbal de la Cruz M. 2015. Comportamiento espacial de la roya transversal del gladiolo en Jiquipilco, Estado de México, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:247-255. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3322015/NF/NF4.pdf>
- SAGARPA. 2017. *Planeación agrícola nacional 2017-2030. Café mexicano*. 20 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)
- Santa-Rosa RH, Espitia RE, Martínez-Cruz E, Villaseñor-Mir H, Huerta-Espino J, Mariscal-Amaro LA. 2016. Productividad y calidad industrial de trigos harineros en relación a enfermedades. *Agrociencia* 50:1027-1039. <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2016/nov-dic/art-7.pdf>
- SENASICA. 2019. *Roya del caféto (Hemileia vastatrix Berkeley & Broome)*. Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. Ficha técnica No. 46. 16 p. [http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha\\_Tecnica\\_Roya\\_del\\_cafeto.pdf](http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha_Tecnica_Roya_del_cafeto.pdf)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. *Cierre de la producción agrícola*: <http://www.siap.gob.mx/> (Consulta, mayo 2018).
- Silva JL, Souza PE, Monteiro FP, Freitas MLO, Silva Júnior MB, Belan LL. 2014. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16:539-544. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_155](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_155)
- Simko I and Piepho HP. 2012. The area under the disease progress stairs: Calculation, advantage, and application. *Phytopathology* 102:381- 389. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0216>
- SINAVEF, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 2013. *Ficha técnica roya del caféto Hemileia vastatrix*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, D. F. 25 p.
- Steel RGD y Torrie JH. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana. Bogotá, Colombia. 622 p.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimaraes L, Várzea V, Do Céu Silva M. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18:1039-1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Villaseñor-Mir HE, Hortelano SRR, Martínez CE, Mariscal AL, Leyva MSG, Huerta EJ. 2012. Control químico de las enfermedades: una alternativa para la producción de trigo de temporal en Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:595-600. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263123205014>
- Zambolim L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 41:1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zar JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. USA: Prentice Hall. University of Michigan.

# Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*)

## Diversidad de bacterias endófitas asociadas a plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Rosa M. Longoria-Espinoza\*, <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave, Departamento de Ciencias Biológicas, Avenida Universidad s/n, CP 81120. Guasave, Sinaloa, México; Rubén Félix-Gastélum, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Bulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, CP 81223. Los Mochis, Sinaloa; Jesús D. Cordero-Ramírez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia: rosamarialongoria@hotmail.com.

Recibido: 28 de Febrero, 2020.

Aceptado: 19 de Abril, 2020.

Longoria-Espinoza RM, Félix-Gastélum R and Cordero-Ramírez JD. 2020. Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 307-319.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-7

Primera publicación DOI: 25 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 25, 2020.

**Resumen.** En este estudio se propuso como objetivo identificar las bacterias endófitas aisladas de plantas de jitomate y caracterizarlas en función de propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Se realizaron recolectas de plantas de jitomate asintomáticas de la variedad Missouri. Los tejidos (raíz, tallo y hojas) fueron esterilizados superficialmente, se maceraron y se establecieron en agar nutritivo. Adicionalmente, se sembraron semillas *in vitro* (THB y SUN6366) y del tejido se realizó el mismo procedimiento. Con los aislados bacterianos obtenidos, se analizaron algunas actividades promotoras de crecimiento vegetal (producción de sideróforos,

**Abstract.** In this study, the objective was to identify the endophytic bacteria isolated from tomato plants and characterize them based on properties that promote plant growth. Collections of asymptomatic tomato plants of the Missouri variety were carried out. The tissues (root, stem and leaves) were superficially sterilized, macerated and seeded in nutrient agar. Additionally, seeds were sown *in vitro* (THB and SUN6366) and the same procedure was performed on the tissue. With the obtained bacterial isolates, some plant growth promoting activities were analyzed (production of siderophores, chitinase and phosphate solubilization). The bacteria obtained were morphologically identified and sequenced. 25 isolates were obtained: 10 *in vitro* (50 plants) and 15 field (20 plants). Seven axenic isolates (one *in vitro* and six field isolates) were molecularly identified as *Methylobacterium radiotolerans*, *Shinella* sp., *Burkholderia cepacia*, *Sphingobium herbicidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Achromobacter xylosoxidans* and *Rhizobium radiobacter*. *Methylobacterium* isolated *in vitro*, without

quitinasa y solubilización de fosfato). Las bacterias obtenidas se identificaron morfológicamente y secuenciaron. Se obtuvieron 25 aislados: 10 *in vitro* (50 plantas) y 15 de campo (20 plantas). Siete aislados axénicos (uno *in vitro* y seis de campo) se identificaron molecularmente como *Methylobacterium radiotolerans*, *Shinella* sp., *Burkholderia cepacia*, *Sphingobium herbicidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Achromobacter xylooxidans* y *Rhizobium radiobacter*. *Methylobacterium* aislado *in vitro*, sin reportes en plantas de jitomate. Aproximadamente el 86% de los aislados mostraron al menos una actividad benéfica, relacionada con el crecimiento y salud de las plantas. *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Rhizobium* presentaron alta capacidad fosfato-solubilizadora. Estos resultados permiten suponer que las bacterias endófitas en jitomate muestran potencial para ser utilizadas como bioinoculantes en otros cultivos de importancia agrícola.

**Palabras clave:** Endófitos bacterianos, *Methylobacterium*, sideróforos, *Rhizobium*, promotores de crecimiento.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) se encuentra entre las hortalizas de mayor producción en el mundo. México ocupa el décimo lugar en producción y el estado de Sinaloa se ha consolidado como el primer productor de jitomate; representando aproximadamente la tercera parte de la producción nacional, situación que es reconocida a nivel internacional (SAGARPA, 2018). Por lo que, actualmente el manejo de producción se ha centrado en el desarrollo seguro, ecológico, duradero y eficaz; debido a la importancia, muchos investigadores se han enfocado a conocer más respecto a los microorganismos que se encuentran presentes en el torrente del floema de las plantas (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018). En la agricultura moderna, las bacterias

reports in tomato plants. Approximately 86% of the isolates showed at least one beneficial activity, related to plant growth and health. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Rhizobium* presented high phosphate-solubilizing capacity. These results allow us to suppose that the endophytic bacteria in tomato show potential to be used as bioinoculants in other crops of agricultural importance.

**Key words:** Bacterial endophytes, *Methylobacterium*, siderophores, *Rhizobium*, growth promoter.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most widely grown vegetables in the world. Mexico has the tenth place in production and Sinaloa is the country's main producing state, with approximately one third of all Mexican tomatoes, acknowledged internationally (SAGARPA, 2018). Therefore, current production management has focused on its safe, environmental, long-term and efficient development. Due to their importance, many researchers have focused on learning more about the microorganisms present in the phloem of plants (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018). In modern agriculture, growth-promoting bacteria have great potential. Nowadays, the growth of most vegetables requires the production of vigorous seedlings, an important factor for an adequate development of the fruit (Luna-Martínez *et al.*, 2013). Endophytism is the mutualistic association phenomenon between a plant and a microorganism living within its tissues without causing any disease symptoms, as well as being a biological resource that participates in several crucial functions related to growth, development, tolerance and adaptation to stress (Gundel *et al.*, 2012). However, depending on the availability of nutrients and the metabolic state of the host plant, the response of the long-term

promotoras de crecimiento vegetal tienen un gran potencial, actualmente el cultivo de la mayoría de las hortalizas requiere de la producción de plántulas vigorosas, factor importante para un buen desarrollo del fruto (Luna-Martínez *et al.*, 2013). El endofitismo es el fenómeno de asociación mutualista, de una planta con un microorganismo que vive dentro de los tejidos de esta sin causar ningún síntoma de enfermedad; además de ser un recurso biológico participando en diversas funciones indispensables relacionadas con el crecimiento, desarrollo, tolerancia y adaptación al estrés (Gundel *et al.*, 2012). Sin embargo, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y el estado metabólico de la planta huésped la respuesta de asociación a largo plazo de un endófito puede ser mutualista o antagonista (Eaton *et al.*, 2011).

Lo anterior, ha conducido al estudio de mecanismos indirectos por competencia de espacio y nutrientes (consumo de lixiviados-exudados, producción de sideróforos, inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas y patrones moleculares) (Chowdhury *et al.*, 2015). Diversos trabajos han demostrado que las bacterias endofíticas son capaces de interactuar de una manera muy eficiente con sus hospederos, tales como promoción del crecimiento y protección vegetal contra la infección de fitopatógenos. Nawangsih *et al.* (2011), aislaron bacterias endofíticas utilizando tallos de plantas de jitomate asintomáticas reportando seis cepas con efecto antagonista sobre la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) del jitomate; proponiendo un método de control alternativo para apoyar la agricultura sostenible de esta hortaliza. En la actualidad el interés en la protección al medio ambiente, la implementación de una agricultura sustentable y las diferentes regulaciones internacionales para importar/exportar productos sin agroquímicos demandan mejorar la eficiencia a través del estudio y explotación de los

association of an endophyte may be mutualistic or antagonistic (Eaton *et al.*, 2011).

This has led to the study of indirect mechanisms by competition for space and nutrients (consumption of leachates-exudates, production of siderophores, induction to the systemic response in plants with the production of phytohormones and molecular patterns) (Chowdhury *et al.*, 2015). Several investigations have proven that endophytic bacteria are capable of efficient forms of interaction with their hosts, such as growth promotion and the protection of plants against infections by phytopathogens. Nawangsih *et al.* (2011) isolated endophytic bacteria using asymptomatic tomato plant shoots with six strains, with an antagonistic effect on bacterial wilting (*Ralstonia solanacearum*) of the tomato, thus proposing an alternative control method to support sustainable agriculture of this vegetable. Currently, the interest in environmental protection, the implementation of sustainable agriculture, and different international regulations for the import/export of products without agrochemicals, demand an increase in efficiency by the study and exploitation of the beneficial effects that the endophytic microbiota can provide, and therefore, microorganisms that establish a positive interaction with plants are considered to play an important part in agricultural systems (Sánchez-Bautista *et al.*, 2017). Having stated this, the aim of this investigation was to identify the endophytic bacteria isolated from tomato plants and to characterize them based on the plant growth promoting properties.

In order to carry out the study, tomato plants of the variety Missouri were gathered during the 2017-2018 planting season in plots of the fields of the Gabriel Leyva Solano Ejido, located in the Municipality of Guasave in the state of Sinaloa, Mexico (25° 39' 50 latitude north and 108° 38' 18 longitude west). Asymptomatic plants were chosen

efectos benéficos que puede ejercer la microbiota endófito, por lo que se considera que aquellos microorganismos que establecen una interacción positiva con las plantas desempeñan un papel importante en los sistemas agrícolas (Sánchez-Bautista *et al.*, 2017). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar las bacterias endófitas aisladas de plantas de jitomate, y caracterizarlas en función de propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

Para la realización del estudio se recolectaron plantas de jitomate de la variedad Missouri durante la temporada de siembra 2017-2018 en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano localizado en el Municipio de Guasave del estado de Sinaloa, México (25° 39' 50 latitud norte y 108° 38' 18 longitud oeste). Las plantas asintomáticas se eligieron al azar de la superficie sembrada y se trasladaron al laboratorio para su análisis. Por otra parte, basado en la hipótesis de que existe diversidad de endófitos en semillas (Surette *et al.*, 2003) se realizó el establecimiento de plantas de jitomate bajo condiciones *in vitro*. Para ello se utilizaron semillas de dos variedades de jitomate saladette (THB y SUN6366) proporcionadas por una casa comercial. Las semillas se colocaron en papel filtro humedecido con agua estéril y fueron precultivadas tres días bajo condiciones de iluminación natural a 25 °C. Posteriormente se establecieron en medio de sales Murashige y Skoog, sin reguladores de crecimiento y fueron transferidas a una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (22 °C, fotoperiodo de 16 h día<sup>-1</sup> y flujo fotosintético de 225 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

En el caso de los tejidos de raíz, tallo y hojas de plantas recolectadas en campo se lavaron con agua destilada estéril. Para las raíces se retiraron cuidadosamente las partículas adheridas de suelo. Posteriormente, se esterilizaron superficialmente, sumergiendo en etanol al 70% durante 30 segundos, pasado el tiempo se lavaron con solución de

at random from the planted surface, and sent to the laboratory for their analysis. On the other hand, based on the hypothesis that there is a large diversity of endophytes in seeds (Surette *et al.*, 2003), tomato plants were established under *in vitro* conditions. For this, seeds from two saladette tomato varieties (THB and SUN6366) were used, provided by a commercial company. The seeds were placed on filter paper, dampened with sterile distilled water, and they were precultured for three days under natural lighting conditions at 25 °C. Later, they were placed in Murashige and Skoog salt media, without growth regulators, and they were transferred to a growth chamber under controlled conditions (22 °C, photoperiod of 16 h day<sup>-1</sup> and a photosynthetic flow of 225 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

The plant root, shoot and leaf tissues gathered in the field were washed with sterile distilled water. For the roots, the adhered soil particles were carefully removed. They were then superficially sterilized by submersion in ethanol at 70% for 30 seconds and later washed with a sodium hypochlorite solution (2.5%) for 5 min, and ethanol at 70% for 30 s, to finally be washed between five and ten times with sterile distilled water. Next, the plant tissue (foliar, shoot and root) was macerated individually in 20 mL of sterile water, taking 50 µL of a dilution of 10<sup>-4</sup> for each tissue, which were established in nutrient agar in triplicated; for the plants obtained from seeds established *in vitro*, the whole plant was macerated and sown in nutrient agar to obtain and isolate the bacteria.

The Petri dishes were incubated for eight days at 27 °C (Yang *et al.*, 2011). Continuous purification rounds were carried out in the nutrient agar of the bacterial cultures, achieving strains with similar morphological characteristics to perform the culture morphology analysis, which was carried out in a stereoscope of each of the isolations with 48 h growth, where the variables considered were



hipoclorito de sodio (2.5%) durante 5 min, y etanol al 70% durante 30 s, finalmente se lavaron de cinco a 10 veces con agua destilada estéril. Consecutivamente, el tejido vegetal (foliar, tallo y raíz) se maceró de manera individual en 20 mL de agua estéril tomando 50  $\mu$ L de una dilución de  $10^{-4}$  para cada tejido, las cuales fueron establecidas en agar nutritivo por triplicado; para el caso de las plantas obtenidas de las semillas establecidas *in vitro* se maceró la planta completa y se sembraron en agar nutritivo para obtener y aislar las bacterias.

Las cajas Petri se incubaron durante ocho días a 27 °C (Yang *et al.*, 2011). Se realizaron continuas rondas de purificación en medio agar nutritivo de las colonias bacterianas, obteniendo cepas con características morfológicas similares para realizar el análisis de morfología colonial, el cual se llevó a cabo en un estereoscopio de cada uno de los aislados de 48 h de crecimiento; en donde las variables consideradas fueron: tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, aspecto, luz transmitida, consistencia y luz reflejada. Posteriormente, se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de peso fresco para cada tejido; la técnica de tinción de Gram se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial (Golden Bell).

Para la identificación molecular se partió del ADN genómico de siete cepas bacterianas donde se utilizaron los oligonucleótidos F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi *et al.*, 1997), para amplificar el gen que codifica la subunidad 16S del ADNr. El producto se purificó con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System y se envió a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en CINVESTAV-IPN; la homología de las secuencias obtenidas se comparó dentro de la base de datos del GenBank, utilizando el programa Blast del NCBI y RDP. El análisis filogenético del gen 16S del ADNr, se realizó con el

size, color, shape, edges, elevation, surface, aspect, light emitted, consistence and light reflected. Later, the culture-forming units (CFU) were counted per gram of fresh weight for each tissue; the Gram stain technique was carried out following the protocol on the commercial kit (Golden Bell).

For molecular identification, we began with the genomic DNA from seven bacterial strains oligonucleotides F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') and C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi *et al.*, 1997) to amplify the gene that codifies the subunit 16S of the rDNA. The product was purified using the Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-Up System, and it was sent for resequencing to the National Genomics Laboratory for Biodiversity (LANGEBIO) in CINVESTAV-IPN; the homology of the sequences obtained was compared within the GenBank database, using the program Blast of the NCBI and RDP. The phylogenetic analysis of the gene 16S of the rDNA was performed using the software MEGA 5 Beta (Tamura, *et al.*, 2011). The strength of the topology of NJ was evaluated with the bootstrap test, using 1000 replications. The phylogenetic trees were created using the Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987), as well as the Tamura-Nei model. In order to identify potential plant growth-promoting microorganisms, the capabilities of each bacterial isolation were compared, using the strain (B25) *Bacillus cereus* as a control (Figueroa-López *et al.*, 2016); each one of the experiments was carried out in triplicate. For the analysis of the production of siderophores, we used a chrome azurol S (CAS) medium, prepared by following the method described by Schwyn and Neilands (1987). Chitinase production was evaluated with chitin as the only source of carbon, following the method by Shanmugaiah *et al.* (2008). The evaluation of the solubilization of phosphate was carried out on

software MEGA 5 Beta (Tamura *et al.*, 2011). La solidez de la topología de NJ se evaluó mediante la prueba de bootstrap, usando 1000 réplicas. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución de Tamura-Nei. Con la finalidad de identificar potenciales microorganismos promotores de crecimiento vegetal, se compararon de manera cualitativa las capacidades de cada uno de aislados bacterianos utilizando como control positivo la cepa (B25) *Bacillus cereus* (Figueroa-López *et al.*, 2016); y cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. Para el análisis de producción de sideróforos se utilizó medio agar de cromo azurol S (CAS), preparado de acuerdo a la metodología descrita por Schwyn y Neilands (1987). La producción de quitinasas se evaluó, con quitina como única fuente de carbono de acuerdo con la metodología de Shanmugaiah *et al.* (2008). La evaluación de capacidad de solubilización de fosfato, se realizó en placas de agar-Pikosvkaya, se incubaron a 25 °C durante una semana (Pikosvkaya, 1948).

A las diez semanas se obtuvieron 50 plantas de jitomate establecidas *in vitro*, con un crecimiento aproximado de 5 cm. Por otra parte, se recolectaron en campo 20 plantas de jitomate en fase de crecimiento vegetativo y asintomático. Se obtuvieron un total de 25 aislados de bacterias: 10 de *in vitro* y 15 de campo (9 raíz, 4 tallo y 2 tejido foliar); obteniendo siete aislados axénicos (Gram negativo); uno de *in vitro* y seis de campo (4 raíz y 2 tejido foliar) (Cuadro 2); con los cuales se realizaron conteos de unidades formadoras de colonia por gramo de peso fresco ( $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) (Cuadro 1). Los resultados coinciden con lo propuesto por Sørensen y Sessitsch, (2007); donde señalan que la rizosfera es una fuente de adquisición de endófitos para las plantas permitiendo que las bacterias rizosféricas penetren los tejidos internos de las plantas por grietas

agar-Pikosvkaya plates, incubated at 25 °C for one week (Pikosvkaya, 1948).

After ten weeks, 50 tomato plants were established *in vitro*, with an approximate growth of 5 cm. On the other hand, 20 asymptomatic tomato plants in a vegetative growth stage were gathered on the field. A total of 25 bacterial isolations were obtained, 10 from *in vitro* and 15 from the field (9 root, 4 shoots, and 2 foliar tissue), obtaining seven axenic isolations (Gram negative), one from *in vitro* and six from the field (4 root and 2 foliar tissue) (Table 2), which were used to count the culture-forming units per gram of fresh weight ( $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ) (Table 1). The results coincide with the proposal by Sørensen and Sessitsch, (2007), who point out that the rhizosphere is a source of endophytes for plants, helping the rhizospheric bacteria penetrate the internal tissues of plants via cracks in the roots and lesions in tissues that take place as a result of plant growth.

**Cuadro 1. Recuento de bacterias aisladas de plantas de jitomate recolectadas en campo de la variedad Missouri durante la temporada de siembra 2017-2018, en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano localizado en el Municipio de Guasave, Sinaloa, México.**

**Table 1. Count of bacteria isolated from tomato plants gathered on the field of the variety Missouri during planting season 2017-2018, from plots of the field in the Gabriel Leyva Solano Ejido, located in the Municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

| No. de aislados | Tejido | ( $\log_{10}$ UFC $g^{-1}$ ) <sup>2</sup> |
|-----------------|--------|-------------------------------------------|
| 9               | Raíz   | 3.5 <sup>x</sup> ± 0.1c <sup>y</sup>      |
| 2               | Hoja   | 2.2 ± 0.3a                                |
| 4               | Tallo  | 1.5 ± 0.2b                                |

<sup>x</sup> Valores promedio de las tres réplicas por tejido y triplicados de las siembras de cada suspensión (n = 9) / Average values of the three replications by tissue and in triplicate from the cultivations of each suspension (n = 9).

<sup>y</sup> Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) / Different letters in super-script indicate statistically significant differences (p < 0.05).

<sup>2</sup>UFC: unidades formadoras de colonias por gramo de peso fresco, según corresponda / UFC: culture-forming units per gram of fresh weight, as appropriate.

**Cuadro 2. Características de las bacterias relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal aisladas en plantas de jitomate (*in vitro* y campo) recolectadas en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano, Municipio de Guasave, Sinaloa, México.****Table 2. Characteristics of bacteria related with growth promotion in plants, isolated from tomato plants (*in vitro* and field) gathered from plots of the field in the Gabriel Leyva Solano Ejido, Municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

| Cepa                                                    | Origen          | Quitinasa | Sideróforos | Fosfatos |
|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------|-------------|----------|
| <b>Control positivo</b><br>(B25) <i>Bacillus cereus</i> | <b>Maíz</b>     | +         | +           | +        |
| <i>Methylobacterium radiotolerans</i>                   | <b>In vitro</b> | -         | +           | +        |
|                                                         | <b>Campo</b>    |           |             |          |
| <i>Shinella</i> sp.                                     | Foliar          | +         | -           | -        |
| <i>Burkholderia cepacia</i>                             | Raíz            | +*        | +*          | +*       |
| <i>Sphingobium herbicidovorans</i>                      | Raíz            | +         | -           | -        |
| <i>Pseudomonas</i> sp.                                  | Raíz            | +*        | +*          | +*       |
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i>                       | Foliar          | +         | +           | -        |
| <i>Rhizobium radiobacter</i>                            | Raíz            | +*        | +*          | +*       |

\* \*Visualmente produce más que control positivo (B25) *B. cereus* aislado de maíz / \*Visually produces more than positive control (B25) *B. cereus* maize isolation.

de las raíces y heridas de tejidos que ocurren como resultado del crecimiento de la planta.

Por otra parte, se ha reportado que existe una mayor diversidad de filotipos en la rizosfera de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), que la diversidad de endófitos bacterianos (Márquez-Santacruz *et al.*, 2010). La morfología colonial de los aislados presentó pocas diferencias entre sí a las 48 h de crecimiento, caracterizadas por tener color blanco o crema, solo una mostró pigmentos de color rojo brillante, forma circular, borde ondulado, con superficie brillante. La comparación de las secuencias obtenidas del gen 16S ADNr de los siete aislados endófitos contra la base de datos del NCBI, indicó estrechas relaciones con las especies bacterianas identificadas en el GenBank, con identidades mayores al 97% representando a: *Methylobacterium radiotolerans* (NR074244.1), *Shinella* sp. (KF261566.1), *Burkholderia cepacia* (AB162427.1), *Sphingobium herbicidovorans* (NR113843.1), *Pseudomonas* sp. (KR067597.1), *Achromobacter xylosoxidans* (KR136349.1) y *Rhizobium radiobacter* (KF975413.1).

On the other hand, there are reports of a larger diversity of phylotypes in the rhizosphere of husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*), than the diversity of bacterial endophytes (Márquez-Santacruz *et al.*, 2010). The culture morphology of the isolations displayed few differences amongst each other after 48 h of growth, characteristically white or cream-colored; only one displayed bright red pigmentation, a circular shape, ruffled edges and a shiny surface. The comparison of the sequences obtained from the gene 16S rDNA of the seven endophytic isolations against the NCBI database indicated broad relations with the bacterial species identified in the gene bank, with identities above 97% representing *Methylobacterium radiotolerans* (NR074244.1), *Shinella* sp. (KF261566.1), *Burkholderia cepacia* (AB162427.1), *Sphingobium herbicidovorans* (NR113843.1), *Pseudomonas* sp. (KR067597.1), *Achromobacter xylosoxidans* (KR136349.1) and *Rhizobium radiobacter* (KF975413.1).

The data generated by the database helped tentatively identify the organisms, yet a more thorough molecular characterization is necessary

Los datos generados por la base de datos permitieron dar a conocer de manera tentativa a los organismos; sin embargo, es necesaria una caracterización molecular más exhaustiva para asignar a que especie pertenecen. La Figura 1 ilustra las relaciones filogenéticas de los aislados presentando siete clusters (I a VII); en donde la inclusión de secuencias de referencia permitió corroborar la identidad de estas mostrando un agrupamiento con las caracterizadas y publicadas en otros trabajos. Turner *et al.* (2013) proponen que la interacción planta-microorganismo es diversa; sin embargo, aquellas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal son importantes para el uso agro-biotecnológico (entre otras muchas aplicaciones).

En este trabajo, se destacan los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*; dichos géneros han sido ampliamente estudiados por la producción y emisión de su diversa gama de productos metabólicos secundarios incluyendo antibióticos y compuestos orgánicos volátiles antifúngicos (Hernández-León *et al.*, 2015). Otros reportes, muestran que los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, son miembros dominantes en la microbiota rizosférica con habilidad para la utilización de sustratos carbonados, lo que apoya la teoría de que estas bacterias son estimuladas por la presencia y composición de distintos exudados radiculares (Marrero *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). En este estudio las cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia*, se aislaron en raíces de plantas de jitomate recolectadas en campo, lo cual es consistente en otros estudios. Madhaiyan *et al.* (2007), demostraron que la bacteria *Burkholderia* sp. reduce la acumulación de cadmio y plomo en raíces y brotes en plántulas de tomate como también del metal que está disponible en el suelo debido a la absorción y bioacumulación por parte de la bacteria. Un paso importante es el uso de tres formulaciones comerciales de *Pseudomonas* registradas en la Agencia de Protección Ambiental de EE. U.U, para la supresión de enfermedades de las

to define what species they belong to. Figure 1 illustrates the phylogenetic relations of the isolations presenting seven clusters (I to VII), where the inclusion of reference sequences helped verify their identity by showing a group with those characterized and published in other papers. Turner *et al.* (2013) propose that plant-microorganism interactions are diverse, although those related to plant growth promotion are important for agrobiotechnological use (among many other uses).

This experiment highlights the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia*. These have been widely studied for the production and emission of their diverse range of secondary metabolical products, including antibiotics and volatile organic antifungal compounds (Hernández-León *et al.*, 2015). Other reports show that the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* are dominant members in the rhizospheric microbiot with the ability to use carbon substrates, which supports the theory that these bacteria are stimulated by the presence and composition of different root exudates (Marrero *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). In this study, the *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains were isolated in tomato plant roots gathered in the field, which is consistent with other studies. Madhaiyan *et al.* (2007) proves that the bacteria *Burkholderia* sp. reduces the accumulation of cadmium and lead in tomato plant roots and shoots, as well as the metal available in the soil due to the absorption and bioaccumulation by the bacteria. An important step is the use of three commercial formulations of *Pseudomonas* registered in the Environmental Protection Agency of the United States for the suppression of plant diseases, respectively. These products are applied in balers to prevent fungal diseases during the storage of citrus fruits, stone fruits and potatoes (Stockwell *et al.*, 2006).

The group of bacteria called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) includes the

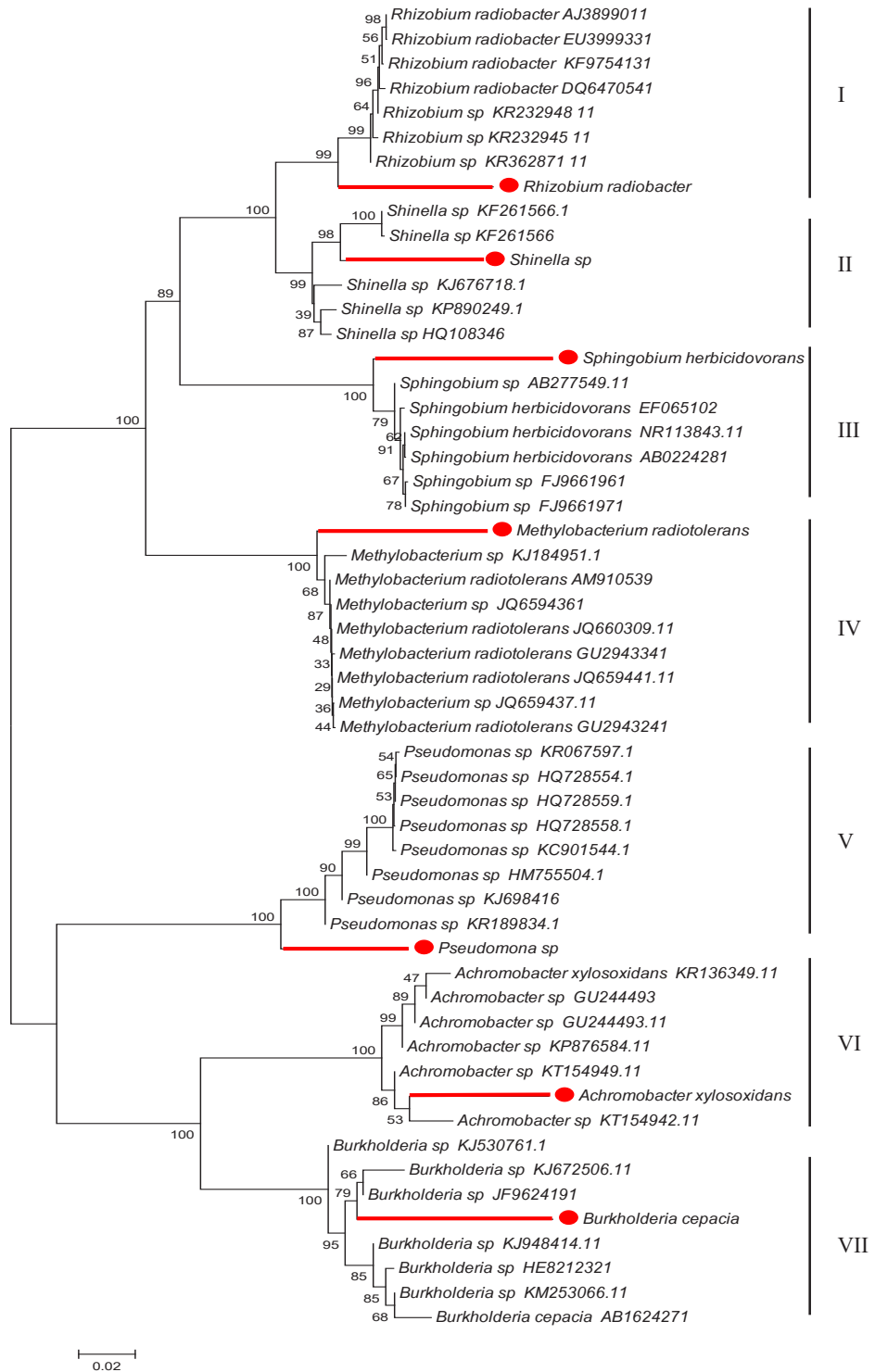


Figura 1. Relaciones filogenéticas de siete bacterias endófitas (marcadas línea roja) aisladas de tejido (raíz, tallo follaje) de jitomate colectadas en campo y bajo condiciones *in vitro* (Semilla). Aislamientos comparados con secuencias Gen-Bank.

Figure 1. Phylogenetic relations between seven endophytic bacteria (red lines) isolated from tissues (root, foliage stem) from tomato gathered on the field and under *in vitro* (Seed) conditions. Isolations compared with GenBank sequences.



plantas, respectivamente. Estos productos se aplican en empacadoras para prevenir enfermedades fúngicas durante el almacenamiento de cítricos, frutas de hueso y papa (Stockwell *et al.*, 2006).

El grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*. Las investigaciones se han orientado su estudio como promotor del crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas (Piñerúa *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios realizados por Santillana *et al.* (2005), reportaron que cepas de *Rhizobium*, estimulan la germinación de semillas de jitomate y promueven su crecimiento. En la actualidad, la agricultura sustentable plantea mejorar la eficiencia de la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y rizobios competitivos, capaces de ser usados en bioremediación y fitorremediación y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos (Piñerúa *et al.*, 2013). En este estudio la cepa de *Methylobacterium* fue aislada de tejido vegetal de plántulas de jitomate establecidas bajo condiciones *in vitro* sin reguladores de crecimiento, no hay reportes de dicho género bajo condiciones *in vitro* en plantas de jitomate. Diversos estudios han reportado que presentan la capacidad de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal, favoreciendo la fijación de nitrógeno y protegiendo a la planta contra patógenos (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Otro grupo de bacterias importantes aisladas del tejido de plantas de jitomate lo conforman *S. herbicidovorans* y *A. xylosoxidans*.

Actualmente, existen pocos trabajos reportados en relación a *S. herbicidovorans*, el cual es ampliamente utilizado contra las malas hierbas de hoja ancha en la agricultura, pastos, césped e industrias (Müller *et al.*, 2004). Estudios enfocados a la evaluación de la actividad antifúngica de *A. xylosoxidans* contra aislados de *F. oxysporum* y *F. solani*, reportaron efectos positivos reduciendo hasta en un 80% el crecimiento del micelio del patógeno en

genus *Rhizobium*. Investigations have pointed its study as the growth promoter in legume and non-legume plants (Piñerúa *et al.*, 2013). On the other hand, studies by Santillana *et al.* (2005) reported that strains of *Rhizobium* stimulate the germination of tomato seeds and promote their growth. Nowadays, sustainable agriculture suggests improving the efficiency of nitrogen fixation using legume plants and competitive rhizobia, which can be used in bioremediation and phytoremediation, thus extending the advantages of symbiosis to other crops (Piñerúa *et al.*, 2013). In this study, the strain of *Methylobacterium* was isolated from the plant tissue of tomato seedlings established under *in vitro* conditions without growth regulators; there are no reports of this genus under *in vitro* conditions in tomato plants. Diverse studies have reported that they are able to produce phytohormones that stimulate plant growth, favoring nitrogen fixation and protecting the plant against pathogens (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Another group of important bacteria isolated from the plant tissue of tomato is composed of *S. herbicidovorans* and *A. xylosoxidans*.

There are currently few investigations reported in regard to *S. herbicidovorans*, which is widely used against broad-leaf weeds in agriculture, grasses, lawn and industries (Müller *et al.*, 2004). Studies focusing on the evaluation of the antifungal activity of *A. xylosoxidans* against isolations of *F. oxysporum* and *F. solani* reported positive effects, reducing the mycelial growth of the pathogens by up to 80% in comparison with the control, suggesting a potential use as a biocontrol agent (Dhaouadi *et al.*, 2018). The inoculation of *A. xylosoxidans* F3B in *Arabidopsis thaliana* has been reported to stimulate a significant increase in root length and fresh weight, considering said bacteria as endophytic (Ying-Ning *et al.*, 2009).

In the evaluation of activities related with the promotion of plant growth, the strains

comparación con el control, sugiriendo un uso potencial como agente de biocontrol (Dhaouadi *et al.*, 2018). Se ha reportado la inoculación de *A. xylosoxidans* F3B en *Arabidopsis thaliana* estimulando un aumento significativo en la longitud de la raíz y peso fresco, considerando dicha bacteria como endófito (Ying-Ning *et al.*, 2009).

En la evaluación de actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal se observó que las cepas *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Rhizobium* presentaron alta capacidad fosfatosolubilizadora, frente al control (B25) *Bacillus cereus* (Cuadro 2). En la producción de sideróforos el aislado con mayor producción ante el control fue *Pseudomonas* sp. (Cuadro 2). Esta característica asocia a las rizobacterias, con el aumento del hierro disponible en el suelo permitiendo su absorción por la planta para constituir un mecanismo de promoción de crecimiento (Gouda *et al.*, 2018). Aunque no es frecuente encontrar evaluaciones cuantitativas de la síntesis de sideróforos por el género de *Pseudomonas*, se ha reportado la producción de varios sideróforos, con una gran afinidad por el Mo, V, Cu y Zn (Harrington *et al.*, 2012). Por otra parte, las bacterias endófitas pueden ser usadas como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas como hidrolasas y quitinasas consideradas como enzimas de defensa de las plantas contra la infección de patógenos (Perez *et al.*, 2013). En este trabajo la cepa con mayor actividad quitinasa fue *Burkholderia cepacia* (Cuadro 2).

Las especies bacterianas endófitas asociadas al cultivo de jitomate fueron: *Methylobacterium radiotolerans* (*in vitro*), *Shinella* sp. y *Achromobacter xylosoxidans* (tejido foliar), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Sphingobium herbicidovorans* y *Rhizobium radiobacter* (raíz). En general, bajo las condiciones evaluadas en la presente investigación

*Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Rhizobium* were observed to display a high phosphate solubilizing ability, in comparison with the control (B25) *Bacillus cereus* (Table 2). In the production of siderophores, the isolation with the greatest production in comparison with the control was *Pseudomonas* sp. (Table 2). This characteristic relates rhizobacteria with the increase in iron available in the soil, allowing its absorption by the plant to constitute a growth-promoting mechanism (Gouda *et al.*, 2018). Although finding quantitative evaluations of the synthesis of siderophores by the genus *Pseudomonas* is infrequent, there have been reports of the production of several siderophores with a strong affinity for Mo, V, Cu and Zn (Harrington *et al.*, 2012). On the other hand, endophytic bacteria can be used as biocontrol agents with the production of enzymes such as hydrolases and chitinases, considered as plant defense enzymes against the infection from pathogens (Perez *et al.*, 2013). In this investigation, the strain with the highest chitinase activity was *Burkholderia cepacia* (Table 2).

The endophytic bacterial species associated with tomato crop were *Methylobacterium radiotolerans* (*in vitro*), *Shinella* sp. and *Achromobacter xylosoxidans* (foliar tissue), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Sphingobium herbicidovorans* and *Rhizobium radiobacter* (root). In general terms, under the conditions evaluated in this investigation, approximately 86% of the isolated strains were observed to have the ability to produce plant-growth promoting substances, and according to this, these results show the possible beneficial effect of the bacterial endophytes in tomato plants. This lays the foundations for future field studies to determine the effect of these strains on the production and quality of tomato fruits.

se observó que aproximadamente el 86% de las cepas aisladas tienen capacidad de producir sustancias promotoras de desarrollo vegetal, de acuerdo con lo anterior estos resultados muestran el posible papel benéfico de los endófitos bacterianos en plantas de jitomate. Lo que sienta las bases para futuros estudios de campo para determinar el efecto de estas cepas sobre la producción y calidad de frutos de tomate.

#### AGRADECIMIENTOS

Universidad de Occidente y Dirección de Investigación y Posgrado Programa de Apoyo a la Investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X and Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.
- Dhaouadi S, Rouissi W, Mougou-Hamdane A and Nasraoui B. 2018. Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* against *Fusarium* wilt of melon. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01646-2>.
- Eaton CJ, Cox MP and Scott B. 2011. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science* 180:190–195. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.002>.
- Figueroa-López, AM, Cordero-Ramírez JD, Martínez-Álvarez JC, López-Meyer M, Lizárraga-Sánchez GJ, Félix-Gastélum R, Castro-Martínez C y Maldonado-Mendoza IE. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer Plus*, 5, 330. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1780-x>.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS and Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* 206:131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Gundel PE, Martínez-Ghersa MA, Omacini M, Cuyeu R, Paganó E, Ríos R and Ghersa CM. 2012. Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* 5:838–884. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00261.x>
- Harrington JM, Bargar JR, Jarzecki AA, Roberts JG, Sombers LA and Duckworth OW. 2012. Trace metal complexation by the triscatecholate siderophore protochelin: structure and stability. *Biometals* 25: 393-412. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9513-7>.
- Hernández-León RD, Rojas-Solis M, Contreras-Pérez MC, Orozco-Mosqueda LI, Macías- Rodríguez H and Reyes-

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Universidad de Occidente and the Office for Research and Postgraduate Studies Program for the Support of Research.

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

- de la Cruz. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control Journal* 81:83-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Kumar A, Singh R, Yadav A, Giri DD, Singh PK and Pandey KD. 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. 3. *Biotechnology* 6(1):60. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y>.
- Luna-Martínez L, Martínez-Peniche RA, Hernández-Iturriaga M, Arvizu-Medrano SM y Pacheco-Aguilar JR. 2013. Caracterización de Rizobacterias Aisladas de Tomate y su Efecto en el Crecimiento de Tomate y Pimiento. *Revista. Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 63-69. <https://www.researchgate.net/publication/262786197>
- Madhaiyan M, Poonguzhali S and Tongmin SA. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69:220–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>.
- Márquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I and Santoyo G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. 9:2372-2380. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr921>
- Marrero MA, Agaras B, Wall LG y Valverde C. 2015. Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplasma de distintas especies cultivadas *Reviews Argent Microbiology* 47(2):132-137 <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.007>
- Müller TA, Steven MB, Christoph W, Jan RV, Hans and PE. 2004. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 6066-6075. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.10.6066-6075.2004>
- Murashige T and Skoog E. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15 (2): 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Juang GK. 2011. Selection and Characterization of Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. *Hayati Journal of Biosciences* 18(2): 66-70. <https://doi.org/10.4308/hjb.18.2.66>.
- Ortiz-Galeana MA, Hernández-Salmerón JE, Valenzuela-Aragón B, de los Santos-Villalobos S, Rocha-Granados MC and Gustavo-Santoyo. 2018. Diversity of cultivable endophytic bacteria associated with blueberry plants (*vaccinium corymbosum* l.) cv. biloxi with plant growth-

- promoting traits. Chilean Journal Agricultural & Animal Science 34(2): 140-151. ISSN 0719-3882 print. ISSN 0719-3890 online
- Perez CA y Chamorro LB. 2013. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. Revista Colombiana Ciencia Animal 5(2):439-462. <https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.457>
- Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ and Cubo T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Microbiological Research 169(5-6):325-336. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Pikosvkaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia.17:362-370.
- Piñerúa Gonsalvez J F, Zambrano Infantino RC, Calcaño C, Montaña C, Fuenmayor Z, Rodney H, Rodney M, Rossanna CZ, Infantino CC, César M, Zaida F, Henry R and Marianela R. 2013. Endocarditis infecciosa por *Rhizobium radiobacter*: Reporte de un caso. Investigación Clínica 54(1):68-73 ISSN 0535-5133.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. 2018. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index). (Consulta: Diciembre, 2018).
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aranda-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Goodwin PH and Leyva-Mir SG. 2017. Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 35-55. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-3>
- Santillana Nery, Arellano Consuelo y Zúñiga Doris. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de Promover el Crecimiento en Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) Ecología Aplicada 4(1-2):47-51. <https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.297>.
- Schwyn B and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160:47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Shanmugaiyah V, Mathivanan N, Balasubramanian N and Manoharan PT. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporus* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology 7(15): 2562-2568. <http://www.academicjournals.org/AJB> ISSN 1684-5315.
- Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA and Friedmann EI. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. Microbial Ecology 33:169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>
- Sørensen J and Sessitsch A. 2007. Plant-associated bacteria life style and molecular interactions. p. 211-236. Modern soil microbiology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Stockwell, VO, Johnson, KB, and Johnson, VW. 2006. Colonization of Flowers by *Pseudomonas Fluorescens* A506 Formulated in a Biopolymer gel. Acta Horticulturae 704:293-300. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.42>
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR and Nowak J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. Plant and Soil Springer 253:381-390. <https://doi.org/10.1023/a:1024835208421>
- Tamura KD, Peterson N, Peterson G, Stecher, M and Nei S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Turner TR, James EK and Poole PS. 2013. The plant microbiome. Genome Biology 14:209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Yang CJ, Zhang XG, Shi GY, Zhao HY, Chen L, Tao KY and Hou TP. 2011. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. African Journal of Microbiology 5(2):131-136 <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR10.815>.
- Ying-Ning Ho, Dony CM, Chun HS, Shu CH and Chieh CH. 2009. A novel endophytic bacterium, *Achromobacter xylosoxidans*, helps plants against pollutant stress and improves phytoremediation. Journal of Bioscience and Bioengineering 108(1): 75-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.276>.