

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

**VOLUMEN 39, NÚMERO 1, Enero 2021**



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

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

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

**Editora Técnica \* Technical Editor**

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

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

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, 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, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA

**Editoras(es) Asociados en este Número \* Associate Editors in this Number**

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. María del Rosario Tovar Gómez, INIFAP

Dra. Teolincacihuatl Romero Rosales, UAGro.

Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, CIATEJ

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEMEX

Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez, INIFAP

Dr. Vicente J. Febres, University of Florida

Dr. Raúl Allende Molar, UV

Dr. Emiliano Loeza Kuk, INIFAP

Dr. Mauricio Luna Rodríguez, UV

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCol

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, ITConkal

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Dr. David Espinosa Victoria, COLPOS

Dr. Ángel Ramírez-Suárez, SENASICA

---

**Portada:** *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. Teliosporas germinadas en PDA 24 h después de la siembra (Superior izquierda). Cultivo monobasidial en PDA 5 días después de la siembra (Superior derecha). Atrofia de la inflorescencia masculina en maíz (Inferior izquierda). Síntomas de filodia (Inferior derecha).

**Original:** Márquez-Licona G, Castillo-González F, Vargas-Hernández M, De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG and Téliz-Ortiz D. Página 12.

## SCIENTIFIC ARTICLES \* ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in native maize germplasm** \* Resistencia a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en germoplasma nativo de maíz. 1  
Márquez-Licona G, Castillo-González F, Vargas-Hernández M, De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG and Téliz-Ortíz D.
- Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops** \* Caracterización polifásica de *Burkholderia gladioli* aislada de cebolla y evaluación de su patogenicidad potencial para otros cultivos. 21  
Serret-López M, Aranda-Ocampo S, Espinosa-Victoria D<sup>†</sup>, Ortiz-Martínez LE and Ramírez-Razo K.
- Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas** \* Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y antifúngica de agregado de polen de tres especies de abejas (Apidae: Meliponini) provenientes del Soconusco, Chiapas. 41  
Albore-Flores V, Saavedra-Camacho E, López-García JA, Grajales-Conesa J and Córdova-Albore LC.
- Gains in recurrent selection cycles for grain yield and resistance to head smut in maize** \* Ganancia en ciclos de selección recurrente para rendimiento y resistencia a carbón de la espiga en maíz. 61  
Díaz-Ramírez G, De León-García de Alba C, Nieto-Ángel D and Mendoza-Castillo MC.
- Morphological characterization of *Phytophthora capsici* isolates from Jalisco and Michoacán, Mexico** \* Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de Jalisco y Michoacán, México. 75  
Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP, Pedraza-Santos ME, Larsen J and Vázquez-Marrufo G.
- Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels** \* *Fusarium* spp. y estimación de carga de inóculo asociados a hijuelos de *Agave tequilana* en diferentes niveles de inductividad epidémica regional. 94  
Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutiérrez-Espinosa MA and Rubio-Cortés R.

**REVIEW ARTICLES \* ARTÍCULOS DE REVISIÓN**

**Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana** \* Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano. 122  
García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B.

**Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology** \* Potencial de las ciencias ómicas en la bioprospección de agentes microbianos de control biológico: el caso de la agro-biotecnología mexicana. 147  
Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruíz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI, Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML and de los Santos-Villalobos S.

**PHYTOPATHOLOGICAL NOTES \* NOTAS FITOPATOLÓGICAS**

**Population dynamics of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* under greenhouse conditions** \* Dinámica poblacional del nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* bajo condiciones de invernadero. 185  
Escobar-Ávila IM and Tovar-Soto A.

**Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*** \* Producción de metabolitos secundarios inducida por quitosano en extractos vegetales de *Piper auritum* y actividad fungicida *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. 198  
Fernández M del S, Hernández-Ochoa F, Carmona-Hernández O, Luna-Rodríguez M, Barrientos-Salcedo C, Asselin H and Lozada-García JA.

**Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean** \* Efecto inhibitorio de bacterias antagonistas contra *Sclerotium rolfsii*, agente causal del tizón sureño del frijol. 207  
Martínez-Álvarez JC, Camacho-Angulo F, Bojórquez-Armenta Y de J, Sánchez-Soto B, Cordero-Ramírez JD, Romero-Urías CA, Felix-Gástelum R and Mora-Romero GA.

**Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus Liberibacter* spp., causal agents of HLB** \* Filogenia de la enzima ATP/ADP translocasa de *Candidatus Liberibacter* spp., agentes causales del HLB. 219  
Flores-de la Rosa FR, Rodríguez-Quibrera CG and Santillán-Mendoza R.

# Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* in native maize germplasm

## Resistencia a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* en germoplasma nativo de maíz

**Guillermo Márquez-Licona**, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731; **Fernando Castillo-González**, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, <sup>1</sup>Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; **Mateo Vargas-Hernández**, <sup>2</sup>Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; <sup>1</sup>**Carlos De León-García de Alba\***; **Alma Rosa Solano-Báez**, Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla, Puebla, CP 72410; <sup>2</sup>**Santos Gerardo Leyva-Mir**; <sup>1</sup>**Daniel Téliz-Ortíz**. \*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 21 de Mayo, 2020.

Aceptado: 20 de Agosto, 2020.

Márquez-Licona G, Castillo-González F, Vargas-Hernández M, De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG and Téliz-Ortíz D. 2021. Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* in native maize germplasm. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 1-20.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-5>

Primera publicación en línea: 24 de Septiembre, 2020.

First publication on line: September 24, 2020.

**Resumen.** El carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) es una enfermedad que se caracteriza porque el patógeno reemplaza las inflorescencias por soros llenos de teliosporas. El objetivo de este estudio fue investigar la respuesta en campo de 55 poblaciones de maíz nativo a

**Abstract.** Head smut of maize (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) is a disease characterized by the pathogen replacing inflorescences with sori full of teliospores. The objective of this study was to investigate the response of 55 native maize populations to *S. reilianum* infection. Maize populations were collected in the states of Guerrero (13), Oaxaca (13), Puebla (six), Tlaxcala (12) and Estado de México (11). The seed was inoculated with teliospores of the pathogen, using grenetine as adherent. The hybrid Az 41801 was used as a control. The populations were evaluated in Mixquiahuala, Hidalgo, in the 2015 and 2016 plantings. The incidence of the disease was recorded by direct observation of signs and symptoms in the inflorescences. The maximum incidence of the disease in the maize populations was 28.8% and 22.2% in the first and second evaluation,



la infección por *S. reilianum*. Las poblaciones de maíz se colectaron en los estados de Guerrero (13), Oaxaca (13), Puebla (seis), Tlaxcala (12) y Estado de México (11). La semilla fue inoculada con teliosporas del patógeno, usando grenetina como adherente. El híbrido Az 41801 se utilizó como testigo. Las poblaciones fueron evaluadas en Mixquiahuala, Hidalgo, en los ciclos 2015 y 2016. La incidencia de la enfermedad se registró mediante la observación directa de signos y síntomas en las inflorescencias. La incidencia máxima de la enfermedad en las poblaciones de maíz fue de 28.8% y 22.2% en la primera y segunda evaluación, respectivamente, mientras que el testigo (Az 41801) presentó una incidencia de 70.7% y 42.3%. Considerando el origen geográfico, los maíces del Estado de México y Tlaxcala presentaron una menor incidencia de la enfermedad respecto al resto de las poblaciones, lo que indica la presencia de genes de resistencia a la enfermedad.

**Palabras clave:** *Zea mays*, maíz nativo, resistencia, incidencia, carbón de la espiga, inoculación artificial.

El maíz (*Zea mays* sp. *mays*) presenta una extraordinaria diversidad genética y morfológica, producto de una domesticación múltiple e independiente (Matsuoka *et al.*, 2002). Los estudios iniciales sobre la diversidad del maíz en México indican que existen 64 razas, divididas en 59 nativas y cinco introducidas (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020). Las razas de maíz representan un elemento invaluable para estudiar el proceso evolutivo de esta planta; además constituyen un reservorio genético para el desarrollo de variedades con resistencia genética a patógenos (Goodman y Brown, 1988) y a condiciones ambientales adversas (Arteaga *et al.*, 2016).

respectively, while the control (Az 41801) presented an incidence of 70.7% and 42.3%. Considering the geographical origin, the native maize collections from the Estados de Mexico and Tlaxcala, had a lower incidence of the disease compared to the rest of the populations, which indicates the presence of genes for resistance to the disease.

**Key words:** *Zea mays*, native maize, resistance, incidence, head smut, artificial inoculation.

Maize (*Zea mays* sp. *mays*) has an extraordinary genetic and morphological diversity as a result of multiple and independent domestication (Matsuoka *et al.*, 2002). The initial studies about maize diversity in Mexico indicate that there are 64 races, which are divided into 59 native and five races that were introduced (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020). The maize races represent an invaluable element to study the evolutionary process of this plant, and also constitute a genetic reservoir to develop varieties genetically resistant to pathogens (Goodman and Brown, 1988) and adverse environmental conditions (Arteaga *et al.*, 2016).

Maize is one of the crops with highest commercial value of worldwide agriculture, mainly due to its adaptability to different environments, high yield and wide diversity of uses (Bennetzen and Hake, 2009). In Mexico, maize cropping has the first place in agricultural cultivated area (~50%), where rainfed production prevails (>75%). The national average yield in 2018 was 3.8 t ha<sup>-1</sup>, reaching a total national production of more than 27 million tons annually (SIAP, 2018). In Mexico, 80% of the area sown to maize is still cultivated in subsistence farming systems, where the use of native varieties that traditional producers have conserved, selected, and exchanged for generations predominates (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020).

El maíz es uno de los cultivos de mayor valor comercial en la agricultura mundial, principalmente debido a su adaptabilidad a diferentes ambientes, su rendimiento alto y la amplia diversidad de usos (Bennetzen y Hake, 2009). En México, el cultivo de maíz ocupa el primer lugar en superficie agrícola cultivada (~50%), predominando la producción bajo condiciones de temporal (>75%). El rendimiento promedio nacional en 2018 fue de 3.8 t ha<sup>-1</sup>, alcanzándose una producción nacional total que supera los 27 millones de toneladas anuales (SIAP, 2018). En México, el 80% de la superficie cultivada de maíz aún se produce a través de agricultura de subsistencia, en donde predomina el uso de materiales nativos que los productores tradicionales han conservado, seleccionado e intercambiado por generaciones (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020).

El cultivo del maíz, al igual que cualquier otro cultivo, es afectado por factores bióticos y abióticos que limitan su producción. Dentro de los factores bióticos se encuentran las enfermedades fúngicas como el principal problema. Entre ellas destacan, la pudrición de mazorca y tallo causada por diferentes especies del género *Fusarium* (Mendoza *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Rivas-Valencia *et al.*, 2011), entre las enfermedades foliares sobresalen los tizones ocasionados por *Exserohilum turcicum* y/o *Bipolaris maydis*, las royas causadas por *Puccinia sorghi* o *P. polysora*, el complejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*), la mancha foliar causada por *Cercospora zea-maydis* y el mildiu inducido por *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). En mazorca y espiga, la principal enfermedad es el carbón de la espiga causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae) con reportes de incidencias de hasta el 80% (Frederiksen, 1977) y pérdidas en rendimiento del 37.9% (Martínez y Ledezma, 1990). Actualmente, ésta enfermedad está ampliamente

Maize cropping, the same as any other crop, is affected by biotic and abiotic factors that limit its production. Within the biotic factors, fungal diseases are the main problem. Among the diseases, the most important are ear and stem rots caused by different species of the genus *Fusarium* (Mendoza *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Rivas-Valencia *et al.*, 2011); among foliar diseases stand out leaf blights caused by *Exserohilum turcicum* and/or *Bipolaris maydis*; rusts caused by *Puccinia sorghi* or *P. polysora*; tar spot complex (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* and *Coniothyrium phyllachorae*); leaf spot caused by *Cercospora zea-maydis*, and downy mildew induced by *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). In ear and tassel, the main disease is head smut caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae) with reports of up to 80% incidence (Frederiksen, 1977) and 37.9% yield losses (Martínez and Ledezma, 1990). Currently, this disease is widely distributed across the maize producing areas with subtropical climate in the world (Martínez *et al.*, 2002). In Mexico, head smut was first reported in Amecameca, State of Mexico, where it infected teocintle plants (Borlaug, 1946), but the disease has not been detected again in the region. In 2011, the pathogen was detected in the states of Jalisco, Durango, Hidalgo and Puebla, but its distribution continues to expand (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

Head smut of maize is a systemic disease of edaphic origin (Lübberstedt *et al.*, 1999). The causal agent, *S. reilianum* f. sp. *zeae*, is a dimorphic phytopathogenic fungus with a haploid saprophytic phase and a diploid parasitic phase. The disease cycle starts when teliospores present in ears and tassels are carried by the wind and rain to be finally settled in the soil (Martínez *et al.*, 2001), where they can survive up to five years (Matyac and Kommedahl, 1986). The fungus

distribuida en las zonas productoras de maíz con clima subtropical del mundo (Martinez *et al.*, 2002). En México, la enfermedad fue reportada por primera vez en Amecameca, Edo. de México infectando plantas de teocintle (Borlaug, 1946), aunque no se ha vuelto a observar la enfermedad en esa región. En 2011, el patógeno se reportó en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución continua ampliándose (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

El carbón de la espiga del maíz es una enfermedad sistémica de origen edáfico (Lübberstedt *et al.*, 1999). El agente causal, *S. reilianum* f. sp. *zeae*, es un hongo fitopatógeno dimórfico, que presenta una fase saprofítica haploide y una fase parasítica diplóide. El ciclo de la enfermedad inicia cuando las teliosporas presentes en mazorcas y panojas son diseminadas por el viento y lluvia, para finalmente depositarse en el suelo (Martinez *et al.*, 2001), en donde sobreviven hasta cinco años (Matyac y Kommedahl, 1986). El hongo infecta al maíz únicamente durante la emergencia de las plántulas, por medio de las teliosporas presentes en el suelo (Xu *et al.*, 1999). Bajo condiciones de humedad y temperatura específicas, las teliosporas germinan formando un basidio de cuatro células y de cada una de ellas, se forma un gran número de basidiosporas de aspecto de levadura, que corresponden a la fase saprofítica haploide (Martinez *et al.*, 2002). Posteriormente, mediante el apareamiento de células compatibles, se forma la fase parasítica diplóide (Martinez *et al.*, 1998). El micelio infectivo penetra las raíces de las plántulas de maíz, por esta razón, en etapas tempranas de la infección hay una proliferación de hifas alrededor de la raíz (Martinez *et al.*, 2001). El micelio crece sistémicamente con el meristemo hasta que, después de la esporogénesis, las inflorescencias son remplazadas total o

infects maize only during seedlings emergence through teliospores present in the soil (Xu *et al.*, 1999). Under specific moisture and temperature conditions, the teliospores germinate and form a four-cell basidium, and then each cell produces a great number of yeast-like basidiospores, which correspond to the haploid saprophytic phase (Martinez *et al.*, 2002). Later, through the mating of compatible cells, the diploid parasitic phase takes place (Martinez *et al.*, 1998). The infective mycelium penetrates the maize seedling roots, and this is the reason why hyphae proliferate around the root in the early stages of infection (Martinez *et al.*, 2001). Mycelium grows systemically with the meristem until, after sporogenesis, the inflorescences are totally or partially replaced by black sori filled with teliospores (Xu *et al.*, 1999). Losses caused by head smut can be reduced by modifying the farming practices (Matyac and Kommedahl, 1985) or applying systemic fungicides to seed (Martínez and Ledezma, 1990; Wright *et al.*, 2006). However, for ecological and economic reasons, the development of genetically resistant germplasm is the most recommended method for controlling the disease (Wang *et al.*, 2008), thus being necessary to identify possible sources of resistance. To date, there is no systematic information about the response of native maize populations to infection caused by *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Therefore, the objective of this research was to determine the response of native maize germplasm from the states of Guerrero, State of Mexico, Oaxaca, Puebla, and Tlaxcala to *S. reilianum* f. sp. *zeae* infection. The hypothesis of this research is that native maize from the state of Guerrero will show higher susceptibility to the disease, while maize from the highlands will show increased resistance, as a result of a coevolution process.



parcialmente por soros negros llenos de teliosporas (Xu *et al.*, 1999).

Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad pueden reducirse modificando las prácticas agrícolas (Matyac y Kommedahl, 1985) o mediante la aplicación de fungicidas sistémicos a la semilla (Martínez y Ledezma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Sin embargo, por razones ecológicas y económicas, la generación de germoplasma con resistencia genética a la enfermedad es el método de control más recomendable (Wang *et al.*, 2008), por lo que es necesaria la identificación de posibles fuentes de resistencia. A la fecha, se carece de información sistemática sobre la respuesta de poblaciones de maíz nativas a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Así, el objetivo de la presente investigación fue determinar la respuesta de germoplasma de maíz nativo proveniente de los estados de Guerrero, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. La hipótesis de esta investigación es que los maíces nativos del estado de Guerrero mostrarán una mayor susceptibilidad a la enfermedad, mientras que los maíces originarios de valles altos presentarán una mayor resistencia, como producto de un proceso de coevolución.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Germoplasma de maíz nativo.** Se evaluaron 55 poblaciones de maíz nativo que previamente Briones-Reyes *et al.* (2015) colectaron y caracterizaron, provenientes de 19 localidades ubicadas entre los 1498 y 2520 msnm, de cinco estados: 13 de la región de Montaña de Guerrero, 11 del Sureste del Estado de México, 13 de la Mixteca Alta de Oaxaca, seis de Puebla y 12 de Tlaxcala (Cuadro 1). Las colectas de maíz se mantuvieron en cuarto frío a -4 °C desde la colecta hasta el momento de su uso.

## MATERIALS AND METHODS

**Native maize germplasm.** For this research, 55 native maize populations, previously collected and characterized (Briones-Reyes *et al.* (2015), were evaluated. The populations were collected at 19 sites in five states located between 1498 and 2520 masl: Montaña de Guerrero region (13), southeast State of Mexico (11), Mixteca Alta of Oaxaca (13), Puebla (6) and Tlaxcala (12) (Table 1). The maize collections were kept in a cold room at -4 °C since the date of collection until they were used.

**Source of inoculum and seed inoculation.** The source of inoculum were teliospores collected in 2014 at a maize lot (hybrid Cardenal, Asgrow®) in the municipality of Tenango del Valle, Mexico. The teliospores were removed from sori, passed through a 117 micron sieve (Mont Inox®), stored in plastic containers with envelopes containing CaCl<sub>2</sub> (J. T. Baker and Macron Fine Chemicals® 94%), and kept at 20 ± 2 °C until they were used. The inoculum was morphologically characterized using the methodology of Vánky (2012), and molecularly characterized based on the methodology proposed by Márquez-Licona *et al.* (2018). The morphological characterization of the inoculum was conducted by observing pathogen's teliospores placed on slides. For this procedure, 100 teliospores were measured and characterized with a 100 X compound microscope (CX31RBSFA, Olympus®). The molecular characterization was performed using monobasidial cultures and amplifying the ITS region (Internal Transcribed Spacer), as well as part of the LSU rDNA region (Large Subunit Ribosomal DNA), using ITS1F/NL4 primers (Gardes and Bruns 1993; O'Donnell *et al.*, 1998).

The extraction of total DNA of the monobasidial cultures was made with the Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit commercial kit (MoBio

**Cuadro 1. Origen geográfico de las 55 poblaciones de maíz nativo colectadas y caracterizadas por Briones-Reyes *et al.* (2015).  
Table 1. Geographical origin of the 55 native maize populations collected and characterized by Briones-Reyes *et al.* (2015).**

Población	Procedencia geográfica				Altitud (msnm)
	Localidad	Municipio	Estado		
1	El Nuevo Paraíso	Cualác	Guerrero		2222
6	El Nuevo Paraíso	Cualác	Guerrero		2222
7	El Nuevo Paraíso	Cualác	Guerrero		2222
20	El Nuevo Paraíso	Cualác	Guerrero		2222
18	Almolonga	Tixtla	Guerrero		1593
21	Ojitos de agua	Tixtla	Guerrero		1593
22	Ojitos de agua	Tixtla	Guerrero		1593
25	El Ahuejote	Tixtla	Guerrero		1872
54	Plan de Guerrero	Tixtla	Guerrero		1498
55	Chilacachapa	Tixtla	Guerrero		1990
19	Las Trancas	Zitlala	Guerrero		1564
24	Las Trancas	Zitlala	Guerrero		1564
23	El refugio	Chilapa	Guerrero		1680
2	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
3	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
4	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
11	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
12	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
13	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
14	Sta. Justina	Ixtacuixtla	Tlaxcala		2220
5	Los reyes Q.	Los Reyes	Tlaxcala		2300
37	Nanacamilpa	Nanacamilpa	Tlaxcala		2720
39	Vicente Guerrero	Españita	Tlaxcala		2520
40	Vicente Guerrero	Españita	Tlaxcala		2520
48	iTS0 EH	Españita	Tlaxcala		2520
8	El pueblito Cuecucuatitla	Tepetlixpa	Estado de México		2270
41	Tlapala 2008	Chalco	Estado de México		2264
42	Tlapala 2008	Chalco	Estado de México		2264
43	Sel-2009	Chalco	Estado de México		2264
47	Tlapala 2009	Chalco	Estado de México		2264
44	Ay-09 Sr. Marcelino	Ayapango	Estado de México		2452
46	Poxtla -09	Ayapango	Estado de México		2452
52	Col 21-010 Ayap	Ayapango	Estado de México		2452
53	Col 24-010 Ayap	Ayapango	Estado de México		2452
45	♂ Desespigam-09	Texcoco	Estado de México		2250
51	FMH 4A Ancho	Texcoco	Estado de México		2250
9	Sta. María Tataltepec	Tataltepec	Oaxaca		1600
10	Sta. María Tayata	Tayata	Oaxaca		2144
17	Huamelulpan	Huamelulpan	Oaxaca		2200
26	Sn. M. Huamelulpan	Huamelulpan	Oaxaca		2200
32	De la unión	Huamelulpan	Oaxaca		2200
33	De la unión	Huamelulpan	Oaxaca		2200
34	De la unión	Huamelulpan	Oaxaca		2200
27	Cuesta Blanca	Tezoatlan	Oaxaca		2143
35	Cuesta Blanca	Tezoatlan	Oaxaca		2143
28	El Chamizal	Ticua	Oaxaca		2285
29	El Chamizal	Ticua	Oaxaca		2285
30	Fortín de Juárez	Ticua	Oaxaca		2287
31	El Chamizal	Ticua	Oaxaca		2285
15	S. J. Morelos	Libres	Puebla		2400
16	S. J. Morelos	Libres	Puebla		2400
36	S. J. Morelos	Libres	Puebla		2400
38	S. J. Morelos	Libres	Puebla		2400
49	Zoatecpán	Xochitlán	Puebla		1610
50	Zoatecpán	Xochitlán	Puebla		1610

**Fuente de inóculo e inoculación de semillas.**

La fuente de inóculo fueron teliosporas colectadas en 2014 en un lote de maíz (híbrido Cardenal, Asgrow®) en el municipio de Tenango del Valle, Méx. Las teliosporas se retiraron de los soros, se pasaron por un tamiz de 117 micras (Mont Inox®), se almacenaron en envases de plástico con sobres conteniendo CaCl<sub>2</sub> (J. T. Baker y Macron Fine Chemicals® 94%), y se conservaron a 20 ± 2 °C hasta el momento de su uso. El inóculo se caracterizó morfológicamente utilizando la metodología de Vánky (2012) y molecularmente tomando como base la metodología propuesta por Márquez-Licona *et al.* (2018). La caracterización morfológica del inóculo se realizó observando laminillas con teliosporas del patógeno. Para esto, se midieron y caracterizaron 100 teliosporas al microscopio compuesto a 100 X (CX31RBSFA, Olympus®). La caracterización molecular se realizó a partir de cultivos monobasidiales, amplificando la región ITS (Internal Transcribed Spacer) y parte de la región LSU rDNA (Large Subunit Ribosomal DNA) usando los iniciadores ITS1F/NL4 (Gardes y Bruns 1993; O'Donnell *et al.*, 1998).

La extracción total de ADN de los cultivos monobasidiales, se realizó con el kit comercial Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc). La integridad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1% y la cantidad de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm de absorbancia (Nanodrop® ND-1 V 3.2.1). Para la amplificación se usó una mezcla de 25 µL, buffer My Taq 1X, 10 pm de cada iniciador, 1U MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline Germany) y 100 ng de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf®) a una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C por 1 min, más un ciclo de 72 °C por 10 min para la extensión final. La visualización

Laboratories Inc). The DNA integrity was verified in 1% agarose gel and the amount of DNA was determined by spectrophotometry at 260 nm absorbance (Nanodrop® ND-1 V 3.2.1). For amplification, a mixture was prepared using 25 µL, buffer My Taq 1X, 10 pm of each primer, 1U MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline Germany) and 100 ng of DNA. The amplification was carried out in a Mastercycler Pro thermocycler (Eppendorf®) at 94 °C initial denaturation temperature for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, plus one cycle at 72 °C for 10 min for the final extension. The amplified fragments were visualized in 1% agarose gel electrophoresis at 120 volts for 30 min. The size of the amplified fragment was estimated with the Pst I marker (Microzone®). Once electrophoresis ended, the gel was analyzed with a Chemi Genius 2 Bio Imaging System photodocumenter (Syngene®). The PCR products were purified as described by Kirby (1965) and sequenced in Macrogen Europe (Amsterdam, The Netherlands). The quality of the sequences was determined by observing the electropherograms with the 4peaks® Nucleobytes software (Griekspoor and Groothuis, 1994), and U GENE (Okonechnikov *et al.*, 2012) for the consensus sequence. The obtained sequences were compared to the records in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Blastn tool (Altschul *et al.*, 1990). The sequences were stored in the same database.

The seed viability was verified before inoculating the seed, as described by Quezada-Salinas *et al.* (2013). For inoculation, the teliospores were adhered to the seed using a 10% aqueous grenetine solution at 20 °C (Márquez-Licona *et al.*, 2018). The seeds (66 of each population, 22 per replication) were immersed in the grenetine solution for 1 min, recovered in a Petri dish and completely covered with teliospores (~40 000 teliospores/seed). The inoculated seeds were dried

de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 volts por 30 min. Para estimar el tamaño del fragmento amplificado se utilizó el marcador molecular Pst I (Microzone®). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se analizó con un fotodocumentador Chemi Genius 2 Bio Imaging System (Syngene®). Los productos de PCR se purificaron según lo descrito por Kirby (1965) y se secuenciaron en Macro-gen Europe, Amsterdam, Holanda. La calidad de las secuencias se determinó mediante la observación de los electroferogramas usando el software 4peaks® Nucleobytes (Griekspoor y Groothuis, 1994), mientras que las secuencias consenso hicieron usando el software U GENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), utilizando la herramienta Blastn (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias se dieron de alta en la misma base de datos.

La viabilidad se verificó previo a la inoculación de la semilla como lo describen Quezada-Salinas *et al.* (2013). Para la inoculación, las teliosporas se adhirieron a la semilla usando una solución acuosa de grenetina al 10% a 20 °C (Márquez-Licona *et al.*, 2018). Las semillas (66 por cada población, 22 por repetición) se incorporaron a la solución de grenetina por 1 min, se recuperaron en una caja de Petri y se cubrieron completamente con teliosporas (~ 40 000 teliosporas/semilla). Las semillas inoculadas se secaron por 24 h a 22 °C. Como testigos se usaron semillas de maíz del híbrido Az 41801® inoculadas y sin inocular.

**Evaluación de la respuesta de maíz nativo.** La respuesta de las poblaciones de maíz nativo a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se evaluó sembrándolas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. (20° 11' 24.6" N 99° 14' 35.2"

for 24 h at 22 °C. Seeds of the hybrid Az 41801®, inoculated and non-inoculated, were used as the control.

**Evaluation of the response of native maize.** The response of native maize populations to *S. reilianum* f. sp. *zeae* infection was evaluated by planting them in a lot at Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hidalgo (20° 11' 24.6" N 99° 14' 35.2" W; 2030 masl), with semi-dry and temperate climate, in the 2015 and 2016 spring-summer cycles, using the same randomization. In both evaluations, the native maize populations, the plot where the evaluation was conducted, the source of inoculum and the percent of germinated teliospores were stable. The inoculated seed of each population was sown in 3-m long rows and 0.80 m between rows, at 5 cm depth, separated 13.5 cm between seeds. The experimental unit consisted of one 22-plant row with 3 replications. The experiment was established in a completely randomized design. After planting, flood irrigation was applied to the plot (an irrigation sheet of 140 mm), and subsequent irrigation was applied at stages V5, V7, VT, R2 and R5. The lack of moisture between the first and second irrigation increased the percent of head smut incidence, as reported by Matyac and Kommedahl (1985). As part of the agricultural practices of soil removal after sowing, only one cultivator step was carried out in stage V4. Insect pests and weeds were controlled according to the regional technological package, this is, using chemical products that are sold in the region.

The disease incidence in the populations was recorded 45 days after flowering started. A plant with symptoms in the tassel or the ear, or both, was considered as an infected plant. The disease incidence was determined as the quotient of the number of plants with symptoms and the total of plants in the experimental unit multiplied by 100.

W; 2030 msnm; clima templado semiseco, en los ciclos primavera-verano de 2015 y 2016, bajo la misma aleatorización. En ambas evaluaciones, las poblaciones de maíz nativo evaluadas, el terreno usado en la evaluación, la fuente de inóculo y el porcentaje de germinación de las teliosporas se mantuvieron estables. La semilla inoculada de cada población se sembró en surcos de 3 m de largo y 0.80 m entre surcos, a una profundidad de 5 cm, con separación de 13.5 cm entre semillas. La unidad experimental consistió en un surco con 22 plantas con 3 repeticiones. El diseño experimental fue un Diseño en Bloques Completos al Azar. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación (lamina de riego 140 mm), los riegos posteriores se realizaron en las etapas V5, V7, VT, R2 y R5. La escases de humedad entre el primer y el segundo riego incrementa el porcentaje de incidencia del carbón de la espiga según lo reportado por Matyac y Kommedahl (1985). Dentro de las prácticas agrícolas de remoción del suelo posteriores a la siembra, solo se realizó un paso de cultivadora en etapa V4. El manejo de plagas insectiles y malezas se realizó de acuerdo con el paquete tecnológico regional, mediante el uso de productos químicos comercializados en la región.

La incidencia de la enfermedad en las poblaciones se registró 45 días después del inicio de la floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la espiga, en la mazorca, o ambas. La incidencia de la enfermedad se determinó como el cociente entre plantas con síntomas y el total de plantas en la unidad experimental multiplicado por 100. Considerando los valores de incidencia, las poblaciones se agruparon de acuerdo con la escala propuesta por Quezada-Salinas *et al.* (2017), la cual considera los siguientes rangos 0-10%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente

Based on the incidence values, the populations were grouped according to the scale proposed by Quezada-Salinas *et al.* (2017), which considers the following ranges: 0-10%=highly resistant, 11-25%=moderately resistant, 26-50%=moderately susceptible, 51-75%=susceptible, and 76-100%=highly susceptible. To obtain the disease incidence, a combined analysis of variance of the two years was conducted, where the model also included the State factor, and the genotypes were nested within the State and the year×gen Interaction (state). The base 10 logarithm transformation was applied to the incidence response variable. The tests were conducted under the logarithm transformation to keep the statistical validity of the analysis of variance, but the mean values were expressed in the original units. The comparison of multiple means for years and states was made using the Least Significant Difference method, and Tukey's Honest Significant Difference method to compare multiple means adjusted by minimum squares (lsmeans), considering a level of 5% significance in both cases. The statistical analyses were conducted using SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc., 2013) statistical software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Source of inoculum and seed inoculation.

When the inoculum was morphologically characterized, teliospore clusters 73 µm in diameter were observed. The teliospores (10-12 x 11-13.5 µm) were globose-to-subglobose, mainly dark brown in color, with ornamentations. The previously described characteristics are in agreement with those reported by Vánky, 2012 for *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* species. In the molecular characterization of the inoculum, the comparison of the sequences obtained in this



susceptible. Para los datos de incidencia de la enfermedad se realizó un análisis de la varianza combinado a través de los dos años incluyendo en el modelo también al factor Estado, los genotipos se anidaron dentro de Estado y la Interacción año×gen (estado). A la variable respuesta incidencia se le aplicó la transformación logaritmo base 10. Las pruebas se hicieron bajo la transformación logaritmo para conservar la validez estadística del análisis de la varianza, sin embargo, los valores de las medias se expresaron en las unidades originales. La comparación múltiple de medias para años y estados se realizó mediante el método de la Diferencia Mínima Significativa y la comparación múltiple de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans) realizó mediante el método de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey, en ambos casos, considerando un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se hicieron usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Fuente de inóculo e inoculación de semillas.** En la caracterización morfológica del inóculo, se observaron aglomeraciones de teliosporas de 73 µm de diámetro. Las teliosporas (10-12 x 11-13.5 µm) fueron de globosas a subglobosas, principalmente de coloración café oscuro, con presencia de ornamentaciones. Las características antes descritas concuerdan con lo reportado por (Vánky, 2012) para la especie *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. En la caracterización molecular del inóculo, la comparación de la secuencias obtenidas en el presente estudio (KY856895, KY856896) mediante la herramienta Blastn (Altschul *et al.*, 1990), mostró 99% de identidad con un fragmento correspondiente a la región ITS del genoma completo de *S. reilianum*

study (KY856895, KY856896) using the Blastn tool (Altschul *et al.*, 1990) showed 99% identity with a fragment corresponding to the ITS region of the full genome of *S. reilianum* f. sp. *zeae* deposited in the GeneBank (NCBI) by Schirawski *et al.* (2010), thus confirming the identity of the inoculated pathogen. Of the teliospores used as a source of inoculum, 48% germinated in acidified PDA medium after 24 h incubation in darkness at 25 °C, thus demonstrating the inoculum viability, which exceeded the viability percent reported in other investigations such as those of Osorio and Frederiksen (1998), Potter (1914) and Quezada-Salinas *et al.* (2013). In this study, the germinated teliospores formed a four-cell septate basidium, and each cell produced a hyaline, unicellular and subglobose basidiospore, which produced a great number of sporidia that then formed yeast-type colonies, cream in color (Figure 1 A-B), which is in agreement with what Márquez-Licona *et al.* (2018) reported.

### **Evaluation of the response of native maize.**

In 2015, from March to September the average temperature value was of 17.7 °C, with average rainfall of 67.5 mm, and average relative humidity of 72.6%. In 2016, during the same period, the temperature average value was of 16.8 °C, average rainfall of 101.2 mm and average relative humidity of 74.8%. Thirty days after sowing, when seedlings infection occurs, the average rainfall was 41 mm higher in 2016 than in the previous year. Forty five days after flowering started, plants of the non-inoculated control remained healthy, thus demonstrating the absence of inoculum in the soil, while the plants from inoculated seed showed formation of sori filled with teliospores which totally or partially replaced the tassel and the ear (Figure 1 C-F), as mentioned by Xu *et al.* (1999), which caused a marked reduction in pollen and

f. sp. *zeae* depositado en el GenBank (NCBI) por Schirawski *et al.* (2010), corroborándose la identidad del patógeno inoculado. Las teliosporas empleadas como fuente de inóculo tuvieron un 48% de germinación después de 24 h, incubadas en oscuridad a 25 °C, en medio de cultivo PDA acidulado, demostrándose así la viabilidad del inóculo, superando el porcentaje de viabilidad reportado en otras investigaciones como Osorio y Frederiksen (1998), Potter (1914) y Quezada-Salinas *et al.* (2013). En el presente estudio, las teliosporas germinadas formaron un basidio septado de cuatro células, cada célula originó una basidiospora hialina, unicelular, subglobosa, a partir de las cuales desarrollaron numerosas esporidias que formaron colonias tipo levadura color crema (Figura 1 A-B), lo que concuerda con lo reportado por Márquez-Licona *et al.* (2018).

**Evaluación de la respuesta de maíz nativo.** En 2015, el valor promedio de temperatura de marzo a septiembre fue de 17.7 °C, con una precipitación promedio fue de 67.5 mm, y humedad relativa promedio de 72.6%. En 2016, durante el mismo período, el valor promedio de temperatura fue de 16.8 °C, precipitación promedio de 101.2 mm y humedad relativa promedio de 74.8%. En los 30 días posteriores a la siembra, donde ocurre la infección de las plántulas, la precipitación promedio fue 41 mm superior en 2016, respecto al año anterior. Después de 45 días del inicio de la floración, las plantas del testigo no inoculado permanecieron sanas, demostrándose así la ausencia de inóculo en el suelo, mientras que las plantas provenientes de semilla inoculada mostraron formación de soros llenos de teliosporas que remplazaron total o parcialmente la espiga y la mazorca de las plantas (Figura 1 C-F) como lo mencionan Xu *et al.* (1999), observándose una marcada reducción en la producción de polen y grano como lo describen Ghareeb *et al.* (2011).

grain production, as described by Ghareeb *et al.* (2011).

In 2015, 37 of the native maize populations showed head smut symptoms in at least one of the replications, and the disease incidence in the 55 native maize populations ranged from 0 to 28.8%. Of the 55 native maize populations, 72.7% had incidence ranging from 0 to 10%, 21.8% incidence from 11 to 25%, and 5.5% of the collections from 26 to 50% incidence. In the same evaluation, 100 and 83.3% of the native maize populations from the States of Mexico and Tlaxcala, respectively, were highly resistant to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, while populations 19 and 21 from Guerrero, and population 30 from Oaxaca, reached a level of incidence higher than 26%, so they were classified as moderately susceptible. For the 2016 cropping cycle, only 21 of the 55 native maize populations showed head smut symptoms in at least one of their replications, and the disease incidence in the 55 native maize populations ranged from 0 to 22.2%. Out of the 55 native maize populations, 94.5% showed incidences ranging from 0 to 10%, and 5.5% from 11 to 25%. In the same evaluation, 100% of the native populations from the States of Mexico, Tlaxcala and Oaxaca were highly resistant to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, while populations 19 and 24 from Guerrero and population 16 from Puebla reached a level of incidence ranging from 11 to 25%, so they were classified as moderately resistant (Table 2). In the second evaluation year (2016), the disease incidence in the populations was lower than in the previous year. The same happened to the inoculated control (hybrid AZ 41801®), where the disease incidence decreased by 28.4% between the first and the second evaluation. This may be attributed to a soil humidity increase due to higher rainfall in the second evaluation year. These results suggest that a humidity increase after sowing affected the fungus ability to infect

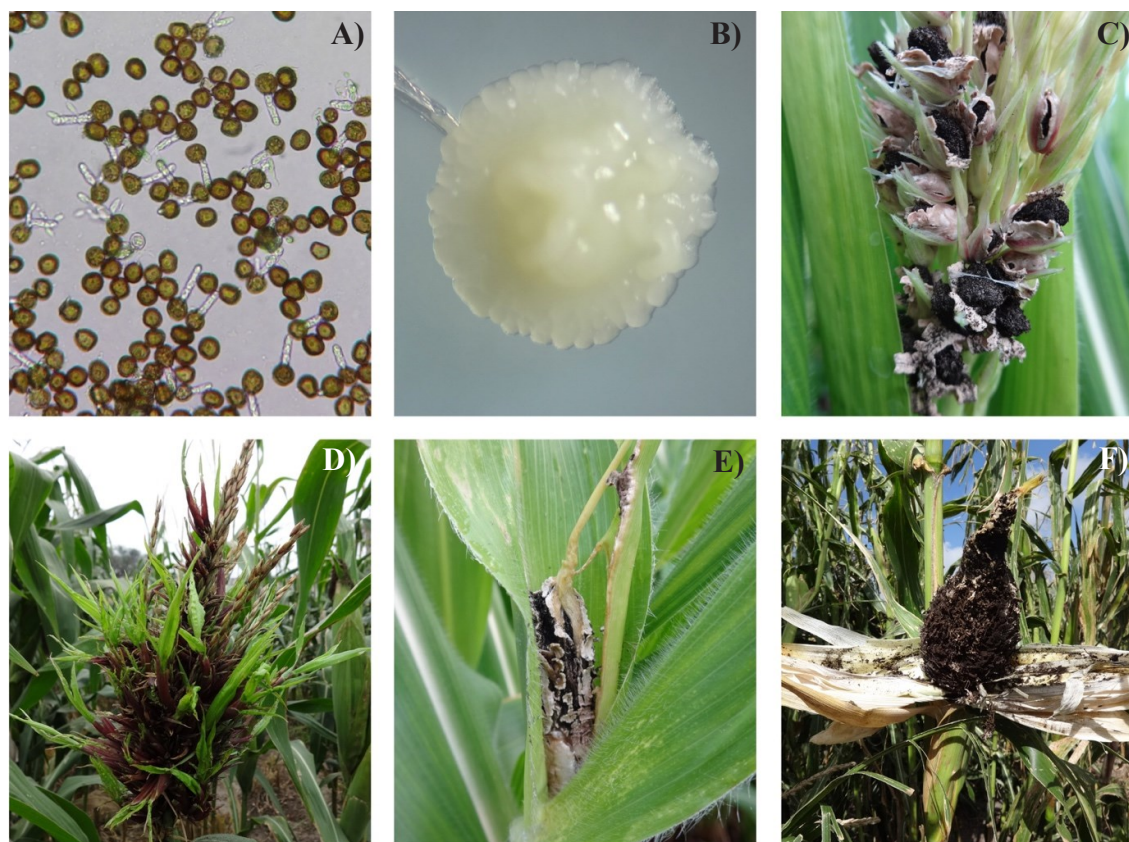


Figura 1. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Teliosporas germinadas en PDA 24 h después de la siembra. B) Cultivo monobasidial en PDA 5 días después de la siembra. C) Reemplazo parcial de la inflorescencia masculina. D) Síntomas de filodia en plantas enfermas. E) Atrofia de la inflorescencia masculina. F) Reemplazo total de la mazorca por soros llenos de teliosporas.

Figure 1. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Teliospores germinated in PDA 24 h after sowing. B) Monobasidial culture in PDA 5 days after sowing. C) Partial replacement of male inflorescence. D) Symptoms of phyllody in infected plants. E) Male inflorescence atrophy. F) Total replacement of ear by sori filled with teliospores.

En 2015, 37 de las 55 poblaciones de maíz nativo presentaron síntomas del carbón de la espiga en al menos una de las repeticiones y la incidencia de la enfermedad en las 55 poblaciones de maíz nativo varió entre 0 y 28.8%. De las 55 poblaciones de maíz nativo, el 72.7% presentaron incidencias entre 0 y 10%, el 21.8% incidencias entre 11 y 25% y el 5.5% de las colectas presentaron entre el 26 y el 50% de incidencia. En la misma evaluación, se encontró que el 100 y el 83.3% de las poblaciones nativas del Estado de México y Tlaxcala, fueron

maize seedling roots, as mentioned by Matyac and Kommedahl (1985).

The high values of disease incidence in the inoculated hybrid, compared to the incidence recorded for native maize populations, may be due to the fact that no disease resistance genes have been incorporated into the selection process of the hybrid parent lines, while the genetic diversity present in the native maize collections is broader and can express certain levels of resistance, as mentioned by Fehr (1993) and Hallauer *et al.* (2010). For this

altamente resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae*; mientras que las poblaciones 19 y 21 de Guerrero y la población 30 de Oaxaca alcanzaron incidencias superiores al 26%, clasificándose como moderadamente susceptibles. Para el ciclo 2016, solo 21 de las 55 poblaciones de maíz nativo presentaron síntomas del carbón de la espiga del maíz en al menos una de sus repeticiones y la incidencia de la enfermedad en las 55 poblaciones de maíz nativo fluctuó entre 0 y 22.2%. De las 55 poblaciones de maíz nativo, el 94.5% presentaron incidencias entre 0 y 10% y el 5.5% de las poblaciones presentaron incidencia entre 11 y 25 %. En la misma evaluación, se encontró que el 100% de las poblaciones nativas de los estados de Edo. de México, Tlaxcala y Oaxaca, fueron altamente resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae*, mientras que las poblaciones 19 y 24 de Guerrero y la población 16 de Puebla alcanzaron

reason, keeping maize genetic diversity is essential for future genetic development, since the lack of genetic diversity may compromise the possibility of developing high-yielding materials better adapted to adverse environmental conditions, as well as the development of disease-resistant germplasm (Giordani *et al.*, 2019).

Regarding the combined analysis of variance of head smut incidence in tassel in 55 maize genotypes evaluated for two years, there were highly significant differences in the main effects of year, state and genotype, but not in the year × genotype interaction (Table 3). The results show that the populations (genotype), the origin and the evaluation year influenced the incidence of head smut in maize tassel. Significant statistical differences of the same type were found by Briones-Reyes *et al.* (2015) when the authors evaluated the

**Cuadro 2. Variación de la incidencia del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) en 55 poblaciones de maíz nativo inoculado (Mixquiahuala, Hidalgo primavera-verano, 2015 y 2016).**

**Table 2. Variation in the incidence of head smut on maize tassel (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) in 55 populations of native maize inoculated (Mixquiahuala, Hidalgo, spring-summer, 2015 and 2016).**

Estado	Líneas enfermas (2015)					Líneas enfermas (2016)				
	Incidencia de la enfermedad (%)									
	0-10	11-25	26-50	51-75	76-100	0-10	11-25	26-50	51-75	76-100
Tlaxcala (12) <sup>x</sup>	10 <sup>y</sup> (83.33) <sup>z</sup>	2 (16.66)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Guerrero (13)	6 (46.15)	5 (38.46)	2 (15.38)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (76.92)	3 (23.07)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Puebla (6)	4 (66.66)	2 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Oaxaca (13)	9 (69.23)	3 (23.07)	1 (7.69)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
México (11)	11 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Escala para la clasificación de poblaciones de maíz nativo: 0-10%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente susceptible. <sup>x</sup>= Número total de poblaciones de maíz nativo evaluadas por estado. <sup>y</sup>= número de poblaciones de maíz nativo enfermas en el rango correspondiente. <sup>z</sup>= Porcentaje de poblaciones de maíz nativo enfermas en el rango correspondiente, respecto al total de líneas evaluadas por estado. / Scale to classify native maize populations: 0-10%=Highly resistant, 11-25%= moderately resistant, 26-50%= moderately susceptible, 51-75%= susceptible, and 76-100%= highly susceptible. <sup>x</sup>=Total number of evaluated native maize populations by state. <sup>y</sup>=number of infected native maize populations in the corresponding range. <sup>z</sup>=Percent of infected native maize populations in the corresponding range compared to the total of evaluated lines by state.



incidencias entre el 11 y el 25%, clasificándose como moderadamente resistentes (Cuadro 2). En el segundo año de evaluación (2016), la incidencia de la enfermedad en las poblaciones fue menor respecto a la evaluación del año anterior. Lo mismo sucedió en el testigo inoculado (híbrido AZ 41801®), en donde se observó una disminución del 28.4% en la incidencia de la enfermedad entre la primera y la segunda evaluación. Lo anterior se puede atribuir a un incremento en la humedad del suelo, esto como resultado de una mayor precipitación en el segundo año de evaluación. Estos resultados sugieren que la condición de alta humedad posterior a la siembra afectó la capacidad del hongo para infectar las raíces de las plántulas de maíz, como lo mencionan Matyac y Kommedahl (1985).

Los valores elevados en la incidencia de la enfermedad en el híbrido inoculado, respecto a la incidencia registrada en las poblaciones de maíz nativo, puede deberse a que no se han incorporado genes de resistencia a la enfermedad dentro del proceso de selección de las líneas parentales del híbrido, mientras que la diversidad genética presente en las colectas de maíz nativo es más amplia y puede expresar ciertos niveles de resistencia como lo mencionan Fehr (1993) y Hallauer *et al.* (2010). Por esta razón, la conservación de la diversidad genética del maíz es crucial para el mejoramiento genético a futuro, debido a que la falta de diversidad genética compromete la posibilidad de generar materiales con mejores rendimientos, la adaptación a condiciones ambientales adversas y el desarrollo de germoplasma resistente a enfermedades (Giordani *et al.*, 2019).

Respecto al análisis de la varianza combinado de la incidencia de carbón de la espiga en 55 genotipos de maíz evaluados durante dos años, se encontró que hubo diferencias altamente significativas para los efectos principales de año, estado y genotipo, pero no hubo efecto de interacción año ×

response of the same native maize populations to ear rot caused by *Fusarium* spp. under natural infection conditions. The differences among the populations and their origin show the phenotypic and genotypic diversity present in the variants of the existing native maize in the states of origin. The significant differences in disease incidence from one evaluation year to another, where the only source of variation was the amount of soil humidity, suggest that there is an inversely proportional relation between soil moisture and disease incidence, which is in agreement with the results obtained by Matyac and Kommedahl (1985).

The comparison of multiple means for years and states, using the Least Minimum Difference test and the logarithm transformation of the variable response to stem head smut incidence, divided the populations into four defined groups (Table 4). The first group included populations from Tlaxcala and the State of Mexico, which had a lower percent of disease incidence. The second group was formed by populations from Oaxaca and Puebla. The third group included only populations from Guerrero, and the last group was the inoculated control, which had the highest incidence mean in the study.

Table 5 shows the results of the comparison of means of the genotypes nested in the states and through the two years. In this analysis, 8 of the 11 populations of native maize from the State of Mexico were not affected by the pathogen in none of their replications, in both evaluations, while 6 of 13 populations from Guerrero had an intermediate incidence equal to or higher than 10%. The resistance of the maize populations from the State of Mexico could be explained by the fact that the disease was first reported in Amecameca (Borlaug, 1946) in teocintle plants and that the maize crops in the region may have been exposed to the pathogen, thus occurring the coevolution between the pathogen and the host. On the other



**Cuadro 3. Análisis de la varianza combinado usando el logaritmo base 10 de la incidencia de carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) en 56 genotipos de maíz colectados en diferentes estados de la república mexicana, evaluados durante dos años (2015-2016).**

**Table 3. Combined analysis of variance using the base 10 logarithm to determine head smut incidence on tassel (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*) in 56 maize genotypes collected in different Mexican states, evaluated for two years (2015-2016).**

Fuente variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Prob.
Modelo	115	0.5359	<0.0001
Año	1	6.9491	<0.0001
Estado	5	4.4818	<0.0001
Rep(año)	4	0.3236	0.2171
Gen(Estado)	50	0.3309	0.0283
Año* Gen(Estado)	55	0.2693	0.1705
Error	219	0.2225	
Total	334		

genotipo (Cuadro 3). Los resultados muestran que las poblaciones (genotipo), el origen y el año de evaluación influyeron en la incidencia del carbón de la espiga del maíz. Diferencias estadísticas significativas del mismo tipo fueron encontradas por Briones-Reyes *et al.* (2015) al evaluar la respuesta de las mismas poblaciones de maíz nativo a la pudrición de mazorca causada por *Fusarium* spp. bajo condiciones de infección natural. Las diferencias entre las poblaciones y el origen de estas muestran la diversidad fenotípica y genotípica presente en las variantes de maíz nativo existente en los estados de origen. Las diferencias significativas entre la incidencia de la enfermedad de un año de evaluación al siguiente, en donde la única fuente de variación fue la cantidad de humedad en el suelo, sugiere una relación inversamente proporcional entre la cantidad de humedad presente en el suelo y la incidencia de la enfermedad, lo que concuerda con lo descrito por Matyac y Kommedahl (1985).

La comparación múltiple de medias para los efectos de años y de estados, usando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa y la transformación logaritmo de la variable respuesta incidencia

hand, the maize populations from Guerrero were the most susceptible to the disease, and this result is in agreement with our initial hypothesis, which is based on observations in the field, where a greater disease susceptibility has been detected in hybrids developed using maize lines from the state of Guerrero (Tuxpeño race) (Dr. Fernando Castillo González, personal communication). Conversely, when the same 55 populations were used to evaluate their response to ear rot caused by *Fusarium* spp., the native maize populations from the State of Mexico showed higher susceptibility to ear rot, as reported by Briones-Reyes *et al.* (2015).

Considering the scale used to classify the populations and the mean separation shown in Table 5, it can be observed that 48 of the 56 evaluated genotypes are within the range of 0-10% incidence, and, therefore, they are considered as highly resistant to the disease. Seven of the evaluated genotypes are within the range of 11-25% incidence, so they are considered as moderately resistant to the disease, and only the inoculated control, which was within the range of 51-75% incidence, was classified as susceptible to head smut. Previous results show

**Cuadro 4. Comparaciones de medias para años y estados, usando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa y la transformación logaritmo de la variable respuesta incidencia de carbón de la espiga.**

**Table 4. Comparison of means for years and states using the Least Significant Difference and logarithm transformation of the variable incidence response to head smut on tassel.**

Año	Media	N <sup>y</sup>	Estado	Media	N
2015	8.434 A <sup>x</sup>	168	Testigo inoculado	57.100 A	6
2016	3.208 B	168	Guerrero	9.812 B	77
DMS <sup>z</sup>	2.096		Oaxaca	5.270 BC	78
			Puebla	4.691 BC	36
			Tlaxcala	2.867 C	72
			Estado de México	0.954 C	66
			DMS	5.529	

<sup>x</sup>Medias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes en base a la prueba de Fisher (LSD, p=0.05); <sup>y</sup> número de observaciones; <sup>z</sup>Diferencia Mínima Significativa. / <sup>x</sup>Means per column with the same letter are not statistically different according to the Fisher's test (LSD, p=0.05); <sup>y</sup>number of observations; <sup>z</sup>Least Significant Difference.

de carbón de la espiga, dividió a las poblaciones en cuatro grupos definidos (Cuadro 4). El primer grupo considera las poblaciones provenientes de Tlaxcala y el Edo. de México, las cuales presentaron los menores porcentajes de incidencia de la enfermedad. El segundo grupo estuvo integrado por las poblaciones de origen en los estados de Oaxaca y Puebla. El tercer grupo lo integraron solo poblaciones originarias de Guerrero y el último grupo fue el testigo inoculado que presentó la incidencia media más alta del estudio.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de las comparaciones de medias para los genotipos anidados dentro de estados y a través de los dos años. En este análisis, se encontró que ocho de las 11 poblaciones de maíz nativo del Estado de México no fueron afectadas por el patógeno en ninguna de sus repeticiones, en ambas evaluaciones, mientras que seis de las 13 poblaciones de Guerrero tuvieron una incidencia media de la enfermedad igual o superior al 10%. La resistencia observada en las poblaciones de maíz del Estado de México podría

that the diversity present in the evaluated maize populations would allow the selection of disease-resistant germplasm. Similarly, the variation of the response of the evaluated materials to the disease makes it clear that the type of resistance to head smut is quantitative. This is demonstrated by the selection method (S1 recurrent) used by De León (2020) to develop open-pollinated varieties resistant to the disease.

The information obtained in the present study is the first exploration of the presence of disease resistance genes in native maize populations, which will allow the disease resistance improvement programs to exclude the populations with a higher incidence percent in both evaluations. The information obtained in this study is meant to encourage the rescue and use of maize native populations, as well as launching improvement programs to develop maize lines genetically resistant to the disease, as Quezada-Salinas *et al.* (2017) have done, and the subsequent development of high-yielding open-pollinated varieties and

**Cuadro 5. Comparaciones de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans), agrupadas por el método de Tukey, para genotipos anidados dentro de estados y a través de los dos años.**  
**Table 5. Comparison of means adjusted by minimum squares (lsmeans) grouped by the Tukey's method for genotypes nested within states and for two years.**

Genotipo	Estado	Media	Genotipo	Estado	Media
100	Testigo inoculado	57.10A <sup>2</sup>	34	Oaxaca	3.70EFGH
19	Guerrero	23.03AB	9	Oaxaca	3.58EFGH
23	Guerrero	20.10BC	51	Estado de México	3.55EFGH
20	Guerrero	15.97BCD	12	Tlaxcala	3.33EFGH
21	Guerrero	14.39CDE	49	Puebla	3.12EFGH
30	Oaxaca	13.19CDEF	17	Oaxaca	2.42EFGH
24	Guerrero	13.04CDEFG	53	Estado de México	2.38FGH
27	Oaxaca	11.44CDEFG	7	Guerrero	2.06GH
25	Guerrero	10.65CDEFG	37	Tlaxcala	1.85GH
36	Puebla	9.40CDEFG	18	Guerrero	1.85GH
22	Guerrero	8.70DEFG	35	Oaxaca	1.66GH
50	Puebla	8.54DEFGH	38	Puebla	1.51GH
10	Oaxaca	6.82DEFGH	55	Guerrero	1.51GH
5	Tlaxcala	6.66DEFGH	13	Tlaxcala	1.38GH
26	Oaxaca	6.47DEFGH	11	Tlaxcala	1.28GH
1	Guerrero	5.90DEFGH	33	Oaxaca	0H
40	Tlaxcala	5.55DEFGH	4	Tlaxcala	0H
16	Puebla	5.55DEFGH	52	Estado de México	0H
54	Guerrero	5.50DEFGH	14	Tlaxcala	0H
6	Guerrero	5.42DEFGH	42	Estado de México	0H
28	Oaxaca	5.25DEFGH	41	Estado de México	0H
31	Oaxaca	5.09DEFGH	44	Estado de México	0H
39	Tlaxcala	4.79DEFGH	45	Estado de México	0H
2	Tlaxcala	4.78EFGH	46	Estado de México	0H
48	Tlaxcala	4.74EFGH	43	Estado de México	0H
29	Oaxaca	4.68EFGH	3	Tlaxcala	0H
8	Estado de México	4.55EFGH	47	Estado de México	0H
32	Oaxaca	4.16EFGH	15	Puebla	0H

<sup>2</sup>Medias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes en base a la prueba de Tukey (p=0.05). / <sup>2</sup>Means per column with the same letter are not statistically different according to Tukey's test (p=0.05).

explicarse considerando que el primer reporte de la enfermedad en México fue en Amecameca, Edo. de México (Borlaug, 1946) en plantas de teocintle, por lo que los maíces de la región habrían estado expuestos al patógeno, ocurriendo así la coevolución entre el patógeno y el hospedante. Por otra parte, las poblaciones de maíz de Guerrero fueron las más susceptibles a la enfermedad, correspondiendo a nuestra hipótesis inicial, generada a partir de observaciones en campo en donde se ha registrado

genetically resistant maize varieties, as the open-pollinated variety CP-Vero1 developed by De León (2020). Finally, it is suggested to continue evaluating native maize germplasm including a greater number of populations classified by race, conducting simultaneous evaluations under different environments, and molecular studies, to ensure the presence of resistance genes in the populations to be used as possible sources of resistance to head smut.

una mayor susceptibilidad a la enfermedad en híbridos generados a partir de líneas provenientes del estado de Guerrero (Raza Tuxpeño) (comunicación personal Dr. Fernando Castillo González). En caso contrario, cuando las mismas 55 poblaciones fueron evaluadas en su respuesta a la pudrición de mazorca por *Fusarium* spp., las poblaciones de maíces nativos provenientes del Edo. de México mostraron una mayor susceptibilidad a la pudrición de mazorca como lo reportaron Briones-Reyes *et al.* (2015).

Considerando la escala empleada para la clasificación de las poblaciones y la separación de medias mostrada en el Cuadro 5 se puede observar que 48 de los 56 genotipos evaluados se encuentran dentro del rango de 0 a 10% de incidencia de la enfermedad, por lo que se consideran altamente resistentes a la enfermedad. Siete de los genotipos evaluados se encuentran en el rango entre el 11 y el 25% de incidencia de la enfermedad, considerándose moderadamente resistentes a la enfermedad y solo el testigo inoculado se ubicó entre el rango de 51 y 75% de incidencia de la enfermedad clasificándose como susceptible al carbón de la espiga del maíz. Los resultados anteriores demuestran que la diversidad presente en las poblaciones de maíz evaluadas permitiría la selección de germoplasma resistente a la enfermedad. De igual forma, la variación en la respuesta a la enfermedad en los materiales evaluados hace evidente que el tipo de resistencia a esta enfermedad es de tipo cuantitativo. Lo anterior se corrobora por el método de selección (S1 recurrente) empleado por De León (2020), para la generación de variedades de polinización libre con resistencia a la enfermedad.

La información obtenida en el presente estudio es la primera exploración sobre la presencia de genes de resistencia a la enfermedad en maíces nativos, que permiten excluir de un programa de mejoramiento para resistencia a la enfermedad a aquellas poblaciones que presentaron un mayor

## CONCLUSIONS

There is variation in the response of native maize germplasm to *S. reilianum* f. sp. *zea*. infection depending on its geographical origin. The variation of the populations response to the infection suggests the presence of genes for resistance to the pathogen in the populations that were not affected by the disease. The native maize from Guerrero was more susceptible to the disease, while maize collected in the States of Mexico and Tlaxcala was more resistant. The high-soil humidity levels in the first development stages of the crop reduces the disease incidence.

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

porcentaje de incidencia en ambas evaluaciones. La información generada en el presente estudio pretende incentivar el rescate y uso de los materiales nativos de maíz, así como incentivar el inicio de programas de mejoramiento para el desarrollo de líneas con resistencia genética a la enfermedad como lo han hecho Quezada-Salinas *et al.* (2017) y la subsecuente generación de variedades de polinización libre con alto rendimiento y resistencia genética a la enfermedad, como la variedad de polinización libre CP-Vero1 generada por De León (2020). Finalmente, se sugiere continuar la evaluación de germoplasma nativo de maíz considerando un mayor número de poblaciones clasificadas por raza, evaluaciones simultaneas bajo diferentes ambientes y estudios moleculares para asegurar la presencia de genes resistencia en las poblaciones que pretendan usarse como posibles fuentes de resistencia a la enfermedad.

## CONCLUSIONES

Existe variación en la respuesta de germoplasma nativo de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, dependiendo de su origen geográfico. La variación en la respuesta de las poblaciones a la infección sugiere la presencia de genes de resistencia al patógeno en las poblaciones que no fueron afectadas por la enfermedad. Los maíces nativos de Guerrero mostraron una mayor susceptibilidad a la enfermedad, mientras que los maíces colectados en el Estado de México y Tlaxcala presentaron la mayor resistencia. La condición de alta humedad en el suelo en las primeras etapas del desarrollo del cultivo reduce la incidencia de la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A and Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 39–49. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004)
- Arteaga MC, Moreno-Letelier A, Mastretta-Yanes A, Vázquez-Lobo A, Breña-Ochoa A, Moreno-Estrada A, Eguarte LE and Piñero D. 2016. Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.002>
- Bennetzen JL and Hake S. 2009. *Handbook of maize: Genetics and genomics*. New York, USA. 798p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77863-1>
- Borlaug NE. 1946. Diseases of teosinte in Mexico. *Phytopathology* 36: 395. <https://apsjournals.apsnet.org/loi/phyto>
- Briones-Reyes D, Castillo-González F, Chávez-Servia JL, Aguilar-Rincón VH, De León-García de Alba CDL y Ramírez-Hernández A. 2015. Respuesta del maíz nativo del Altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 73–85. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16922>
- De León C. 2008. Enfermedades importantes. Pp: 47–62. In: Rodríguez-Montessoro R. y De León C. (Eds.). *El cultivo del maíz. Temas selectos Vol. 1*. Mundi-Prensa, México D.F., México. 127p. <https://books.google.com.mx/books?id=CrZQYgEACAAJ&dq=El+cultivo+del+ma%C3%ADz.+Temas+selectos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwitiOmwwITpAhVfB60KHR9LDuQQ6AEIJzAA>
- De León-García de Alba C. 2020. CP-Vero 1, white maize (*Zea mays*) synthetic variety resistant to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) for Mexican highlands. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 170–175. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-2>
- Fehr WR. 1993. *Principles of cultivar development. Theory and technique Vol. 1*. Macmillan, Ames, Iowa. 536 p. [https://lib.dr.iastate.edu/agron\\_books/](https://lib.dr.iastate.edu/agron_books/)
- Frederiksen RA. 1977. Head smuts of corn and sorghum. Pp. 89–105. In: A. S. T. Association. (Ed.). *Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf. 32nd*. Washington, D.C. <http://eprints.icrisat.ac.in/5708/>
- Gardes M and Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113–118. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- Ghareeb H, Becker A, Iven T, Feussner I and Schirawski J. 2011. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology* 156(4): 2037–2052. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179499>
- Giordani W, Scapim CA, Ruas PM, Ruas C de F, Contreras-Soto R, Coan M, Fonseca IC De B and Gonçalves LSA. 2019. Genetic diversity, population structure and AFLP markers associated with maize reaction to southern rust. *Bragantia* 78(2): 183–196. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20180180>
- Goodman MM and Brown WL. 1988. Races of Corn. Pp:33–79. In: *Corn and Corn Improvement-Agronomy Monograph No. 18*, 3rd edition. ASA-CSSA-SSSA. Wisconsin, USA. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr18.3ed.c2>
- Griekspoor, A. and Groothuis, T. 1994. 4Peaks by A. <https://nucleobytes.com/>
- Hallauer AR, Carena MJ and Miranda-Filho JB. 2010. *Quantitative genetics in maize breeding*. Springer (Second Edition). New York, USA. 663p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0>
- Kirby KS. 1965. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochemical Journal* 96: 266–269. <https://doi.org/10.1042/bj0960266>
- Leyva-Madrigal KY, Báez-Astorga PA, Negrete-Yankelevich S, Núñez-de la Mora A, Amescua-Villela G and Maldonado-Mendoza IE. 2020. Maize genetic diversity in traditionally cultivated polycultures in an isolated rural community in Mexico: implications for management and sustainability. *Plant Ecology and Diversity* 13(1): 15–28. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1708985>
- Lübberstedt T, Xia XC, Tan G, Liu X and Melchinger AE. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 593–598. <https://doi.org/10.1007/s001220051273>
- Márquez-Licona G, Leyva-Mir SG, De León C, Hernández-Vargas M, Téliz-Ortiz D, Kolařík M and Castillo-González F. 2018. Artificial inoculation of maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Maydica* 63: 1–8. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1593/1096>
- Martínez C, Roux C and Dargent R. 1998. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Biochemistry and Cell Biology* 89(3):



- 247–253. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.247>
- Martínez C, Buée M, Jauneau A, Bécard G, Dargent R and Roux C. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant and Soil* 236: 145–153. <https://doi.org/10.1023/A:1012776919384>
- Martínez C, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94(3): 505–514. <https://doi.org/10.2307/3761784>
- Martínez RJL y Ledezma MJ. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint., del maíz en el Valle de Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 68–70. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-de-fitopatologia/articulo/control-quimico-del-carbon-de-la-espiga-sphacelotheca-reiliana-kuhn-clint-del-maiz-en-el-valle-de-zapopan-jalisco>
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez JG, Buckler E and Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9): 6080–6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75: 577–581. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-577>
- Matyac CA and Kommedahl T. 1986. Survival of teliospores of *Sphacelotheca reiliana* in soil. *Phytopathology* 76: 487–490. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Abstracts/Phyto76\\_487.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Abstracts/Phyto76_487.htm)
- Mendoza JR, Kok CR, Stratton J, Bianchini A, and Hallen-Adams H-E. 2017. Understanding the mycobiota of maize from the highlands of Guatemala, and implications for maize quality and safety. *Crop Protection* 101: 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.009>
- O'Donnell K, Cigelnik E and Nirenberg HI. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026933>
- Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M. 2012. The UGENE team. *Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit*. *Bioinformatics* 28: 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Osorio JA and Frederiksen RA. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. *Plant Disease* 82(11): 1232–1236. <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.11.1232>
- Pereira GS, Pinho RGV, Pinho EVRV, Pires LPM, Bernardo Junior LAY, Pereira JLA and Melo MP. 2017. Selection of maize inbred lines and gene expression for resistance to ear rot. *Genetics and Molecular Research* 16(3): 1–21. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039415>
- Potter AA. 1914. Head smut of sorghum and maize. *Journal of Agricultural Research* 2(5): 339–380. <https://jar.punjab.gov.pk/>
- Quezada-Salinas A, De León-García de Alba C, Hernández-Anguiano AM and Nava Díaz C. 2013. Evaluation of inoculation methods on maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Mexican Journal of Phytopathology* 31(2): 80–90. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1705-2>
- Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Solano-Báez AR. 2017. Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 534–548. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1705-2>
- Rivas-Valencia P, Virgen-Vargas J, Rojas Martínez I, Cano Salgado A y Ayala Escobar V. 2011. Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6) 845–854. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S2007-09342011000600004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S2007-09342011000600004)
- SAS Institute Inc. 2013. SAS® 9.4 Statements Reference. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?jsessionid=239E4F5E2E39CF2164C9BAD96900EA01?doi=10.1.1.353.6870&rep=rep1&type=pdf>
- Schirawski J, Mannhaupt G, Münch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, Di Stasio M, Rössel N, Mendoza-Mendoza A, Pester D, Müller O, Winterberg B, Meyer E, Ghareeb H, Wollenberg T, Münsterkötter M, Wong P, Walter M, Stukenbrock E, Güldener U and Kahmann R. 2010. Pathogenicity Determinants in Smut. *Science* 330(610): 1546–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1195330>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. (Consulta, marzo 2020). [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do)
- Ványk K. 2012. *Smut Fungi of the World*. APS Press. The American Phytopathology Society. Minnesota. USA. 1458p. <https://books.google.com.mx/books?id=pvkmwAACAAJ&dq=Smut+Fungi+of+the+World&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj02MrVw4TpAhVEI6wKHWeZANQ6AEIJzAA>
- Wang ZH, Li XH, Xie CX, Li MS, Hao ZF, George MLC, Xiao MJ, Gao SR and Zhang SH. 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. *Maydica* 53: 47–54. [https://www.researchgate.net/publication/287691769\\_Genetic\\_diversity\\_in\\_a\\_collection\\_of\\_Chinese\\_maize\\_inbred\\_lines\\_for\\_resistance\\_to\\_head\\_smut\\_caused\\_by\\_Sporisorium\\_reiliana](https://www.researchgate.net/publication/287691769_Genetic_diversity_in_a_collection_of_Chinese_maize_inbred_lines_for_resistance_to_head_smut_caused_by_Sporisorium_reiliana)
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 23–26. <https://doi.org/10.1080/01140671.2006.9514383>
- Xu ML, Melchinger AE and Lübberstedt T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Disease* 83: 390–395. <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.4.390>

# Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops

## Caracterización polifásica de *Burkholderia gladioli* aislada de cebolla y evaluación de su patogenicidad potencial para otros cultivos

María Serret-López, <sup>1</sup>Programa de Edafología, <sup>2</sup>Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; <sup>3</sup>Sergio Aranda-Ocampo, <sup>1</sup>David Espinosa-Victoria<sup>†\*</sup>, <sup>2</sup>Luis Enrique Ortiz-Martínez, <sup>2</sup>Karina Ramírez-Razo.  
\*Autor para correspondencia: despinos@colpos.mx

Recibido: 15 de Julio, 2020.

Aceptado: 10 de Septiembre, 2020.

Serret-López M, Aranda-Ocampo S, Espinosa-Victoria D<sup>†</sup>, Ortiz-Martínez LE and Ramírez-Razo K. 2021. Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 21-40.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-2>

Primera publicación en línea: 08 de Octubre, 2020.

First publication on line: October 08, 2020.

**Resumen.** Los individuos del género *Burkholderia*, *sensu lato*, se caracterizan por colonizar diversos nichos ecológicos. Esta investigación tuvo como objetivos caracterizar morfológica, fisiológica, bioquímica y molecularmente a *Burkholderia gladioli*, aislada de bulbos podridos de cebolla blanca (*Allium cepa*), y determinar su potencial como patógeno de otras especies vegetales. *Burkholderia*

**Abstract.** Individuals of the genus *Burkholderia*, *sensu lato*, are characterized by colonizing various, ecological, niches. The purpose of this research was to characterize *Burkholderia gladioli* morphologically, physiologically, biochemically, and molecularly, isolated from rotten onion bulbs, and to determine its potential as a pathogen of other plant species. *B. gladioli* also promoted soft rot in purple onion bulbs (*Allium cepa*), leek stalks (*A. ampeloprasum*), inflorescences of broccoli (*Brassica oleracea*), cladodes of cactus (*Opuntia indica*), carrot roots (*Daucus carota*), ginger rhizomes (*Zingiber officinale*) and mushroom sporocarps (*Agaricus bisporus*). *B. gladioli* colonized bean plants (*Phaseolus vulgaris*) in a greenhouse, and showed natural resistance *in vitro* to copper: agricultural cuprimycin, cuprimycin 500, phyton, copper oxychloride; antibiotics: bactrol, agricultural bactriomicin, kasumin, final bacter, quartz and biological: serenade powder, fungifree

*gladioli* promovió, igualmente, la pudrición blanda en bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea*), cladodios de nopal (*Opuntia indica*), raíces de zanahoria (*Daucus carota*) y esporocarpos de champiñón (*Agaricus bisporus*). *Burkholderia gladioli* colonizó plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en invernadero y mostró resistencia natural *in vitro* a productos a base de cobre: cuprimicin agrícola, cuprimicin 500, phyton, oxiclورو de cobre; antibióticos: bactrol, bactriomicin agrícola, kasumin, final bacter, quartz y biológicos: serenade polvo, fungifree y bacterbest. Este estudio reporta por primera vez la caracterización polifásica de *B. gladioli* en México. Este aislado bacteriano creció a pH 4.0 y 42 °C, lo que podría conferirle habilidad competitiva en suelos ácidos y condiciones semiáridas. Se demostró que tiene un amplio rango de hospederos en condiciones postcosecha, además de ser resistente a diferentes productos usados en campo para el control de fitopatógenos.

**Palabras clave:** Postulados de Koch, pudrición del bulbo, rango de hospederos.

*Burkholderia, sensu lato*, comprende, bacterias Gram negativas, incluidas en la subdivisión  $\beta$  proteobacteria (Sousa *et al.*, 2011). Originalmente, se encontraba agrupada dentro del género *Pseudomonas*, pero con base en el análisis de secuencia 16S rARN, homología ADN-ADN, composición de ácidos grasos y características fenotípicas se reagrupó como género *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992).

*Burkholderia* es un género bifuncional debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, mientras que otras establecen asociaciones simbiótico-pato-

and bacterbest. This study reports for the first time the polyphasic characterization of *B. gladioli* in Mexico. This bacterial species grew at pH 4.0 and 42 °C, which could give it competitive ability in acid soils and semi-arid conditions. It is shown that it had a wide range of hosts in postharvest conditions, in addition to being resistant to different products used in the field for phytopathogens control.

**Key words:** Koch postulates, bulb rot, host range.

*Burkholderia, sensu lato*, comprises Gram negative, bacteria included in the  $\beta$  proteobacteria subdivision (Sousa *et al.*, 2011). It was originally grouped in the *Pseudomonas* genus, yet based on the analysis of the sequence 16S rARN, DNA-DNA homology, composition of fatty acids and phenotypical characteristics, it was regrouped as the *Burkholderia* genus (Yabuuchi *et al.*, 1992).

*Burkholderia* is a bifunctional genus, because some species establish symbiotic-mutualist associations with plants, whereas others establish symbiotic-pathogenic associations with plants, animals and humans (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). *Burkholderia gladioli* was first isolated from gladiolus bulbs (*Gladiolus* sp.), and later from iris (*Iris* sp.), summer snowflake (*Leucojum aestivum*), saffron (*Crocus sativus*), maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) (Mirghasempour *et al.*, 2018). It was recently isolated from orchid species of the genera *Dendrobium*, *Oncidium* and *Miltonia* (Keith and Thammakijjawat, 2019), and it can therefore be considered a reemerging pathogen.

*B. gladioli* is subdivided into four pathovers: *B. gladioli* pv. *agaricicola*, causal agent of rotting in mushroom; *B. gladioli* pv. *alliicola*, which causes rotting of the bulb in onion; *B. gladioli* pv. *gladioli*, causal agent of rotting in the gladiolus bulb; and *B. gladioli* pv. *cocovenenans*, which generates severe

génicas con plantas, animales y humanos (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). *Burkholderia gladioli* se aisló por primera vez de bulbos de gladiolo (*Gladiolus* sp.), y posteriormente de iris (*Iris* sp.), copo de nieve (*Leucojum aestivum*), azafrán (*Crocus sativus*), maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) (Mirghasempour *et al.*, 2018). Recientemente, fue aislada de especies de orquídeas de los géneros *Dendrobium*, *Oncidium* y *Miltonia* (Keith y Thammakijawat, 2019), por lo que puede considerarse como un patógeno reemergente.

*B. gladioli* se encuentra subdividida en cuatro patovares: *B. gladioli* pv. *agaricola*, agente causal de la pudrición del champiñón; *B. gladioli* pv. *alliicola*, que ocasiona la pudrición del bulbo de cebolla; *B. gladioli* pv. *gladioli*, agente causal de la pudrición del gladiolo; y *B. gladioli* pv. *cocovenans*, que genera intoxicación alimentaria severa como resultado de la ingestión de productos de soya y coco infectados con esta bacteria (Lee *et al.*, 2016).

Actualmente, se conoce muy poco de la ocurrencia de *B. gladioli* en México, y de las características fisiológicas y bioquímicas de este fitopatógeno. Solo existe una nota científica (Félix-Gastélum *et al.*, 2017) en la que se reporta a *B. gladioli* como agente causal de pudrición en cebolla en Sinaloa, México.

Por otra parte, México se encuentra dentro de los principales productores de cebolla (*Allium cepa*). A nivel mundial, ocupa el treceavo lugar con 1,620,318 t (FAOSTAT, 2017). A nivel nacional, Chihuahua (334,309.89 t), Zacatecas (18,758.38 t) y Guanajuato (176,700.99 t), son los estados con mayor producción de cebolla (SIAP, 2018). Sin embargo, este cultivo presenta diversos problemas fitosanitarios postcosecha, destacando la pudrición del bulbo, asociada generalmente a *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. ambifaria*, *B. pirrocynia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Serratia plymuthica*, *Pseu-*

food intoxication due to the ingestion of soybean and coconut products infected with this bacterium (Lee *et al.*, 2016).

Little is currently known on the occurrence of *B. gladioli* in Mexico or on the physiological and biochemical characteristics of this phytopathogen. There is only one scientific note (Félix-Gastélum *et al.*, 2017) in which *B. gladioli* is reported as a causal agent of onion rotting in Sinaloa, Mexico.

On the other hand, Mexico is one of the leading producers of onion (*Allium cepa*). Worldwide, it is number thirteen, with 1, 620, 318 t (FAOSTAT, 2017). Nationwide, Chihuahua (334, 309.89 t), Zacatecas (183, 758.38 t) and Guanajuato (176, 700.99 t) are the states with the highest onion production (SIAP, 2018). However, this crop presents several postharvest phytosanitary problems, particularly the rotting of the bulb, generally related to *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. ambifaria*, *B. pirrocynia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas marginalis*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *Pantoea ananatis* and *Enterobacter cloacae* (Kowalska *et al.*, 2015).

The aim of the present study was to characterize, using a polyphasic approach, *B. gladioli*, the causal agent of soft rotting of the white onion bulb, as well as to determine its potential as a pathogenic agent of other plant species. Given that *B. gladioli* is able to colonize different ecological niches and to present several virulence factors, we hypothesized that this bacterium is not only the causal agent of white rotting in the bulb of white onion, but also a potential pathogen of different plant species.

## MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out in three phases. The first consisted in the isolation, morphological



*domonas marginalis*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *Pantoea ananatis* y *Enterobacter cloacae* (Kowalska *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar con un enfoque polifásico a *B. gladioli*, el agente causal de la pudrición blanda del bulbo de la cebolla blanca, así como determinar su potencial como agente patogénico de otras especies vegetales. Dado que *B. gladioli* es capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos y presentar múltiples factores de virulencia, se hipotetizó que esta bacteria, además de ser el agente causal de la pudrición blanda en bulbo de la cebolla blanca, es también un patógeno potencial de diferentes especies vegetales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en tres fases: La primera consistió en el aislamiento, caracterización morfológica, pruebas fisiológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación del aislamiento bacteriano; la segunda y la tercera consistieron en la inoculación de diferentes estructuras vegetales y plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones controladas, para determinar su potencial infectivo.

**Material biológico.** Se analizaron bulbos de cebolla blanca (*Allium cepa*) variedad Carta blanca, con síntomas de pudrición blanda, procedentes de la comunidad de San Vicente Chicoloapan, Estado de México, localizada en las coordenadas Latitud N 19° 24' 49" y longitud W 98° 53' 8.29".

Se utilizaron también bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), cladodios de nopal (*Opuntia indica*), raíces de zanahoria (*Daucus carota*), rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*), inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea*), esporocarpos de champiñón (*Agaricus*

characterization, physiological and molecular tests to identify the bacterial isolation. The second and third consisted in the inoculation of different plant structures and bean plants (*Phaseolus vulgaris*) under controlled conditions to determine its infective potential.

**Biological material.** We analyzed bulbs from white onions (*Allium cepa*) of the Carta blanca variety with soft rot symptoms from the town of San Vicente Chicoloapan, State of Mexico, located on latitude N 19° 24' 49" and longitude W 98° 53' 8.29".

Bulbs from red onion (*A. cepa*), leek (*A. ampeloprasum*) stalks, cactus (*Opuntia indica*) cladodes, carrot (*Daucus carota*) roots, ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes, broccoli (*Brassica oleracea*) inflorescences, mushroom (*Agaricus bisporus*) sporocarps and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds were also used to evaluate the ability of colonization and the pathogenicity of the bacterial isolation.

**Isolation and morphological characterization of the phytopathogen.** The external cataphylls of onion bulbs with signs of soft rotting were cut longitudinally. The bacterial flow was observed using distilled water under a light microscope at 10X. A bacterial sample was taken, then planted in King's B medium and incubated at 28 °C for 48 h. The bacterial culture was morphologically characterized under the stereoscopic microscope. Afterwards, hypersensitivity tests were performed on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* "xanthi") aged four months, as well as on the rotting of potato tubers (*Solanum tuberosum*) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

**Koch Postulates.** The isolated strain was inoculated on healthy tissue from white onion,



*bisporus*) y semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) para evaluar la capacidad de colonización y patogenicidad del aislamiento bacteriano.

**Aislamiento y caracterización morfológica del fitopatógeno.** Las catáfilas externas de bulbos de cebolla con síntomas de pudrición blanda, se cortaron longitudinalmente. Posteriormente, se observó el flujo bacteriano del tejido con agua destilada estéril en microscopio óptico a 10X. Se tomó una asada, se sembró en medio B de King y se incubó a 28 °C por 48 h. La colonia bacteriana se caracterizó morfológicamente al microscopio estereoscópico. Posteriormente, se realizaron las pruebas de reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* “xanthi”) de cuatro meses de edad y pudrición en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

**Postulados de Koch.** La cepa aislada, se inoculó en tejido sano de cebolla blanca variedad Carta blanca, mediante la aplicación de 0.5 mL de una suspensión acuosa con  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, ajustándola mediante la escala de McFarland (McFarland, 1907). Como testigos, se inocularon cuatro rodajas de cebolla blanca sana con 0.5 mL de agua destilada estéril, y se colocaron en cámara húmeda a 28 °C. La pudrición de las catáfilas se evaluó 48 h después de la inoculación. Una muestra del exudado del tejido con pudrición se sembró en medio B de King por 48 h. Posteriormente, se observó el crecimiento bacteriano en el microscopio estereoscópico, se seleccionó una colonia desarrollada aisladamente, la cual se transfirió en los medios de cultivo de B de King, MacConkey y Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

**Caracterización fisiológica y bioquímica.** Se realizaron las siguientes pruebas fisiológicas y bioquímicas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reacción

variety Carta blanca, with the application of 0.5 mL of an aqueous suspension with  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, adjusting it using McFarland’s scale (McFarland, 1907). As controls, four slices of healthy white onion were inoculated with 0.5 mL of sterilized distilled water and placed in a wet chamber at 28 °C. The rotting of the cataphylls was evaluated 48 h after inoculation. A sample of the exudate of the tissue with rotting was planted in King’s B medium for 48 h. Later, the bacterial growth was observed under the stereoscopic microscope, and a bacterial colony grown in isolation was selected and transferred to culture media King’s B, MacConkey, and Congo Red (Rodríguez, 1982).

**Physiological and biochemical characterization.** The following physiological and biochemical tests were carried out: Gram stain, oxidase, catalase, KOH reaction, nitrate reduction, oxidative-fermentative metabolism, gel liquefaction, arginine hydrolysis, levana production, starch hydrolysis and use of carbon sources following the methodology described by Shaad (2001). The bacterial growth was registered in a pH of 4 to 10 (Estrada de los Santos *et al.*, 2013) and temperatures of 30 to 43 °C (Kowalska *et al.*, 2015).

**DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR).** Bacterial DNA extraction was carried out using the CTAB method quoted by Doyle and Doyle (1990), modified by washing with sodium acetate 3 M. The quantity and quality of the DNA was evaluated by spectrophotometry in Nanodrop 126 (ND-1000, Nanodrop Technologies).

For the amplification of the gene 16S rRNA, the universal primers 8 F (5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) and 1492 R (5’GGTACCTTGTTACGACTT-3’) (Galkiewicz and Kellogg, 2008) were used. The amplification of gene 16S rRNA was carried out

KOH, reducción de nitratos, metabolismo oxidativo-fermentativo, licuefacción de gelatina, hidrólisis de arginina, producción de levana, hidrólisis del almidón y utilización de fuentes de carbono siguiendo la metodología descrita por Shaad (2001). Se registró el crecimiento de la bacteria a pH de 4 a 10 (Estrada de los Santos *et al.*, 2013) y a temperaturas de 30 a 43 °C (Kowalska *et al.*, 2015).

**Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Se realizó la extracción de ADN bacteriano utilizando el método de CTAB citado por Doyle y Doyle (1990), con la modificación de lavado con acetato sodio 3 M. La calidad y cantidad del ADN se evaluó por espectrofotometría en Nanodrop 126 (ND-1000, Nanodrop Technologies).

Para la amplificación del gen 16S rARN se utilizaron los iniciadores universales 8 F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Galkiewicz y Kellogg, 2008). La amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, en un volumen final de reacción de 25 µL: se realizó una desnaturalización inicial del ADN a 95 °C por 5 min, en seguida 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 54 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 8 min. El fragmento amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio, a 85 volts durante 60 min. El fragmento resultante se observó con luz ultravioleta en un fotodocumentador Biologing Systems modelo Epi Chemi II Darkroom. Posteriormente, el producto fue secuenciado por la empresa MacroGen en Korea.

**Árbol filogenético.** Para confirmar la identidad de la bacteria se realizó el ensamble de las secuencias forward y reverse mediante el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). La secuencia con-

under the following conditions, in a final reaction volume of 25 µL: an initial DNA denaturalization was carried out at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 54 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 8 min. The amplified fragment was separated by electrophoresis in 2% agarose gel, with ethidium bromide at 85 volts for 60 min. The resulting fragment was observed under ultraviolet light in a Biologing Systems photodocumenter, model Epi Chemi II Darkroom. Later, the product was sequenced by the MacroGen company in Korea.

**Phylogenetic tree.** To confirm the identity of the bacteria, the assembly of the forward and reverse sequences were assembled using the software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). The consensus sequence was compared with the sequences registered in the Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). To create the phylogenetic tree, the partial sequences of gene 16S rARN were discharged from the GenBank from *B. gladioli* (MN559413), *B. cepacia* (AF097530), *B. ambifaria* (AF043302), *B. plantarii* (AB183679) and *B. glumae* (NR\_029211), *Paraburkholderia graminis* (NR\_029213), *Pseudomonas viridiflava* (NR\_117825), *P. fluorescens* (NR\_113647) and *P. aeruginosa* (NR\_113599), using *Agrobacterium tumefaciens* (NR\_115516) as an out-of-group species. The multiple alignment of sequences was carried out with the MUSCLE option. The phylogenetic tree was obtained using the method of *Maximum Likelihood* (ML) with 500 bootstrap repetitions, based on the Tamura-Nei model (TN93+G). The model used was obtained using a model test, and according to the Bayesian Information Criterion (BIC), the one that best describes the base substitution pattern was chosen.

senso se comparó con las secuencias registradas en el Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para realizar el árbol filogenético se descargaron del GenBank las secuencias parciales del gen 16S rARN de *B. gladioli* (MN559413), *B. cepacia* (AF097530), *B. ambifaria* (AF043302), *B. plantarii* (AB183679) y *B. glumae* (NR\_029211), *Paraburkholderia graminis* (NR\_029213), *Pseudomonas viridiflava* (NR\_117825), *P. fluorescens* (NR\_113647) y *P. aeruginosa* (NR\_113599), utilizando como especie fuera de grupo a *Agrobacterium tumefaciens* (NR\_115516). El alineamiento múltiple de secuencias se efectuó con la opción MUSCLE. El árbol filogenético se obtuvo mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML) con 500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Tamura-Nei (TN93+G). El modelo utilizado se obtuvo mediante una prueba de modelos y de acuerdo con el criterio de información bayesiana (BIC), se eligió el que mejor describió el patrón de sustitución de bases.

**Microscopía electrónica de barrido.** Se utilizó una colonia del aislamiento bacteriano, con 72 h de crecimiento en medio B de King a 28 °C, para la observación de la morfología colonial en microscopía electrónica de barrido. Se tomó una pequeña muestra bacteriana y se fijó en glutaraldehído al 3%. Posteriormente, se enjuagó con el amortiguador de fosfato sorense (0.1 M), a pH de 7.2 durante 10 min. Transcurridas 24 h, se repitió este procedimiento dos veces más. A continuación, se deshidrató con alcohol a las siguientes concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Se dejó reposar en cada concentración durante 30 min. El proceso se repitió únicamente con la concentración al 100%. Posteriormente, se realizó el secado de la muestra hasta alcanzar el punto crítico, utilizando el desecador Samdri-780A® (USA, 2007). En seguida, el

**Scanning electron microscopy.** A colony from the bacterial isolation was used, with 72 h growth in King's B medium at 28 °C for the observation of the culture's morphology under a scanning electron microscope. A small bacterial sample was taken and fixed in 3% glutaraldehyde. It was then rinsed with Sorensen's phosphate buffer (0.1 M), at a pH of 7.2 for 10 min. After 24 h, this procedure was carried out twice. It was then dehydrated with alcohol at concentrations of 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%. It was left to rest in each concentration for 30 min. The process was only repeated with a concentration of 100%. Later, the sample was dried until it reached the critical point using the Samdri-780A® drier (U.S.A., 2007). Next, the specimen was placed on a slide using a brush under a stereoscopic microscope. The sample was then covered in gold using the FINE COAT (Ion sputter JFC-1100) equipment. Finally, the bacterial morphology was observed with the AXS Microanalysis software for the scanning electron microscope (Oxford instruments INCA x-act 2009).

**Inoculation of the bacterial isolation in plant structures under laboratory conditions.** Red onion (*A. cepa*) bulbs, leek (*A. ampeloprasum*) stalks, cactus (*O. indica*) cladodes, carrot (*D. carota*) roots, ginger (*Z. officinale*) rhizomes, broccoli (*B. oleracea* var. *italica*) inflorescences and mushroom (*A. bisporus*) sporocarps were disinfested using sodium hypochlorite (NaClO) at 2% for 2 min, and then with 70% ethanol for 1 min, followed by three washings with sterile distilled water. Finally, they were dried on sterilized paper towels for 10 minutes. Then, they were injected with 0.5 mL of bacterial inoculant at a density of  $3.0 \times 10^8$  UFC, adjusted using McFarland's scale. In the controls, the bacterial inoculant was substituted with sterile distilled water. Afterwards, the plant structures were placed in humid chambers and the

espécimen se colocó en un porta-muestra, con ayuda de un pincel, bajo el microscopio estereoscópico. Después, la muestra se cubrió con oro en el equipo FINE COAT (Ion sputter JFC-1100). Por último, se observó la morfología bacteriana con ayuda del software de Microanálisis AXS para microscopio electrónico de barrido (Oxford instruments INCA x-act 2009).

**Inoculación del aislamiento bacteriano en estructuras vegetales bajo condiciones de laboratorio.** Bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), cladodios de nopal (*O. indica*), raíces de zanahoria (*D. carota*), rizomas de jengibre (*Z. officinale*), inflorescencias de brócoli (*B. oleracea* var. *italica*) y esporocarpos de champiñón (*A. bisporus*), se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% por 2 min, enseguida con etanol al 70% durante 1 min, luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Finalmente, se secaron sobre papel absorbente estéril durante 10 min. Posteriormente, se inyectaron con 0.5 mL de inóculo bacteriano, a una densidad de  $3.0 \times 10^8$  UFC, ajustada mediante la escala de McFarland. En los testigos, el inóculo bacteriano se sustituyó con agua destilada estéril. En seguida, las estructuras vegetales fueron colocadas en cámaras húmedas y se evaluó el daño a las 48 h. Para determinar la severidad, se elaboró una escala del 0 al 5 de acuerdo con el grado de maceración 0, 20, 40, 60, 80 y 100%, respectivamente (Liao *et al.*, 1986). Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, y después se compararon las medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se usó el programa SAS, Versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

**Inoculación del frijol con el aislamiento bacteriano bajo condiciones de invernadero.** Se

damage was evaluated after 48 h. To determine the severity, a scale of 1 to 5 was created for the degree of maceration: 0, 20, 40, 60, 80 and 100%, respectively (Liao *et al.*, 1986). A completely random design was used, with four repetitions per treatment. With the data obtained, an ANOVA was carried out, and the means of the treatments were then compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). The program used was SAS, Version 9.0 (SAS Institute, 2002).

**Inoculation of bean with the bacterial isolation under greenhouse conditions.** Each bean seed was germinated in a 1 L container with Peat Moss and Agrolite (75:25). A bacterial suspension of the pathogen was inoculated at a concentration of  $3.0 \times 10^9$  UFC in four plants, 10 days after germination; likewise, four plants were left as negative controls (Falcao *et al.*, 2004). A completely random design was used, with four repetitions per treatment. With the data obtained, an ANOVA was carried out, and the means of the treatments were then compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). The SAS program, version 9.0 (SAS Institute, 2002) was used.

**In vitro sensitivity to chemical and biological products.** A bacterial isolation sensitivity test was carried out using the method of diffusion in agar (Matuschek *et al.*, 2014), on the following chemical products: agricultural cuprimicin (200 g/100 L), serenade powder (1 Kg/200 L), bactrol 2X (60 g/100 L), agricultural bactriomicin (400 g/100 L), biological fungifree (2.5 Kg/200 L), cuprimicin 500 (625 g/100 L), phyton (1.5 mL/1 L), copper oxychloride (400 g/100 L), kasumin (2 L/200 L), final bacter (1.6 Kg/200 L), quatz (400 g/100 L), biological bacterbest (1 L/200 L) and biological biotermin (3 L/200 L). As a control, we used sterile distilled water. We placed 200  $\mu$ L of an aqueous solution of the bacterial isolation

germinó cada semilla de frijol, en un contenedor de 1 L con Peat Moss y Agrolita (75:25). Se inoculó una suspensión bacteriana del patógeno a una concentración de  $3.0 \times 10^9$  UFC en cuatro plantas a los 10 días después de la germinación, asimismo, se dejaron cuatro plantas como testigo negativo (Falcao *et al.*, 2004). Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, comparando las medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se usó el programa SAS, Versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

**Sensibilidad *in vitro* a productos químicos y biológicos.** Se realizó una prueba de sensibilidad del aislamiento bacteriano por el método de difusión en agar (Matuschek *et al.*, 2014), a los siguientes productos químicos: cuprimicin agrícola (200 g/100 L), serenade polvo (1 Kg/200 L), bactrol 2X (60 g/100 L), bactriomicin agrícola (400 g/100 L), fungifree biológico (2.5 Kg/200 L), cuprimicin 500 (625 g/100 L), phyton (1.5 mL/1 L), oxiclورو de cobre (400 g/100 L), kasumin (2L/200 L), final bacter (1.6 Kg/200 L), quatz (400 g/100 L), bacterbest biológico (1L/200 L) y biotermin biológico (3L/200 L). Como control se empleó agua destilada estéril. Se colocaron 200  $\mu$ L de una suspensión acuosa del aislamiento bacteriano con  $3.0 \times 10^8$  UFC en cajas Petri cuadradas (120 X 120 mm) con medio agar nutritivo. El inóculo se distribuyó de manera uniforme con un asa Driglasky sobre la superficie del medio. Se usaron discos de papel filtro estériles (13 mm de diámetro), los cuales se sumergieron por tres segundos en cada uno de los productos y se colocaron en las placas de medio. Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h para observar la presencia o ausencia de zonas de inhibición (Bauer *et al.*, 1966).

with  $3.0 \times 10^8$  UFC in squared Petri dishes (120 X 120 mm) with a nutritious agar medium. The inoculant was distributed evenly with a Driglasky spatula on the surface of the medium. Sterile filter paper discs (13 mm in diameter) were used, which were submerged for three seconds in each of the products and placed in the medium dishes. Finally, the dishes were incubated at 28 °C for 48 h to look for the presence or absence of inhibition areas (Bauer *et al.*, 1966).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Morphological characterization.** The morphology of the cultures observed in King's B medium, after 48 h of incubation at 28 °C, was smooth, yellow, convex, mucoid cultures, with a production of diffusible pigment in the center (Figure 1A). These characteristics coincided with those reported by Lamovsek *et al.* (2016) for *B. gladioli* pv. *allicola*. However, the cultures presented no fluorescence in King's B medium, as reported by Kowalska *et al.* (2015).

The cultures were purple in color in MacConkey's agar medium (Figura 1B), which confirmed that this bacterium is able to ferment lactose, unlike *Pseudomonas aeruginosa* (Callicó *et al.*, 2004), which lacks lactase (Ranjan *et al.*, 2017). On the other hand, the bacterial isolation displayed a growth of red cultures in a Congo Red medium (Figure 1C), which indicated that this bacterium can assimilate the iron found in the culture medium. This characteristic is crucial to the colonization process of the phytopathogenic microorganisms (Aguado *et al.*, 2012).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización morfológica.** La morfología de las colonias observadas en medio B de King, después de 48 h de incubación a 28 °C, correspondió a colonias amarillas, lisas, convexas, mucoides y con producción de pigmento difusible en el medio (Figura 1A). Estas características coincidieron con las reportadas por Lamovsek *et al.* (2016) para *B. gladioli* pv. *allicola*. No obstante, las colonias no emitieron fluorescencia en medio B de King, como lo reportaron Kowalska *et al.* (2015).

Las colonias fueron de color púrpura en el medio agar MacConkey (Figura 1B), lo que confirmó que esta bacteria es capaz de fermentar la lactosa, diferenciándose de *Pseudomonas aeruginosa* (Callicó *et al.*, 2004) que carece de la lactasa (Ranjan *et al.*, 2017). Por otro lado, el aislamiento bacteriano no mostró crecimiento de colonias rojas en medio Rojo Congo (Figura 1C), lo que indicó que esta bacteria es capaz de asimilar el hierro que se encuentra en el medio de cultivo. Esta característica es fundamental para el proceso de colonización de los microorganismos fitopatógenos (Aguado *et al.*, 2012).

**Molecular identification.** The amplification of gene rRNA of the bacterial isolation displayed fragments of 1500 pairs of bases (pb). When comparing the consensus sequence (Accession Number MT672591) on the NCBI data base, there was a similarity of 100% with *B. gladioli*.

**Phylogenetic tree.** The consensus sequence MT672591 was grouped with *B. gladioli* (MN559413) with a similarity of 100 % (Figure 2).

**Pathogenicity.** The onion slices displayed soft rotting 24 h after inoculation. The stereoscopic microscope showed abundant bacterial flow 48 h after inoculation at 28 °C. *B. gladioli* (MT672591) was positive to the hypersensitivity reaction in tobacco and rotting in potato. The control slices presented no symptoms of soft rotting.

**Scanning electron microscopy.** The results of the scanning electron microscope coincide with reports by the Boston Research Occupational Health Program (2019), which indicate that members of the *Burkholderia* genus present a bacillary shape, between 1.6 and 3.2 µm, with one or several

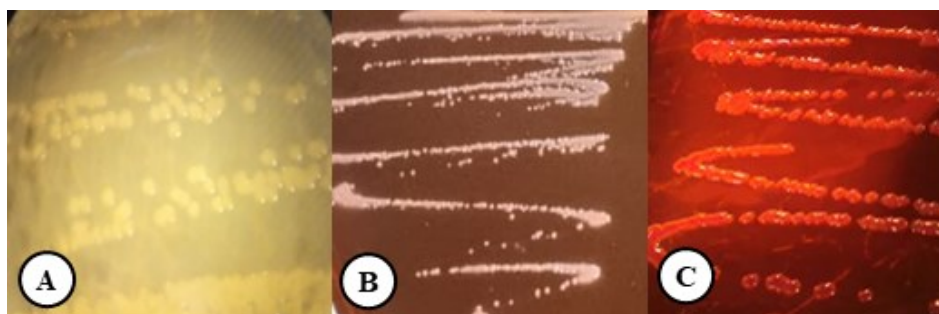


Figura 1. Crecimiento del aislamiento bacteriano de *Burkholderia gladioli* en medios de cultivo B de King (A), Agar MacConkey (B) y Rojo Congo (C) después de 48 h de incubación.

Figure 1. Growth of the *B. gladioli* bacterial isolation in King's B culture medium (A), MacConkey's Agar (B) and Congo Red (C) after 48 h of incubation.

**Identificación molecular.** La amplificación del gen 16S ARN ribosomal del aislamiento bacteriano mostró fragmentos de 1500 pares de bases (pb). Al comparar la secuencia consenso (Número de Acceso MT672591) en la base de datos del NCBI se obtuvo un 100% de similitud con *B. gladioli*.

**Árbol filogenético.** La secuencia consenso MT672591 se agrupó con *B. gladioli* (MN559413) con 100 % de similitud (Figura 2).

**Patogenicidad.** Las rodajas de cebolla mostraron pudrición blanda 24 h después de la inoculación. Al microscopio estereoscópico se observó abundante flujo bacteriano 48 h después de la inoculación a 28 °C. *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue positiva a la reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de papa. Las rodajas testigo no presentaron síntomas de pudrición blanda.

flagellar poles, important to the pathogenicity (Tomich *et al.*, 2002). In the present study, it was not possible to visualize the flagella, since the observation of these structures is carried out with negative staining with a transmission electron microscope (Jurado and Petrucci, 2005).

The *B. gladioli* bacilli (MT672591) formed biofilms and were also observed in a planktonic state (Figure 3). The formation of biofilms is another important characteristic in this genus, since it is through them that they detect signaling molecules, helping their synchronization in the gene expression (Federle *et al.*, 2009).

**Physiological and biochemical characterization.**

*B. gladioli* (MT672591) was positive to the hypersensitivity reaction test in tobacco and potato rotting, which confirms the presence of secretion systems I, II and III (Seo *et al.*, 2015).

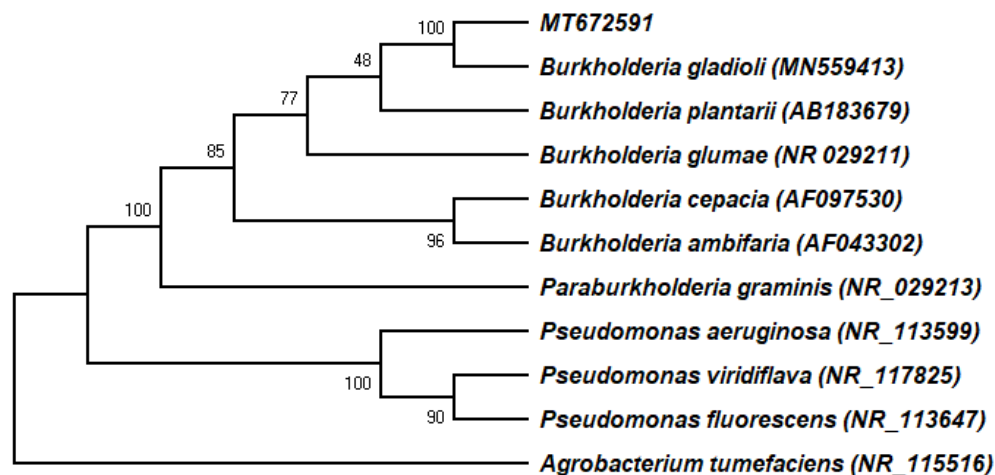


Figura 2. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal de especies del género *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias en la base de datos NCBI.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the comparison of the gene sequences of subunit 16S of the rRNA of species in the *Burkholderia* and *Pseudomonas* genera. The parentheses indicate the accession numbers of the sequences in the NCBI data base.

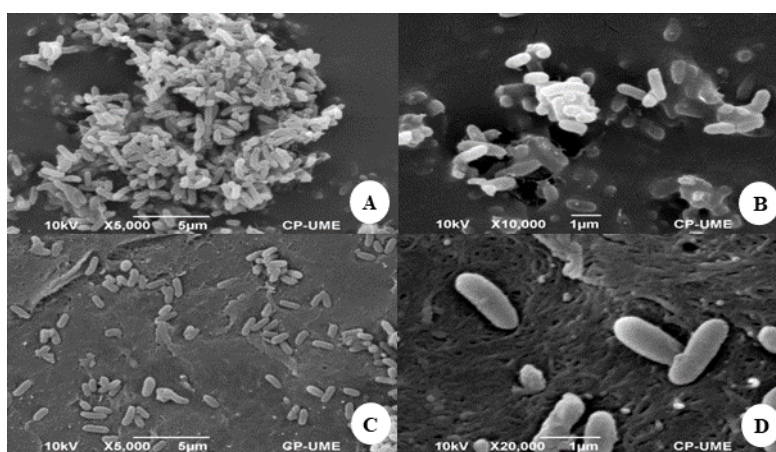
**Microscopía electrónica de barrido.** Los resultados de microscopía electrónica de barrido concuerdan con lo reportado por el Programa de Investigación en Salud Ocupacional de la Universidad de Boston (2019), que indican que los miembros del género *Burkholderia* presentan forma bacilar de 1.6 a 3.2  $\mu\text{m}$ , con uno o varios flagelos polares, importantes en la patogenicidad (Tomich *et al.*, 2002). En el presente estudio no fue posible visualizar los flagelos, debido a que la observación de estas estructuras se realiza mediante la tinción negativa con microscopía electrónica de transmisión (Jurado y Petrucci, 2005).

Los bacilos de *B. gladioli* (MT672591) formaron biopelículas y fueron observadas también en estado planctónico (Figura 3). La formación de biopelículas es otra característica importante de este género, ya que a través de estos detectan moléculas de señalización, que les permite la sincronización en la expresión de genes (Federle *et al.*,

**Caracterización fisiológica y bioquímica.** *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue positiva a

In the phytopathogenic bacteria, Secretion System III is codified by the HRP genes (hypersensitive response and pathogenicity), which are necessary for the bacteria to cause diseases in susceptible plants and cause a hypersensitivity response in resistant plants (Lindgren *et al.*, 1986; Büttner and He, 2009).

These secretion systems help the bacteria to colonize different ecological niches, such as postharvest fruits and *in vivo* plant tissues with the hosts, with which a compatible relationship is established. *B. gladioli* (MT672591) was strictly aerobic and used glucose, sucrose, arginine, and lactose as a source of carbon, coinciding with reports by Kowalska *et al.* (2015). The bacterium (MT672591) grew to a pH of 4, which gives it a competitive advantage in acid soils. This contrasts with reports by Estrada de los Santos *et al.* (2013), who mention that none of the 59 strains evaluated, belonging to 43 species of the *Burkholderia* genus, grew to a pH of 4. Growth of *B. gladioli* (MT672591) was observed at 42 °C, agreeing with reports by Kowalska *et al.* (2015). Table 1 shows



**Figura 3.** Micrografía de *B. gladioli* (MT672591) observada con microscopía electrónica de barrido. A y B corresponden a biopelículas (5,000 X y 10,000 X, respectivamente); C y D a la bacteria en estado planctónico (5,000 y 20,000 X, respectivamente).

**Figure 3.** Micrography of *B. gladioli* (MT672591) observed with a scanning electron microscope. A and B correspond to biofilms (5,000 X and 10,000 X, respectively); C and D correspond to the bacteria in a planktonic state (5,000 and 20,000 X, respectively).

la prueba de reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de papa, lo que confirma la presencia de los sistemas de secreción I, II y III (Seo *et al.*, 2015).

En las bacterias fitopatógenas, el Sistema de Secreción III está codificado por los genes *hrp* (por sus siglas en inglés: hypersensitive response and pathogenicity), estos son necesarios para que las bacterias causen enfermedades en plantas susceptibles y provoquen la respuesta de hipersensibilidad en plantas resistentes (Lindgren *et al.*, 1986; Büttner y He, 2009).

Estos sistemas de secreción habilitan a la bacteria a colonizar diferentes nichos ecológicos, como frutos postcosecha y tejido vegetal *in vivo* con los hospedantes con los cuales establece una relación compatible. *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue estrictamente aeróbica y utilizó como fuente de carbono, glucosa, sacarosa, arginina y lactosa, coincidiendo con lo reportado por Kowalska *et al.* (2015). La bacteria (MT672591) creció a pH de 4, lo que le da ventaja competitiva en suelos ácidos. Esto contrasta con lo reportado por Estrada de los Santos *et al.* (2013), quienes mencionan que ninguna de las 59 cepas evaluadas, pertenecientes a 43 especies del género *Burkholderia*, creció a pH de 4. Se observó crecimiento de *B. gladioli* (MT672591) a 42 °C, concordando con lo reportado por Kowalska *et al.* (2015). En el Cuadro 1, se observan las similitudes y diferencias entre la cepa aislada en este estudio y las reportadas en Sinaloa, México y en Polonia.

**Inoculación de *B. gladioli* en estructuras vegetales bajo condiciones controladas.** Se registraron diferencias significativas en el grado de maceración (Cuadro 2). Se observó mayor grado de maceración en el bulbo de la cebolla morada y en el tallo de puerro. El tejido de ambas estructuras vegetales se maceró completamente 48 h después a

the similarities and differences between the isolated strain in this study and those reported in Sinaloa, Mexico, and

**Inoculation of *B. gladioli* in plant structures under controlled conditions.** Significant differences were registered in the degree of maceration (Table 2). The highest degree of maceration was found in the red onion bulb and the leek stalk. The tissues of both plant structures were completely macerated 48 h after inoculation and it displayed the typical symptom of soft rot, caused by *B. gladioli* (MT672591) (Figures 4 A and B). The red onion and the leek presented similar interactions with the bacterium, probably due to them both belonging to the Alliaceae family.

In the cactus (*Opuntia* spp.) cladodes, the first symptoms of soft rot were observed 24 h after inoculation. First, dark brown dots appeared, which grew with a moist aspect and a halo around the spots 48 h after inoculation (Figure 4C). A complete rotting of the cladode was observed six days after inoculation, coinciding with the symptoms caused by *Pectobacterium* spp. (Torres *et al.*, 2016). Both phytopathogens are characterized for having high enzymatic activity. To this day, there are no reports on the *Burkholderia* genus as a pathogen of cactus in a natural state; however, due to the aggressiveness in the colonization observed under controlled conditions, it deserves further studies.

Likewise, soft rot and degradation of the sporocarp were observed in mushrooms (Figure 4D). Chowdhury and Heinemann (2006) reported that Secretion System type II is involved in the disease caused by *B. gladioli* pv. *agaricola* in mushrooms. These researchers found that avirulent mutants were unable to degrade the tissue of mushrooms, due to the reduction in the ability to secrete chitinases and proteases, as well as the reduction in the number of flagella. *B. gladioli*

**Cuadro 1. Comparación fisiológica y bioquímica de cepas de *B. gladioli* procedentes del Estado de México (presente estudio), Sinaloa, México y Polonia.**  
**Table 1. Physiological and biochemical comparison of strains of *B. gladioli* from the State of Mexico (present study), Sinaloa, Mexico, and Poland.**

| Característica                   | <i>B. gladioli</i> (MT672591)<br>del Edo. de México,<br>México | <i>B. gladioli</i> de Sinaloa,<br>México (Félix-Gastélum<br><i>et al.</i> , 2017) | <i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i><br>de Polonia (Kowalska <i>et al.</i> , 2015) |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Hipersensibilidad en tabaco      | +                                                              | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Pudrición de papa                | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Tinción de Gram                  | -                                                              | -                                                                                 | -                                                                                     |
| Reacción KOH                     | +                                                              | NR                                                                                | -                                                                                     |
| Crecimiento anaeróbico           | -                                                              | NR                                                                                | -                                                                                     |
| Oxidasa                          | + retardada                                                    | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Catalasa                         | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Fluorescencia en medio B de King | -                                                              | -                                                                                 | -                                                                                     |
| Colonia mucóide                  | +                                                              | -                                                                                 | -                                                                                     |
| Color crema en medio AN          | +                                                              | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Fermentación/oxidación           | Oxidativo                                                      | NR                                                                                | Oxidativo                                                                             |
| Hidrólisis de gelatina           | +                                                              | NR                                                                                | +                                                                                     |
| Arginina dehidrolasa             | -                                                              | -                                                                                 | -                                                                                     |
| Hidrolisis de Almidón            | -                                                              | -                                                                                 | NR                                                                                    |
| Crecimiento:                     |                                                                |                                                                                   |                                                                                       |
| 40 °C                            | +                                                              | NR                                                                                | +                                                                                     |
| 42 °C                            | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| 43 °C                            | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Levana                           | -                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Motilidad                        | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Reducción de nitratos            | +                                                              | -                                                                                 | NR                                                                                    |
| Tolerancia:                      |                                                                |                                                                                   |                                                                                       |
| pH 4                             | +                                                              | NR                                                                                | +                                                                                     |
| pH 8                             | +                                                              | NR                                                                                | +                                                                                     |
| pH 9                             | +                                                              | NR                                                                                | -                                                                                     |
| Utilización de:                  |                                                                |                                                                                   |                                                                                       |
| Lactosa                          | +                                                              | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Glucosa                          | +                                                              | +                                                                                 | NR                                                                                    |
| Celobiosa                        | +                                                              | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Maltosa                          | -                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Trehalosa                        | -                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Inositol                         | -                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |
| Sorbitol                         | -                                                              | +                                                                                 | +                                                                                     |
| Dulcitol                         | +                                                              | NR                                                                                | NR                                                                                    |

+Positivo, - Negativo, NR No reportado. / +Positive, - Negative, NR Not reported.

la inoculación, y mostró el síntoma típico de pudrición blanda, causado por *B. gladioli* (MT672591) (Figuras 4 A y B). La cebolla morada y el puerro presentaron una interacción similar con la bacteria, debido probablemente a que ambas pertenecen a la familia Alliaceae.

pv. *agaricola* is considered a potential mushroom pathogen, which could cause important losses in the industry of this fungus (Gill and Tsuneda, 1997).

In carrots, dark brown patches were produced near the points in which the bacterium was



En los cladodios de nopal (*Opuntia* spp.), los primeros síntomas de pudrición blanda se observaron 24 h después a la inoculación. Primero, aparecieron puntos de color café oscuro, que fueron creciendo con aspecto húmedo y un halo alrededor de las manchas a las 48 h después de la inoculación (Figura 4C). Se observó pudrición completa del cladodio seis días después de la inoculación, coincidiendo con los síntomas que ocasiona *Pectobacterium* spp. (Torres *et al.*, 2016). Ambos fitopatógenos se caracterizan por tener gran actividad enzimática. Hasta el momento, no existen reportes del género *Burkholderia* como patógeno del nopal en forma natural; sin embargo, debido a la agresividad de colonización que se observó bajo condiciones controladas, merece estudios posteriores.

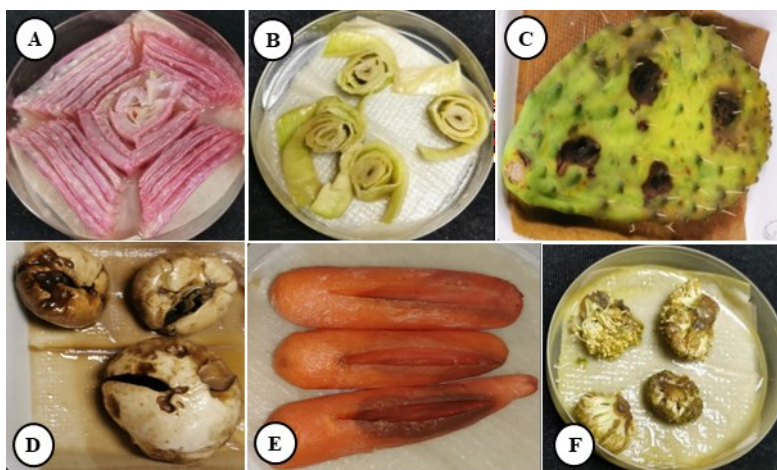
Igualmente, se registró pudrición blanda y degradación del esporocarpo del champiñón (Figura 4D). Chowdhury y Heinemann (2006), reportaron que el Sistema de Secreción tipo II se encuentra involucrado en la enfermedad causada por *B. gladioli*

**Cuadro 2. Grado de maceración inducido por *B. gladioli* en diferentes estructuras vegetales.**  
**Table 2. Degree of maceration induced by *B. gladioli* in different plant structures.**

| Estructura vegetal        | Maceración (%) |
|---------------------------|----------------|
| Bulbo de cebolla morada   | 4.87 a         |
| Tallo de puerro           | 4.72 a         |
| Cladodio de nopal         | 4.22 ab        |
| Esporocarpo de champiñón  | 3.97 bc        |
| Raíz de zanahoria         | 3.62 b         |
| Inflorescencia de brócoli | 3.50 c         |
| Rizoma de jengibre        | 0.00 d         |

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ );  $n=4$  repeticiones por tratamiento. / Means with different letters are statistically different ( $p \leq 0.05$ );  $n=4$  repetitions per treatment.

inoculated, three days after inoculation (Figure 4E). So far, there are no reports on damages to carrots by *B. gladioli*, although *Pseudomonas viridiflava* has been reported to promote similar symptoms in carrot roots (Almeida *et al.*, 2013). This similarity may be due to the proximity of



**Figura 4. Síntomas de pudrición inducidos por *B. gladioli* (MT672591) en diferentes estructuras vegetales bajo condiciones controladas: A) bulbos de cebolla morada, B) tallos de puerro, C) cladodios de nopal, D) esporocarpos de champiñón, E) raíces de zanahoria y F) inflorescencias de brócoli.**

**Figure 4. Symptoms of rotting caused by *B. gladioli* (MT672591) in different plant structures under controlled conditions: A) red onion bulbs, B) leek stalks, C) cactus cladodes, D) mushroom sporocarps, E) carrot roots and F) broccoli inflorescences.**

pv. *agaricola* en champiñón. Estos investigadores mencionan que mutantes avirulentos fueron incapaces de degradar el tejido de champiñón, debido a la reducción de la capacidad de secretar quitinasas y proteasas, así como la reducción en el número de flagelos. *B. gladioli* pv. *agaricola* es considerada un patógeno potencial del champiñón, que podría ocasionar pérdidas importantes en la industria de este hongo (Gill y Tsuneda, 1997).

En la zanahoria se produjeron áreas café oscuras cerca de los puntos donde se inoculó la bacteria, tres días después de la inoculación (Figura 4E). Hasta el momento no existen reportes de *B. gladioli* causando daños en zanahoria, pero se ha reportado que *Pseudomonas viridiflava* promueve síntomas similares en las raíces de la zanahoria (Almeida *et al.*, 2013). Esta similitud probablemente se deba a la cercanía del género *Burkholderia*, que originalmente se encontraba agrupado dentro del género *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992). En el caso de las inflorescencias de brócoli, el tejido se tornó acuoso con mal olor, y se observó maceración del tejido tres días posteriores a la inoculación (Figura 4F), síntomas similares a los que ocasiona *Pseudomonas fluorescens* en este cultivo (Li *et al.*, 2009). En el caso del jengibre, no se observó ningún síntoma, lo que evidencia una relación incompatible.

**Inoculación del frijol con *B. gladioli* en invernadero.** Se observaron lesiones necróticas en hojas y tallos del frijol (Figura 5). Se registró 100% de incidencia, sin embargo, no se registró diferencia estadística significativa con respecto al testigo en número de botones florales y altura (Cuadro 3). Estudios recientes indican que algunas cepas del género *Burkholderia* viven de forma endófitas en maíz silvestre, sin causarle enfermedad (Johnston y Raizada, 2011). Compant *et al.* (2008), mencionan que en ecosistemas naturales y artificiales, *Burkholderia* spp. puede colonizar la filósfera y tejidos internos de

the *Burkholderia* genus, which was originally grouped in the *Pseudomonas* genus (Yabuuchi *et al.*, 1992). In the case of broccoli inflorescences, the tissue turned aqueous and with a bad smell, and the tissue displayed maceration three days after inoculation (Figure 4F), similar to the symptoms caused by *Pseudomonas fluorescens* in this crop (Li *et al.*, 2009). In the case of ginger, no symptoms were observed, which shows an incompatible relationship.

**Inoculation of bean with *B. gladioli* in a greenhouse.** Necrotic lesions were observed in bean leaves and stalks (Figure 5). An incidence of 100% was registered, although no significant statistical differences were registered regarding the control in the number of flower buttons and height (Table 3). Recent studies indicate that some strains of the *Burkholderia* genus live endophytically in wild maize without causing any disease (Johnston and Raizada, 2011). Compant *et al.* (2008) mention that in natural and artificial ecosystems, *Burkholderia* spp. may colonize the phyllosphere and internal tissues of the plant, being the only bacterium that easily adapts to the environment and to plants. On the other hand, *B. gladioli* produces toxoflavin, which is highly allergenic to plants, fungi and animals (Anwar *et al.*, 2017). Likewise, Lee *et al.* (2016) indicate that the *quorum sensing* is related to the production of toxoflavin.

*Burkholderia gladioli* contains a genome made up of 9.05 Mb, two chromosomes and four plasmids, suggesting that the size of its genome is related to its ability to colonize different ecological niches (Mannaa *et al.*, 2018). In addition, *Burkholderia sensu lato* has different virulence factors such as type I, II, III, IV and V secretion systems, adhesins, pilis, siderophores, extracellular proteases, various polysaccharides, and *quorum sensing* molecules (Ferreira *et al.*, 2019).

las plantas, siendo probablemente la bacteria que más fácilmente se adapta al ambiente y las plantas. Por otra parte, *B. gladioli* produce toxo flavina que es altamente tóxica para plantas, hongos y animales (Anwar *et al.*, 2017). Así mismo, Lee *et al.* (2016), indican que el *quorum sensing* está relacionado en la producción de toxo flavina.

*Burkholderia gladioli* posee un genoma constituido por 9.05 Mb, por dos cromosomas y cuatro plásmidos, lo que sugiere que el tamaño de su genoma está relacionado con su capacidad de colonizar diferentes nichos ecológicos (Mannaa *et al.*, 2018). Además, *Burkholderia*, *sensu lato*, posee diversos factores de virulencia, como son: los sistemas de secreción tipo I, II, III, IV y V, adhesinas, pilis, sideróforos, proteasas extracelulares, varios polisacáridos y moléculas de *quorum sensing* (Ferreira *et al.*, 2019).

Debido a que *B. gladioli* tiene la capacidad de sobrevivir en agua, y que gran parte de las aguas residuales se utilizan con fines agrícolas, esto podría traer consecuencias ecológicas negativas, como una fuente de diseminación a largas distancias (Escobedo y Pardo, 2017). Al realizar los reaislamiento en los tejidos vegetales utilizados en este estudio, en todos los casos, se observó motilidad bajo el microscopio óptico a 40X, coincidiendo con lo descrito por Chung *et al.* (2003). Esta es una característica importante en la patogenicidad de

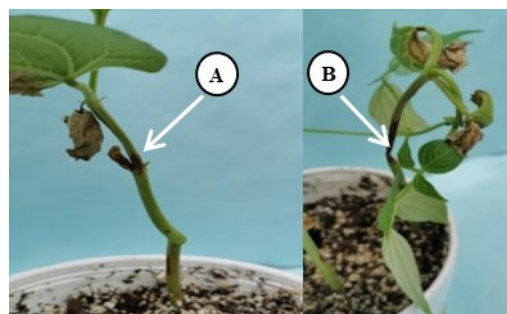


Figura 5. Síntomas inducidos por *Burkholderia gladioli* (MT672591) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). A) Inicio de la lesión; B) Avance de la lesión.

Figure 5. Symptoms induced by *Burkholderia gladioli* (MT672591) in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). A) Start of the lesion; B) Progress of the lesion.

Since *B. gladioli* survive in water, and most residual waters are used with agricultural purposes, this could lead to negative ecological consequences, such as a source of long-distance dissemination (Escobedo and Pardo, 2017). When reisolating in the plant tissues studied in this investigation, in all cases, motility was found under the light microscope at 40X, coinciding with descriptions by Chung *et al.* (2003). This is an important characteristic in the pathogenicity of this bacteria, since it has polar flagella, which provides it with the advantage to move around the tissue of its host.

**Cuadro 3. Número de botones florales, altura y tamaño de lesiones en tallo de plantas de frijol inoculadas con *Burkholderia gladioli* (MT672591).**  
**Table 3. Number of flower buttons, height and size of lesions in bean plant stalks inoculated with *Burkholderia gladioli* (MT672591).**

| Plantas de frijol | Número de botones florales | Altura (cm) | Lesión en tallo (cm) |
|-------------------|----------------------------|-------------|----------------------|
| Inoculado         | 3.125 a                    | 27.2625 a   | 0.8625 a             |
| No inoculado      | 2.25 a                     | 22.2625 a   | 0 b                  |

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ );  $n=4$  repeticiones por tratamiento. / Means with different letters are statistically different ( $p \leq 0.05$ );  $n=4$  repetitions per treatment.

esta bacteria, ya que, al poseer un flagelo polar, le brinda ventaja para desplazarse en el tejido de su hospedante.

**Sensibilidad *in vitro* a productos químicos y biológicos.** Ningún de los productos ensayados tuvo efecto inhibitorio sobre *B. gladioli* (MT672591). Esta bacteria se caracteriza por su resistencia natural a antibióticos, debido a la capacidad de formar biopelículas y cambiar su envoltura celular para reducir la permeabilidad de membrana impidiendo así la entrada del antibiótico (Sousa *et al.*, 2011; Torbeck *et al.*, 2011). Los mecanismos que le brindan resistencia incluyen producción de  $\beta$ -lactanasas y otras enzimas, así como la modificación de los puntos objetivo de los antibióticos (Ranjan *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

Se identificó morfológica, fisiológica, bioquímica y molecularmente a *Burkholderia gladioli* (MT672591) como agente causal de pudrición blanda del bulbo de la cebolla blanca.

*B. gladioli* colonizó e indujo daño en bulbos de cebolla morada, cladodios de nopal, esporocarpos de champiñón, tallos de puerro, raíces de zanahoria y rizomas de jengibre en condiciones de laboratorio. Igualmente, promovió lesiones en plantas de frijol de condiciones de invernadero. Además, mostró resistencia natural a cuprimicin agrícola, serenade polvo, bactrol, bactriomicin agrícola, fungifree biológico, cuprimicin 500, phyton, oxiclورو de cobre, kasumin, final bacter, quatz y bacterbest biológico. Este estudio reporta por primera vez la caracterización polifásica de *B. gladioli* en México. Esta especie bacteriana tiene la capacidad de crecer a pH 4.0 y 42 °C, lo que podría conferirle habilidad competitiva en suelos ácidos y condiciones

***In vitro* sensitivity to chemical and biological products.** None of the products tested had an inhibiting effect on *B. gladioli* (MT672591). This bacterium is characterized by its natural resistance to antibiotics, due to its ability to form biofilms and change its cellular cover to reduce membrane permeability, thus stopping the antibiotics from entering (Sousa *et al.*, 2011; Torbeck *et al.*, 2011). The mechanisms that give it resistance include the production of  $\beta$ -lactanases and other enzymes, as well as the modification of the target points of antibiotics (Ranjan *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONS

*Burkholderia gladioli* (MT672591) was identified morphologically, physiologically, biochemically, and molecularly as the causal agent of soft rot of the bulb of white onion.

*B. gladioli* colonized and induced damages in red onion bulbs, cactus cladodes, mushroom sporocarps, leek stalks, carrot roots and ginger rhizomes under laboratory conditions. Likewise, it promoted lesions in bean plants under greenhouse conditions. It also showed a natural resistance to agricultural cuprimicin, serenade powder, bactrol, agricultural bactriomicin, biological fungifree, cuprimicin 500, phyton, copper oxychloride, kasumin, final bacter, quatz and biological bacterbest. This study reports the polyphasic characterization of *B. gladioli* for the first time in Mexico. This bacterial species has the ability to grow at pH 4.0 and at 42 °C, which may give it a competitive ability in acid soils and semiarid conditions. It proved to have a wide range of hosts in postharvest conditions, as well as being resistant to some products used in the field for the control of phytopathogens.

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



semiáridas. Se demuestra que tiene un amplio rango de hospederos en condiciones postcosecha, además de ser resistente a algunos productos usados en campo para el control de fitopatógenos.

## LITERATURA CITADA

- Aguado SGA, Moreno GB, Jiménez FB, García ME and Preciado OE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1): 9-21. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n1/v35n1a4.pdf>.
- Almeida IMG, Maciel KW, Rodrigues J and Beriam LOS. 2013. *Pseudomonas viridiflava* in imported carrot seeds. *Australasian Plant Disease* 8:17-19. <http://doi.org/10.1007/s13314-012-0086-2>.
- Anwar M, Kasper A, Steck AR and Schier JG. 2017. Bongrekic acid a review a lesser known mitochondrial toxin. *Journal of Medical Toxicology* 13:176-179. <http://doi.org/10.1007/s13181-016-0577-1>.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC and Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496. <https://www.asm.org/ASM/media/docs/105bauer.pdf>.
- Büttner D and He SY. 2009. Type III Protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* 150: 1656-1664. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>.
- Callicó A, Cedré B, Sinfontes S, Torres V, Pino Y Callis AH and Esnard SC. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vacuum Monitor* 13(3):1-9. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v13n3/vac01304.pdf>.
- Chowdhury PR and Heinemann JA. 2006. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* BG164R Is Necessary for Cavity Disease in White Button Mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3558-3565. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3558-3565.2006>.
- Chung JW, Altman E, Beveridge TJ and Speert DP. 2003. Colonial Morphology of *Burkholderia cepacia* Complex Genomovar III: Implications in exopolysaccharide production, Pilus expression, and persistence in the mouse. *Infection and Immunity* 71(2): 904-909. <http://doi.org/10.1128/IAI.71.2.904-909.2003>.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clement C and Barka EA. 2008. Review article: Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp., in the natural environment. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Review* 32: 607-626. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113>.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Escobedo HW and Pardo LL. 2017. Perspective: Analysis of bacterial metagenomes from the South western Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathogens and Disease* 75:1-9. <http://doi.org/10.1093/femspd/ftx058>.
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3). <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-5>.
- Estrada de los Santos P, Vinuesa P, Martínez AL, Hirsch AM and Caballero MJ. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology* 67:51-50. <http://doi.org/10.1007/s00284-013-0330-9>.
- Falcao SJ and Van Veen JA and van Elsas JD. 2004. Multivariate analysis of *Burkholderia* species in soil: Effect of crop and land use history. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 4012-4020. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4012-4020.2004>.
- FAOSTAT. 2017. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. Consultado el 01 de diciembre del 2019. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- Federle MJ. 2009. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: Complexities of interspecies signaling. *Contribution Microbiology* 16:18-32. <http://doi.org/10.1159/000219371>.
- Félix-Gastélum R, Maldonado MIE, Olivas PFG, Brito VH, Peñuelas RO and Longoria ERM. 2017. First report of slipper skin caused by *Burkholderia gladioli* in stored onion bulbs in Mexico. *The American Phytopathological Society (APS)*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1370-PDN>.
- Ferreira M, Gomes SC and Moreira LM. 2019. Chapter Four-Mucoid switch in *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Triggers, molecular mechanisms, and implications in pathogenesis. *Advances in Applied Microbiology* 107: 113-140. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.03.001>.
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology* 74 (24): 7828-7831. <http://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>.
- Gill WM and Tsuneda A. 1997. The interaction of soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricola* with Japanese cultivated mushrooms. *Canadian Journal of Microbiology* 43(7): 639-648. <https://doi.org/10.1139/m97-091>.
- Goszczyńska T, Serfontein JJ and Serfontein S. 2000. Introduction to practical phyto bacteriology: a manual for phyto bacteriology by SAFRINET, SDC Switzerland. 83 p. [https://www.researchgate.net/publication/237021880\\_Introduction\\_to\\_Practical\\_Phyto bacteriology\\_A\\_manual\\_for\\_phyto bacteriology](https://www.researchgate.net/publication/237021880_Introduction_to_Practical_Phyto bacteriology_A_manual_for_phyto bacteriology).
- Johnston MD and Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, Ethnography and Ecology. *Plos one* 6(6): 1-22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.
- Jurado SB and Petrucci MA. 2005. Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico. *Analecta Veterinaria* 25(1):18-24. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11173/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11173/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Keith L and Thammakijjawat P. 2019. Detection of *Burkholderia gladioli* in orchids. <https://doi.org/10.1094/9780890545416.048>.



- Kowalska B, Smolińska U and Oskiera M. 2015. *Burkholderia gladioli* associated with soft rot of onion bulbs in Poland. *Journal of Plant Pathology* (1): 37-43. <http://doi.org/10.4454/JPP.V97I1.007>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics Analysis across computing platforms. Release 10.0.5. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547–1549. <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lamovsek J, Geric SB, Zerjav M and Urek G. 2016. Soft rot of onion bulbs caused by *Burkholderia gladioli* pv. *allicola* in Slovenia. *Journal of Plant Pathology* 98(2): 369-377. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V98I2.041>.
- Lee Y, Park J, Kim S, Park I and Seo YS. 2016. Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. *Molecular Plant Pathology* 17(1): 65-76. <http://doi.org/10.1111/mpp.12262>.
- Li B, Wang GL, Wu ZY, Qui W, Tang QM, Xie L. 2009. First report of bacterial head rot of broccoli caused by *Pseudomonas fluorescens* in China. *Plant Disease* 93(11):1219. <http://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1219A>.
- Liao CH and Wells JM. 1986. Postharvest pathology and mycotoxins. Association of pectolytic strains of *Xanthomonas campestris* with soft rots of fruits and vegetables at retail markets. *Phytopathology*: 418-422. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n03\\_418.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n03_418.pdf).
- Lindgren PB, Peet RC and Panopoulos NJ. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on non-host plants. *Journal of Bacteriology* 168: 512-522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213511/pdf/jbacter00204-0052.pdf>.
- Mannaa M, Park I and Seo YS. 2018. Genomic features and insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant-associated *Burkholderia* Species. *International of Molecular Sciences* 20:1-25. <http://doi.org/10.3390/ijms20010121>.
- Matuschek E, Brown DFJ and Kahlmeter G. 2014. Development of EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinic Microbiology and Infection* 20(4): O255-O266. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>.
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 49: 1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>.
- Mirghasempour SA, Huang S and Xie GL. 2018. First report of *Burkholderia gladioli* causing rice panicle blight and grain discoloration in China. *The American Phytopathological Society (APS)*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0758-PDN>.
- Programa de Investigación en Salud Ocupacional (ROHP) de la Universidad de Boston. 2019. Consultado el 01 de diciembre de 2019. Disponible en <https://www.bu.edu/researchsupport/safety/rohp/agent-information-sheets/burkholderia-cepacia/>.
- Ranjan R, Chowdhary P and Kamra A. 2017. Community acquired *Burkholderia cepacia* bacteraemia presenting as MODS in an immunocompetent individual: An unusual case. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11(3):1-2. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2017/16285.9435>.
- Rodríguez CE. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(4): 990-991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242127/>.
- SAS. 2002. Statistical Automatic System Institute Inc. The SAS system for Windows version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Seo SY, Lim YJ, Park J, Kim S, Lee HH, Cheong H, Kim MS, Moon SJ and Hwang I. 2015. Comparative genome analysis of rice-pathogenic *Burkholderia* provides insight into capacity to adapt to different environments and hosts. *BioMed Central Genomics* 15 (349): 1-11. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1558-5>.
- Shaad N, Jones B and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *The American Phytopathological Society*. Third Edition.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> consultado el 25 de noviembre de 2019.
- Sousa SA, Ramos CG, Leit'ao JH. 2011. Review Article *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *International Journal of Microbiology*: 1-9. <http://doi.org/10.1155/2011/607575>.
- Tomich M, Herfst CA, Golden JW and Mohr CD. 2002. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity* 70(4): 1799-1806. <http://doi.org/10.1128/iai.70.4.1799-1806.2002>.
- Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL and Husong D. 2011. Review: *Burkholderia cepacia*: This decision is overdue, *PDA Journal Pharmaceutical Science and Technology* 65(5):535-543. <http://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.00793>.
- Torres BAI, Cervantes DL, Núñez RF, Morales MA and Samaniego GBY. 2016. Primer reporte de *Pectobacterium* spp., asociada a *Opuntia ficus* en Baja California, México. *IDESIA Chile* 34 (4): 69-71. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v34n4/aop1516.pdf>.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T and Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology Group II to the new genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) *Comb. Nov. Microbiology and Immunology* 36(12): 1251-1275. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>.

# Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas

## Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y antifúngica de agregado de polen de tres especies de abejas (Apidae: Meliponini) provenientes del Soconusco, Chiapas

Víctor Albores-Flores, Erick Saavedra-Camacho, José Alfonso López-García, Julieta Grajales-Conesa, Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino s/n. Colonia Solidaridad 2000. Tapachula Chiapas CP 30798, México; Liliana Carolina Córdova-Albores, Escuela de Agronomía, Universidad Dela Salle Bajío. Avenida Universidad #602, Colonia Lomas del Campestre, León, Guanajuato. CP 37150. Autor de correspondencia: jugrajco79@gmail.com.

Recibido: 29 de Septiembre, 2020.

Aceptado: 19 de Noviembre, 2020.

Albores-Flores V, Saavedra-Camacho E, López-García JA, Grajales-Conesa J and Córdova-Albores LC. 2021. Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 41-60.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-4>

Primera publicación en línea: 12 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 12, 2020.

**Resumen.** La interacción planta-abeja puede generar productos de la colmena con diferentes características fisicoquímicas, bioactivos y actividad antimicrobiana. Por lo cual, en este trabajo se determinó la composición química de conglomerados o agregados de polen colectados de 12 colmenas establecidas en Chiapas, México, en los municipios

**Abstract.** Plants-bees interaction can generate bee-hive products with different physicochemical, bioactive and antimicrobial composition. Therefore, in this study we determined the physicochemical composition of pollen aggregates collected from 12 stingless bee-hives established in Chiapas, Mexico, from three different municipalities: Tapachula, Mazatán and Cacahoatán, and with three different species: *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana* and *Tetragonisca angustula*. We also evaluated the effect of pollen aggregate extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* growth. Our results showed differences in the physicochemical composition based on bee species. Pollen from *M. beecheii* registered the highest phenol content, flavonoids, and free acidity. These results, and the obtained from the antioxidant capacity (Trolox), glucose and pH, were associated with *in vitro* *C. gloeosporioides* growth. The fungus radial growth

Tapachula, Mazatán y Cacahoatán, dentro de tres meliponarios comerciales asociados a las especies: *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*. Asimismo, se evaluó el efecto de los agregados de polen en *Colletotrichum gloeosporioides*. Se encontró una composición química muy diversa independientemente de la especie de abeja. El polen obtenido de colmenas con *M. beecheii* tuvieron la mayor cantidad de fenoles, flavonoides y acidez libre. Estas propiedades, en adición de la capacidad antioxidante (trolox), glucosa y pH, estuvieron asociados a la inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. La velocidad de crecimiento radial del hongo durante nueve días fue de 0.013 a 0.009 mm h<sup>-1</sup> con extractos de polen, 44 % menor que el efecto del clorotalonil. La actividad antifúngica de los extractos de polen fue de 65 y 37 % para *M. beecheii*, 57 y 16 % para *T. angustula* y 60 y 30 % para *S. mexicana*, respecto al tratamiento testigo y a la dosis más alta de clorotalonil, respectivamente.

**Palabras clave:** Interacción, inhibición, compuestos bioactivos, agregados de polen, abejas sin aguijón.

Las abejas colectan productos de plantas que emplean para su crecimiento y desarrollo, siendo los más importantes el néctar, polen, resinas y, en algunos casos, aromas de flores requeridos en cortejo y apareamiento (Borkraâ y Sulaiman, 2010; Dötterl y Vereecken, 2010; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2015). Esta interacción planta y abeja genera a su vez productos con diferentes características físicoquímicas, sensoriales y capacidades bioactivas, los cuales dependen de la especie vegetal, condición nutricional, origen geográfico y de los grupos taxonómicos de especies de abejas. Entre las más estudiadas se encuentran *Apis mellifera*

rate during the nine-day study was 0.013-0.009 mm h<sup>-1</sup> with pollen extracts, which was equivalent to 44% lower value than chlorothalonil. The antifungal activity of pollen extracts depends on bee species; for *M. beecheii* we registered 65 and 37%, for *T. angustula* 57 and 16%, and for *S. mexicana* 60 and 30%, which were higher than the chlorothalonil fungicide.

**Key words:** Interaction, inhibition, hive products, pollen aggregate, stingless bees.

Bees collect plant products that they use for their growth and development; among the most important products are nectar, pollen, resins, and, in some cases, scent of flowers required in courtship and mating (Borkraâ and Sulaiman, 2010; Dötterl and Vereecken, 2010; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2015). The plant-bee interaction leads in turn to the development of products with different physicochemical and sensory characteristics, as well as bioactive capacities, which depend on the plant species, nutritional conditions, geographical origin, and taxonomic group of the bee species. The species that have been studied the most are *Apis mellifera* (Apidae:Apinae) and meliponines (Apidae: Meliponini), which are stingless bees from tropics and subtropics (Ayala *et al.* 2013; Komosinska *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016).

Since ancient times, beehive products of different species have been used as exchange material, divine offerings, and in the treatment of various diseases (Borkraâ and Sulaiman, 2010). Currently, because of their properties, beehive products have diverse uses, for example, in diabetic foot and wound treatment, as antioxidant and anti-inflammatory, antimicrobial activity, among others (Molan and Bets, 2004; Basim *et al.*, 2006; Vit *et al.* 2008; Grajales-Conesa *et al.*, 2018). On the other

(Apidae:Apinae) y los meliponinos (Apidae: Meliponini), abejas sin aguijón de trópicos y subtropicos (Ayala *et al.* 2013; Komosinska *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016).

Desde épocas ancestrales, los productos de colmena de diversas especies de abejas se han empleado como material de intercambio y ofrendarios divinos, así como en el tratamiento de diversas enfermedades (Borkraã y Sulaiman, 2010). Actualmente, sus productos tienen diversos usos médicos, incluyendo tratamiento de pie diabético y heridas, antioxidante, antiinflamatorio y actividad antimicrobiana (Molan y Bets, 2004; Basim *et al.*, 2006; Vit *et al.* 2008; Grajales-Conesa *et al.*, 2018). Por otra parte, estudios recientes con productos de abejas sin aguijón, han demostrado que estos promueven mayor tasa de epitelización en heridas y efecto antiinflamatorio y antimicrobiano que la abeja europea o melífera (Rao *et al.*, 2016). La actividad antimicrobiana se ha evaluado *in vitro* contra distintas bacterias de importancia médica: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y diferentes especies fungosas del género *Candida* (Cabrera y Montenegro 2013; Zainol *et al.*, 2013; Vit *et al.*, 2016). Extractos metanólicos y etanólicos de polen, así como mieles de *A. mellifera* y de diversas especies de abejas sin aguijón han tenido efectiva actividad antimicrobiana contra hongos de interés médico y agrícola: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *C. gloeosporioides* (Cabrera y Montenegro 2013; Albores-Flores *et al.*, 2018). De los productos de colmena, el polen está compuesto por subproductos del gametangio masculino floral que colectan las abejas y cuenta con un alto contenido nutricional, constituido por carbohidratos (13 y 55%), proteínas (10 y 40%), lípidos (1-10%) y fibra cruda (0.3 y 20%), además de minerales, oligoelementos, vitaminas,

hand, recent studies with stingless bee products have shown a higher rate of epithelialization in wounds and greater anti-inflammatory and antimicrobial effects than those of European or honeybees (Rao *et al.*, 2016). The antimicrobial activity has been evaluated *in vitro* against different medically important bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, and different fungal species of the *Candida* genus (Cabrera and Montenegro 2013; Zainol *et al.*, 2013; Vit *et al.*, 2016). Methanolic and ethanolic extracts of pollen, as well as honey of *A. mellifera* and different stingless bee species, have shown an effective antimicrobial activity against fungi of medical and agricultural interest: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *C. gloeosporioides* (Cabrera and Montenegro 2013; Albores-Flores *et al.*, 2018). Of the beehive products, pollen is made up of by-products of the floral male gametangium collected by bees and has a high nutritional content, which is constituted by carbohydrates (13 and 55%), proteins (10 and 40%), lipids (1-10%) and raw fiber (0.3 and 20%), as well as minerals, oligoelements, vitamins, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, sterols and terpenes (Bogdanov, 2004). Besides being a source of food for bees, the pollen aggregate is also important in the human diet (Pascoal *et al.*, 2014).

In Soconusco, Chiapas, Mexico, meliponiculture is practiced in areas adjacent to crops, especially coffee (*Coffea* spp.), mango (*Mangifera indica*), rambutan (*Nephelium lappaceum*) and banana (*Musa* spp.). Several studies have been conducted to characterize the beehive products of the stingless bee species that are most widely bred in the region, such as: *Melipona beecheii*, *M. solani*, *Scaptotrigona mexicana* and *Tetragonisca angustula* (Grajales-Conesa *et al.*, 2018; Espinoza-

carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides y terpenos (Bogdanov, 2004). Además de ser fuente alimenticia para las abejas, el agregado de polen es importante en la alimentación humana (Pascoal *et al.*, 2014).

En el Soconusco, Chiapas, la meliponicultura se realiza en zonas aledañas a cultivos de la región, siendo café (*Coffea* spp.), mango (*Mangifera indica*), rambután (*Nephelium lappaceum*) y banano (*Musa* spp.) los principales. Se han desarrollado diversos estudios para caracterizar los productos de colmena de especies de abejas sin aguijón mayormente cultivadas en esta región, tales como: *Melipona beecheii*, *M. solani*, *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula* (Grajales-Conesa *et al.*, 2018; Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018).

Por otro lado, *Colletotrichum gloeosporioides* es la especie fungosa más frecuente que causa antracnosis a nivel de campo y postcosecha en frutales y hortalizas (Beltrán y García, 2006; Chacini *et al.*, 2013). A pesar de prácticas de manejo específicas para evitar la incidencia de esta enfermedad, incluyendo aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos, no se ha logrado disminuir pérdidas de cosecha y postcosecha superiores al 40 y 60%, respectivamente (Huerta *et al.*, 2009; Trinidad-Ángel, 2017). Por la condición tropical y subtropical del Soconusco, la incidencia de este hongo es frecuente en cultivos de la región, principalmente frutícolas (Huerta *et al.*, 2009).

Por lo anterior, es necesario desarrollar estudios de eficacia biológica de nuevos productos con potencial para el control de *C. gloeosporioides* y que además representen una alternativa para los sistemas de producción orgánica. Este trabajo complementa estudios previos del efecto antifúngico a partir de extractos de miel producidas por las especies de abejas sin aguijón *M. beecheii*, *M. solani* y *S. mexicana* del Soconusco (Albores-

Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018).

On the other hand, *Colletotrichum gloeosporioides* is the fungal species most frequently reported to cause anthracnose in fruit trees and vegetables, in the field and postharvest (Beltrán and García, 2006; Chacini *et al.*, 2013). Despite the specific management practices used to prevent the incidence of this disease, which include application of contact and systemic fungicides, it has not been possible to reduce harvest and postharvest losses of more than 40 and 60%, respectively (Huerta *et al.*, 2009; Trinidad-Ángel, 2017). Because of the tropical and subtropical conditions that prevail in Soconusco, the incidence of this fungus is frequent in crops, especially fruit crops (Huerta *et al.*, 2009).

Based on the above, it is necessary to conduct studies to evaluate the biological effectiveness of new products to control *C. gloeosporioides* and which also provide an alternative for organic production systems. This study complements previous research on the antifungal effect using honey extracts of the stingless bee species *M. beecheii*, *M. solani* and *S. mexicana* collected in Soconusco (Albores-Flores *et al.* 2018). This research was focused on characterizing extracts of pollen aggregates at the physicochemical level and identifying potential bioactive compounds with antifungal effects on *C. gloeosporioides*, using material collected in commercial beehives of *M. beecheii*, *S. mexicana* and *Tetragonisca angustula*, a species whose effects on the fungus had not been previously studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples of aggregates of pollen of stingless bees.

Samples of pollen aggregates from commercial beehives of three stingless bee species (*M. beecheii*,



Flores *et al.*, 2018). Esta investigación se enfocó en caracterizar extractos de agregados de polen a nivel fisicoquímico e identificar potenciales compuestos bioactivos con efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides* a partir de material colectado de colmenas comerciales de *M. beecheii*, *S. mexicana* y *Tetragonisca angustula*, una especie no estudiada previamente respecto al hongo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras de agregados de polen de abeja sin aguijón.** Las muestras de agregados de polen de colmenas comerciales de tres especies de abejas sin aguijón *M. beecheii*, *S. mexicana* y *T. angustula* se colectaron de febrero 2017 a febrero de 2018. La identificación de especies se basó en trabajos previos regionales y con información taxonómica de la subfamilia (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Ayala *et al.* 2013). La localización de colmenas, número de muestras por especie y fechas de colecta se indican en el Cuadro 1. Las muestras de agregados de polen se colectaron con pinzas estériles de cajas racionales (cajas de abejas) y después se colocaron en frascos de plástico estériles previamente etiquetados con la información correspondiente. Las

*S. mexicana* and *T. angustula*) were collected from February 2017 to February 2018. The species were identified based on previous regional studies and using taxonomic information of the subfamily (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Ayala *et al.* 2013). The location of the beehives, number of samples per species and dates of collection are shown in Table 1. The pollen aggregate samples were collected using sterile forceps from rational boxes (bee boxes) and then placed in sterile plastic jars that were previously labeled with the corresponding information. The samples were concentrated and stored at -4 °C at the Biosciences Institute of the Autonomous University of Chiapas, in Tapachula.

**Physicochemical analysis.** The samples were determined in triplicate using the methods described by the AOAC (2003) and the following parameters: humidity (method 969.38), ashes (945.38), pH (method 962.19) and free acidity (method 962.19). The determination of free acidity was carried out according to Bogdanov (2002) and AOAC (2003) by potentiometric titration with an alkaline buffer up to pH 8.5.

**Extraction of total phenols.** For this, the protocol of Carpes *et al.* (2007) with modifications was used.

**Cuadro 1. Especie de abeja melipona, número y ubicación de meliponarios comerciales y la composición vegetal predominante en el área de las colmenas muestreadas en Chiapas, México.**

**Table 1. Stingless bee species, number, and location of commercial meliponine beekeepers, and plant composition that prevails in the area of Chiapas, Mexico, where beehives were sampled.**

| Especie (número meliponarios)       | Clave de Muestra | Establecimiento de la colmena | Fecha de colecta de polen | Tipo agroecológico (predominante) |
|-------------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <i>Tetragonisca angustula</i> (n=3) | TA1              | Mazatán                       | Febrero 2017              | Frutales (mango)                  |
|                                     | TA2              | Rancho San Juan, Mazatán      | Abril 2017                |                                   |
|                                     | TA3              | Rancho San Juan, Mazatán      | Junio 2017                |                                   |
| <i>Scaptotrigona mexicana</i> (n=6) | SM1              | Cacahoatán                    | Mayo 2017                 | Frutales (rambután)               |
|                                     | SM2              | Tapachula                     | Mayo 2017                 |                                   |
|                                     | SM3-SM6          | Mazatán                       | Agosto 2017               |                                   |
| <i>Melipona beecheii</i> (n=3)      | MB1-MB3          | Estancia Agroecológica "Ayol" | Enero-Febrero 2018        | Agrícola (temporal)               |

muestras se concentraron y almacenaron a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula.

**Análisis fisicoquímico.** Se determinaron por triplicado usando métodos descritos por la AOAC (2003) con los siguientes parámetros: humedad (método 969.38), cenizas (945.38), pH (método 962.19) y acidez libre (método 962.19). La determinación de acidez libre se realizó según Bogdanov (2002) y AOAC (2003) mediante la valoración potenciométrica con un buffer alcalino hasta pH 8.5.

**Extracción de fenoles totales.** Se utilizó el protocolo modificado de Carpes *et al.* (2007). La preparación de solución de agregado de polen se realizó colocando 1g de agregado en 5 mL de metanol:agua (1:1) a pH 2. Para flavonoides se utilizó etanol al 80% dejando en reposo por 24 h.

**Análisis del contenido de fenoles.** Se determinó por el método de Restrepo *et al.* (2009) con el reactivo Folin Ciocalteu. A partir del extracto de agregado de polen se tomó 1 mL para preparar concentraciones a 25, 50, 75 y 100 %. Cada concentración se mezcló con 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 con agua y se añadió 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La mezcla se mantuvo en oscuridad total durante 15 min para propiciar la reacción. Posteriormente, se registró la absorbancia a 765 nm. Una mezcla de metanol:agua (1:1) se empleó como blanco (testigo). Se realizó la curva de calibración para estimar el contenido de polifenoles con una solución de ácido gálico a las concentraciones 0, 50, 100, 150, 200, 250  $\text{mg L}^{-1}$  en una solución de metanol:agua (1:1). Los resultados del contenido total de polifenoles se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por cada 1 g de agregado de polen.

To prepare the pollen aggregates solution, 1 g of aggregate was mixed with 5 mL of methanol:water (1:1), pH 2. For flavonoids, 80% ethanol left to stand for 24 h was used.

**Analysis of phenols content.** It was determined following the method of Restrepo *et al.* (2009) with the Folin Ciocalteu reagent. From the extract of pollen aggregates, 1 mL was taken to prepare concentrations at 25, 50, 75 and 100%. Each concentration was mixed with 500  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent diluted with water 1/10, to which 400  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added. The mixture was kept in total darkness for 15 min to promote the reaction. Later, the absorbance was recorded at 765 nm. A mixture of methanol:water (1:1) was used as blank (control). The calibration curve to estimate the polyphenols content was created with a solution at concentrations of 0, 50, 100, 150, 200, 250  $\text{mg L}^{-1}$  in a methanol:water solution (1:1). The results of the total polyphenols content were expressed in equivalent mg of gallic acid per each 1 g of pollen aggregate.

**Analysis of flavonoids content.** It was determined using the technique of Restrepo *et al.* (2009). For this, quercetin dihydrate was used as a standard (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ). The calibration curve was built with a quercetin/methanol solution at different concentrations: 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01  $\text{mg mL}^{-1}$ . Afterwards, potassium acetate and aluminum trichloride were added, and the solution was kept in total darkness for 30 min. The absorbance was recorded at 415 nm.

**Antioxidant capacity.** To quantify the antioxidant activity, a discoloration of the radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) was carried out following the ABTS methodology

**Análisis del contenido de flavonoides.** Se determinó por la técnica de Restrepo *et al.* (2009). Para esto se empleó dihidrato de quercetina como estándar (1 mg mL<sup>-1</sup>). Se realizó una curva de calibración con una solución de quercetina/metanol a diferentes concentraciones: 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente se añadió acetato de potasio y tricloruro de aluminio y se dejó en oscuridad total durante 30 min. La absorbancia se registró a 415 nm.

**Capacidad antioxidante.** La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó mediante la decoloración del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) con la metodología ABTS (Overveld *et al.*, 2000). Los extractos resultantes de los agregados de polen, a concentraciones 25, 50, 75 y 100 %, se adicionaron con 20 mL de ABTS (2 mM) y 80 µL de persulfato de potasio 70 mM. Se dejaron en reposo y oscuridad a 25 °C durante 16 h para producir el radical ABTS+. La absorbancia ( $\lambda = 734$  nm) de la solución se ajustó a  $0.800 \pm 0.03$  unidades de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Modelo 4001/4) con ayuda de una solución reguladora de fosfatos 0.01 M (Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+NaCl+KCl en 1000 mL de agua destilada; pH 7.4 ajustado con NaOH). Para la construcción de la curva de calibración se agregaron 990 µL de la solución diluida de ABTS+ y se adicionaron 10 µL de solución Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) a diferentes concentraciones (0-400 µM en metanol al 80 % v/v). Después de 6 min de reposo, la absorbancia se leyó a 734 nm empleando metanol al 80% v/v como blanco. Los resultados se expresaron como la capacidad antioxidante equivalente a Trolox por g de extracto de polen.

**Actividad antifúngica.** La cepa de *C. gloeosporioides*, perteneciente a la colección del Instituto de

(Overveld *et al.*, 2000). The extracts obtained from pollen aggregates, at concentrations of 25, 50, 75 and 100%, were added with 20 mL of ABTS (2 mM) and 80 µL of potassium persulfate 70 mM. They were left to stand in darkness at 25 °C for 16 h to produce the ABTS+ radical. The solution absorbance ( $\lambda = 734$  nm) was adjusted to  $0.800 \pm 0.03$  absorbance units in a spectrophotometer (Thermo Scientific Model 4001/4), using a 0.01 M phosphate buffer (Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+NaCl+KCl in 1000 mL of distilled water; pH 7.4 adjusted with NaOH). To obtain the calibration curve, 900 µL of the diluted solution of ABTS+ and 10 µL of Trolox solution (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchrome-2-carboxylic acid) were added at different concentrations (0-400 µM in 80% v/v methanol). After 6 min standing, the absorbance was recorded at 734 nm using 80% v/v methanol as blank. The results were expressed as the antioxidant capacity equivalent to Trolox per g of pollen extract.

**Antifungal activity.** The *C. gloeosporioides* strain, belonging to the collection of the Biosciences Institute, isolated from *Carica papaya* fruits, and morphologically identified by Víctor Albores (unpublished data), was reactivated in potato-dextrose-agar (PDA) nutrient medium. The antifungal activity was evaluated by mixing methanolic extracts of the collected pollen aggregates of each bee species with PDA *in vitro*. The treatments, in triplicate, consisted of mixtures of 100 µL of extracts at 25, 50, 75 and 100% with 20 mL of PDA that was previously prepared. After sowing the strain in 0.5 cm colonial disks in the middle of 52 mm Petri dishes, it was incubated at 32 °C in a stove for 12 days. Mycelial growth was measured every 24 h with a Vernier caliper 0-150 mm capacity for nine days. The *C. gloeosporioides* colony growth in PDA under the same experimental conditions was used as the absolute control. The

Biociencias, aislada de frutos de *Carica papaya* e identificada morfológicamente por Víctor Albores (Datos no publicados), se reactivó en medio nutritivo papa dextrosa agar (PDA). La actividad antifúngica se evaluó mezclando extractos metanólicos de agregados de polen colectados de cada especie de abeja con PDA *in vitro*. Los tratamientos, por triplicado, consistieron en mezclas de 100 µL de extractos a 25, 50, 75 y 100 % con 20 mL de PDA previamente preparado. Posterior a la siembra de la cepa, consistente en discos coloniales de 0.5 cm colocadas al centro de cajas Petri de 52 mm, se incubó a 32 °C en una estufa durante 12 días. El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un Vernier con capacidad de 0-150 mm durante nueve días. Como testigo absoluto se empleó el crecimiento de una colonia de *C. gloeosporioides* en PDA bajo las mismas condiciones experimentales. Los testigos relativos de inhibición, por triplicado, fueron: 1) solución de metanol/agua, 2) clorotalonil a 21 mg mL<sup>-1</sup> y 3) clorotalonil a 56 mg mL<sup>-1</sup>, estos dos últimos acordes a dosis comerciales aplicadas al cultivo de *C. papaya* por la Asociación de fruticultores del Soconusco, Chiapas.

**La velocidad de crecimiento absoluto.** Se determinó mediante la siguiente ecuación:  $\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$ . Donde:  $\mu$  es velocidad de crecimiento de colonia (mm día<sup>-1</sup>);  $Db$  es el diámetro de la colonia (mm) en el tiempo  $b$ ;  $Da$ , corresponde al diámetro de la colonia en el tiempo  $a$ , y,  $tb$  y  $ta$  es el tiempo de crecimiento absoluto entre dos evaluaciones. Para el cálculo comparativo del crecimiento de *C. gloeosporioides* de los cuatro extractos (1-4) respecto a los testigos relativos (1-3) se utilizó la siguiente ecuación:  $DFC = [(D \text{ testigo relativo}_{1,3} - D \text{ extracto}_{1,4}) / (D \text{ testigo relativo}_{1,3})] \times 100$ . Donde,  $DFC$  es la diferencia en el diámetro (mm) de la colonia entre el  $D$  testigo relativo<sub>1,3</sub> y el  $D$  extracto del agregado de polen<sub>1,4</sub> expresado en porcentaje.

inhibition relative controls, in triplicate, were: 1) methanol/water, 2) chlorothalonil at 21 mg mL<sup>-1</sup>, and 3) chlorothalonil at 56 mg mL<sup>-1</sup>; the last two according to commercial doses applied to *C. papaya* crops by the Asociación de Fruticultores del Soconusco, Chiapas.

**Rate of absolute growth.** It was determined using the following equation:  $\mu = (Db - Da) / (tb - ta)$ . Where:  $M$  is the rate of the colony growth (mm day<sup>-1</sup>);  $Db$  is the diameter of the colony (mm) in time  $b$ ;  $Da$  corresponds to the diameter of the colony in time  $a$ ; and  $tb$  and  $ta$  is the time of absolute growth between two evaluations. For the comparative calculation of *C. gloeosporioides* growth in the four extracts (1-4) with respect to the relative controls (1-3), the following equation was used:  $DFC = [(D \text{ relative control}_{1,3} - D \text{ extract}_{1,4}) / (D \text{ relative control}_{1,3})] \times 100$ . Where,  $DFC$  is the difference in the diameter of the colony (mm) divided by  $D$  relative control<sub>1,3</sub> and  $D$  extract of the pollen aggregate<sub>1,4</sub> expressed as percent.

**Analysis of data.** The data of all the physicochemical variables were subjected to a multivariate analysis of variance (MANOVA), considering each species-collection as a treatment. The media comparison was carried out using Hotelling's test ( $\alpha=0.05$ ). To determine the separation or groups of collections and species, a linear discriminant analysis (LDA) was performed. A principal component analysis (PCA) was carried out to explain the relative weight of the physicochemical variables in the composition of the pollen aggregates within and among species. The relationship of the mycelial growth with phenols, flavonoids, Trolox and the antioxidant activity was estimated using r-Spearman. An ANOVA analysis by bee species and growth evaluation date was conducted in order to compare the effect of the four concentrations of extracts of pollen aggregates

**Análisis de datos.** Los datos de todas las variables fisicoquímicas se analizaron por análisis de varianza multivariado (AMOVA) considerando cada especie-colecta como un tratamiento. La comparación de medias se realizó por la prueba Hotelling ( $\alpha=0.05$ ). Para determinar la separación o agrupación de colectas y especies se utilizó un análisis discriminante (ADL). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para explicar el peso relativo de las variables fisicoquímicas en la composición de los agregados de polen dentro y entre especies. La relación del crecimiento micelial con fenoles, flavonoides, Trolox y actividad antioxidante se estimó con r-Spearman. Se realizó un análisis ANOVA por especie de abeja y fecha de evaluación del crecimiento para comparar el efecto de las cuatro concentraciones de extractos de agregados de polen con los testigos relativos. Todos los análisis se realizaron en INFOSTAT.

## RESULTADOS

El resultado del análisis fisicoquímico de agregados de polen colectado por *M. beecheii*, *S. mexicana* y *T. angustula* se observa en el Cuadro 2. De manera general, los valores de humedad fueron de 12.2 a 31.4%, cenizas de 0.9 a 5.9%, pH estuvo en rango de 2.2 a 3.5, acidez libre de 117 a 233.4 meq Kg<sup>-1</sup>, fenoles de 1.2 a 2.6 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoides de 0.9 a 3.1 µg EQ g<sup>-1</sup>, trolox de 4.3 a 8.1 mg Trolox g<sup>-1</sup> y en concentración de glucosa de 0.01 a 0.3 mg L<sup>-1</sup>. En el análisis multivariado se encontró significancia de la especie de abeja-colecta en el contenido fisicoquímico ( $p=0.0001$ ). Todas las combinaciones especie-colecta fueron estadísticamente diferentes ( $p=0.05$ ), observándose que los valores multivariados fueron mayores en *M. beecheii* y menores para *T. angustula*. La cantidad de fenoles y flavonoides estuvieron relacionadas

with the relative controls. All the analyses were conducted in INFOSTAT.

## RESULTS

The result of the physicochemical analysis of pollen aggregates collected by *M. beecheii*, *S. mexicana* and *T. angustula* is shown in Table 2. Overall, the humidity values ranged from 12.2 to 31.4%, ashes from 0.9 to 5.9%, pH from 2.2 to 3.5, free acidity from 117 to 233.4 meq Kg<sup>-1</sup>, phenols from 1.2 to 2.6 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoids from 0.9 to 3.1 µg EQ g<sup>-1</sup>, Trolox from 4.3 to 8.1 mg Trolox g<sup>-1</sup>, and the concentration of glucose from 0.01 to 0.3 mg L<sup>-1</sup>. The multivariate analysis was significant on bee species in the physicochemical content ( $p=0.0001$ ). All the species-collection combinations were statistically different ( $p=0.05$ ); *M. beecheii* had the highest values, while *T. angustula* had the lowest. The amount of phenols and flavonoids were positively related to the antifungal activity ( $p\leq 0.02$ ), while the antioxidant capacity (Trolox) had a negative r-Spearman (-0.41 to -0.61) (Table 3). In most of the extracts associated with *S. mexicana* and *M. beecheii* species, the antioxidant activity had a negative correlation with the antifungal activity.

The discriminant analysis explained 91.1% of variance in the first two components, CAN 1 (80%) and CAN 2 (11.1%). The greatest weight in CAN 1 corresponded to phenols, flavonoids, and free acidity. The formation of groups clearly included the three replications of each species-collection but there was significant variation between intra and inter-species collections. According to MANOVA, the collections from *M. beecheii* beehives were separated from the other collections and distributed across the positive dimension of CAN 1. The other two species-collections were distributed across CAN 2, which had the greatest weight of pH, ashes,



**Cuadro 2. Valores fisicoquímicos del polen colectado por *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) y *Tetragonisca angustula* (Tar) en diferentes regiones del Soconusco, Chiapas.**

**Table 2. Physicochemical values of pollen collected by *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) and *Tetragonisca angustula* (Tar) in different regions of Soconusco, Chiapas.**

| Clave de muestra | pH  | Humedad (%) | Cenizas (%) | Variables fisicoquímicas             |                              |                                   |                                      |                               |                  |
|------------------|-----|-------------|-------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------|
|                  |     |             |             | Acidez Libre (meq kg <sup>-1</sup> ) | Trolox (mg g <sup>-1</sup> ) | Fenoles (mg EAG g <sup>-1</sup> ) | Flavonoides (mg EQ g <sup>-1</sup> ) | Glucosa (mg L <sup>-1</sup> ) | Prueba hotelling |
| MB1              | 2.2 | 31.4        | 0.9         | 127.1                                | 6.8                          | 2.2                               | 1.8                                  | 0.04                          | C                |
| MB2              | 2.6 | 19.6        | 1.1         | 233.3                                | 5.8                          | 2.6                               | 2.9                                  | 0.1                           | B                |
| MB3              | 2.5 | 12.2        | 3.4         | 206.2                                | 6.4                          | 2.5                               | 3.1                                  | 0.01                          | A                |
| TA1              | 3.3 | 21.1        | 2.5         | 126.6                                | 7.9                          | 1.9                               | 1.3                                  | 0.2                           | J                |
| TA2              | 3.4 | 24.7        | 4.1         | 146.4                                | 7.4                          | 1.8                               | 1.7                                  | 0.2                           | K                |
| TA3              | 3.3 | 26.2        | 3.9         | 133.2                                | 8.0                          | 2.2                               | 1.6                                  | 0.3                           | L                |
| SM1              | 3.3 | 30.6        | 1.8         | 142.8                                | 7.4                          | 1.2                               | 1.5                                  | 0.1                           | F                |
| SM2              | 3.3 | 27.0        | 2.1         | 159.9                                | 6.8                          | 1.5                               | 1.2                                  | 0.01                          | E                |
| SM3              | 3.5 | 12.2        | 2.4         | 146.4                                | 8.1                          | 1.4                               | 1.3                                  | 0.02                          | D                |
| SM4              | 3.3 | 23.7        | 2.8         | 117.9                                | 4.3                          | 1.3                               | 1.0                                  | 0.3                           | I                |
| SM5              | 3.5 | 27.5        | 5.9         | 183.1                                | 5.3                          | 2.1                               | 1.1                                  | 0.06                          | H                |
| SM6              | 3.5 | 24.3        | 3.4         | 129.9                                | 5.5                          | 2.0                               | 0.9                                  | 0.03                          | G                |

<sup>3</sup>La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. <sup>4</sup>The reference information of each sample of pollen extract is described in Table 1.

positivamente con la actividad antifúngica ( $p \leq 0.02$ ), mientras que la capacidad antioxidante (Trolox) tuvo una r-Spearman negativa (-0.41 a -0.61) (Cuadro 3). En la mayoría de los extractos asociados a la especie *S. mexicana* y *M. beecheii*, la actividad antioxidante presentó correlación negativa con la actividad antifúngica.

Con el análisis discriminante se explicó el 91.1% de varianza en los primeros dos componentes, CAN 1 (80%) y CAN 2 (11.1%). El mayor peso en CAN 1 lo aportaron fenoles, flavonoides y acidez libre. La conformación de grupos incluyó claramente las tres repeticiones por cada especie-colecta, pero mostró amplia variación entre colectas intra- e inter-especie. En concordancia con MANOVA, las colectas correspondientes a colmenas de *M. beecheii* se separaron del resto distribuyéndose en la dimensión positiva de CAN 1. En CAN 2, con un mayor peso de pH, cenizas y glucosa, se distribuyeron las otras dos especies-colectas, siendo *S. mexicana* la que tuvo mayor dispersión (Figura 1A).

and glucose; *S. mexicana* had the highest dispersion (Figure 1A).

The analysis of main components explained 58% of the multivariate variance (CP1=43.5; CP2=14.8%) in the two first components. CP1 was mainly explained by flavonoids, pH, and free acidity, while CP2 was determined by ashes and glucose. Phenols had similar weight in both components (Figure 1B). The projection of the collections in this multivariate space unmarked *M. beecheii* samples from beehives established in an agroecological area where annual agricultural crops prevail (MB3 and MB2). The remaining collections had low dispersion regarding low values of CP1 and CP2.

**Antifungal activity.** The three bee species and four methanolic extracts that were evaluated showed *C. gloeosporioides* inhibition compared to the controls. From day three of incubation and up to the end, at day nine, statistical differences were observed in the fungus mycelial growth compared to the

**Cuadro 3. Valores del coeficiente de correlación entre la concentración de fenoles, flavonoides y Trolox con la actividad antifúngica de los extractos de polen de cada especie de abeja.**  
**Table 3. Values of the correlation coefficient among the concentration of phenols, flavonoids and Trolox with the antifungal activity of pollen extracts from each bee species.**

| Clave de Muestra | Fenoles  |         | Flavonoides |         | Trolox   |         |
|------------------|----------|---------|-------------|---------|----------|---------|
|                  | Spearman | Valor p | Spearman    | Valor p | Spearman | Valor p |
| MB1              | 0.82     | <0.0001 | 0.77        | 0.0018  | -0.51    | 0.0154  |
| MB2              | 0.86     | <0.0001 | 0.81        | 0.0001  | -0.46    | 0.0525  |
| MB3              | 0.86     | <0.0001 | 0.80        | 0.0001  | -0.51    | 0.0154  |
| TA1              | 0.74     | 0.0012  | 0.76        | 0.0018  | -0.44    | 0.0722  |
| TA2              | 0.74     | 0.0012  | 0.72        | 0.0032  | -0.42    | 0.0915  |
| TA3              | 0.78     | 0.0001  | 0.70        | 0.0040  | -0.41    | 0.1458  |
| SM1              | 0.80     | <0.0001 | 0.70        | 0.0040  | -0.44    | 0.0722  |
| SM2              | 0.80     | <0.0001 | 0.70        | 0.0040  | -0.51    | 0.0154  |
| SM3              | 0.81     | <0.0001 | 0.66        | 0.0051  | -0.42    | 0.0915  |
| SM4              | 0.88     | <0.0001 | 0.62        | 0.0073  | -0.61    | 0.0003  |
| SM5              | 0.91     | <0.0001 | 0.62        | 0.0073  | -0.55    | 0.0083  |
| SM6              | 0.88     | <0.0001 | 0.58        | 0.0241  | -0.56    | 0.0083  |

<sup>∧</sup>La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. <sup>∧</sup>The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

Con el análisis de componentes principales, los primeros dos componentes explicaron el 58% de la varianza multivariada (CP1=43.5; CP2=14.8%). CP1 fue explicado principalmente por flavonoides, pH y acidez libre, mientras que CP2 estuvo determinado por cenizas y glucosa. Fenoles tuvo similar peso en ambos componentes (Figura 1B). La proyección de las colectas en este espacio multivariado desmarcó muestras de *M. beecheii* de colmenas establecidas en una estancia agroecológica con predominancia de cultivos anuales agrícolas (MB3 y MB2). El resto de colectas tuvieron poca dispersión en torno a valores bajos de CP1 y CP2.

**Actividad antifúngica.** En las tres especies de abejas y cuatro concentraciones evaluadas de extractos metanólicos se detectó inhibición de *C. gloeosporioides* respecto a los testigos. A partir del tercer día de incubación y hasta su término a los nueve días, se observaron diferencias estadísticas en el crecimiento micelial del hongo respecto

methanol-water ( $p < 0.0001$ ) control. From day four onwards, the concentrations at 25, 50, 75 and 100% started to differentiate from the same control. The differences ranged from 20 to 64% depending on the growth time rather than the species (Figure 2). From day five or six, the concentrations at 75 and 100% exceeded or equaled the inhibitory effect of chlorothalonil at its highest concentration (56 mg mL<sup>-1</sup>). The *S. mexicana* extracts at 50% were the only ones that also exceeded the inhibition caused by the fungicide at that concentration. The *T. angustula* extracts had the lowest effect compared to chlorothalonil because only at a concentration of 100% exceeded the highest doses (Figure 2). The collection-species had an effect on the fungus inhibitory capacity. For example, *M. beecheii* MB1 collection had a higher effect than MB1 and MB2 (Figure 3). When the final mycelial growth of the relative control was compared to that of the absolute control (5.1 cm), it was found that methanol/water (3.8 cm) reduced the fungus growth by 25.4% and

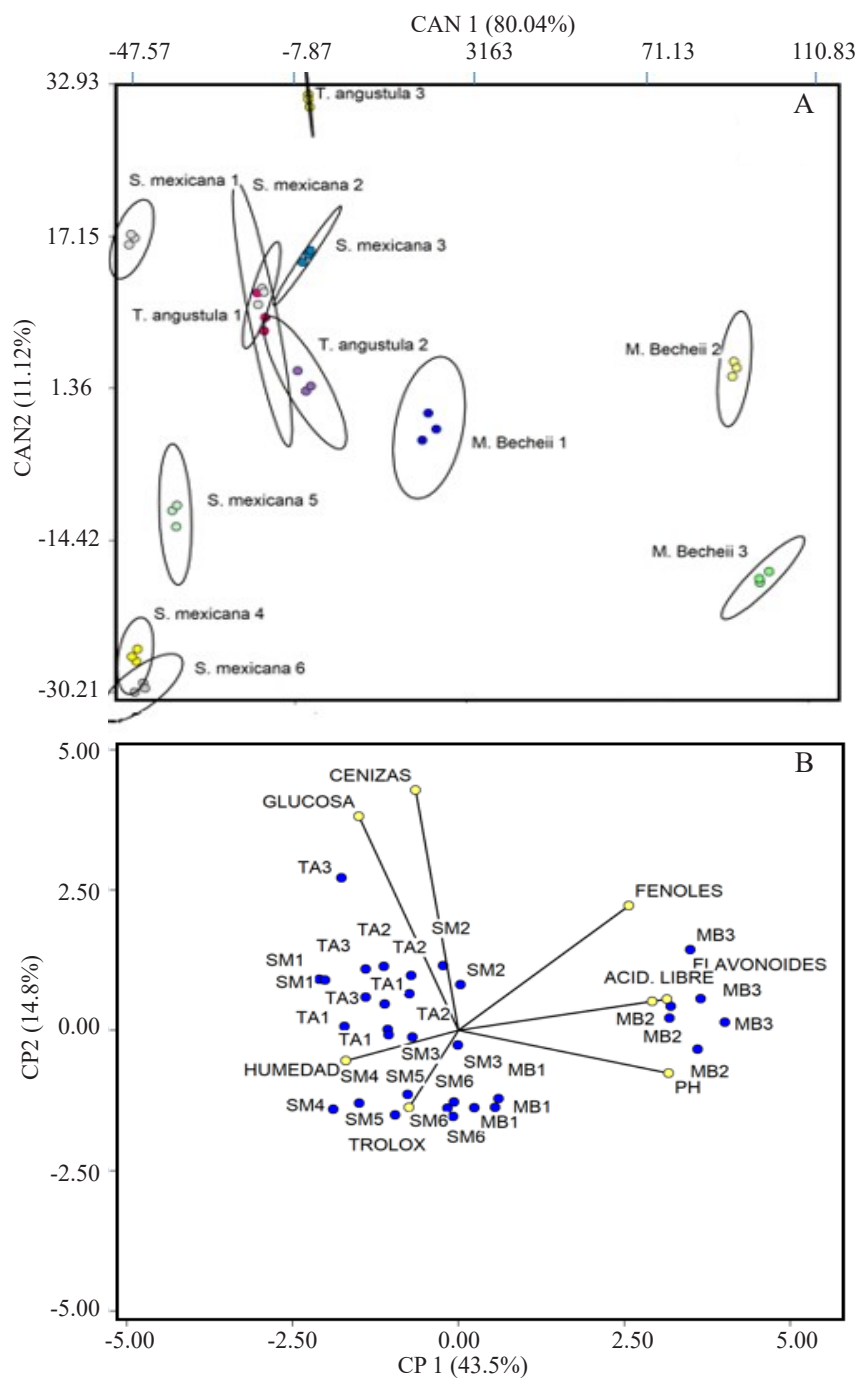


Figura 1. Análisis discriminante canónico para las tres especies de abeja colectoras de polen (A) y análisis de componentes principales de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de polen (B). La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1.

Figure 1. Canonical discriminant analysis of the three pollen collector bees (A) and analysis of the main components of the antimicrobial activity of the pollen methanolic extracts (B). The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

al testigo metanol/agua ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 4). Al cuarto día en adelante, las concentraciones 25, 50, 75 y 100% comenzaron a diferenciarse del mismo testigo. Las diferencias estuvieron en el rango 20-64% dependiendo del tiempo de crecimiento más que de la especie (Figura 2). Desde el quinto o sexto día, las concentraciones 75 y 100% superaron o igualaron el efecto inhibitorio del clorotalonil en su concentración más alta (56 mg mL<sup>-1</sup>). Extractos de *S. mexicana* a 50% fueron los únicos que también superaron la inhibición causada por el fungicida a esa concentración. Los extractos de *T. angustula* fueron los que tuvieron el menor efecto respecto a clorotalonil ya que únicamente la concentración 100% superó la dosis alta (Figura 2). Se detectó un efecto colecta-especie en la capacidad inhibitoria

chlorothalonil by 35.3% (3.3 cm, 21 mg mL<sup>-1</sup>) and 58.8% (2.1cm, 56 mg mL<sup>-1</sup>). Overall, the rate of *C. gloeosporioides* mycelial growth ranged from 0.027-0.041, 0.022-0.037, 0.012-0.025, and 0.009-0.013 mm h<sup>-1</sup> at concentrations of 25, 50, 75 and 100%, respectively.

## DISCUSSION

The physicochemical composition of the pollen aggregates collected from commercial stingless bee beehives was heterogeneous at intra- and inter-species level because of the bees' territorial exploration capacity and pollen collection from different plant species (Table 1). However, it was

**Cuadro 4. Valores de diferencia en diámetro de colonia (DFC) de *Colletotrichum gloeosporioides* (expresados en valores de porcentaje) entre los extractos de polen colectados por las abejas y los tratamientos testigo (clorotalonil=Clor). (Se colocan únicamente en las concentraciones donde los extractos de polen de cada especie de abeja son menores en tamaño de colonia a la mayoría de los tratamientos testigo, los valores positivos indican que el diámetro de colonia con los extractos fue menor al testigo).**

**Table 4. Difference values in (DFC) *Colletotrichum gloeosporioides* colony diameter (expressed as percent values) among the pollen extracts collected by bees and the control treatments (chlorothalonil=Clor). (They are placed only at the concentrations where the pollen extracts of each bee species whose colony size is smaller than most of the control treatments, and the positive values indicate that the colony diameter with the extracts was smaller than that of the control).**

| Clave de muestra | Extracto | Metanol/ agua (E-a) | Clor (21 mg mL <sup>-1</sup> ) (E-b) | Clor (56 mg mL <sup>-1</sup> ) (E-c) | Clave de muestra | Extracto | Metanol/ agua (E-a) | Clor (21 mg mL <sup>-1</sup> ) (E-b) | Clor (56 mg mL <sup>-1</sup> ) (E-c) |
|------------------|----------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| MB1              | 75       | 51.9                | 40.4                                 | 14.4                                 | SM1              | 75       | 48.1                | 35.7                                 | 7.6                                  |
|                  | 100      | 65.5                | 56.5                                 | 37.5                                 |                  | 100      | 57.0                | 45.8                                 | 22.1                                 |
| MB2              | 75       | 60.9                | 51.5                                 | 30.3                                 | SM2              | 75       | 46.1                | 33.3                                 | 4.0                                  |
|                  | 100      | 65.6                | 56.6                                 | 37.6                                 |                  | 100      | 57.7                | 46.6                                 | 23.3                                 |
| MB3              | 75       | 58.2                | 48.2                                 | 25.6                                 | SM3              | 75       | 49.4                | 37.3                                 | 9.8                                  |
|                  | 100      | 64.2                | 54.9                                 | 35.1                                 |                  | 100      | 60.3                | 49.9                                 | 28.1                                 |
| TA1              | 75       | 42.8                | 29.1                                 | -1.9                                 | SM4              | 75       | 53.3                | 42.1                                 | 16.8                                 |
|                  | 100      | 54.7                | 42.9                                 | 17.9                                 |                  | 100      | 62.4                | 52.7                                 | 32.0                                 |
| TA2              | 75       | 43.5                | 29.9                                 | -0.7                                 | SM5              | 75       | 54.2                | 43.2                                 | 18.4                                 |
|                  | 100      | 53.1                | 40.8                                 | 14.9                                 |                  | 100      | 62.8                | 53.1                                 | 32.6                                 |
| TA3              | 75       | 39.7                | 25.2                                 | -7.5                                 | SM6              | 75       | 56.2                | 45.7                                 | 22.0                                 |
|                  | 100      | 53.1                | 40.8                                 | 14.9                                 |                  | 100      | 61.8                | 51.8                                 | 30.7                                 |

<sup>2</sup>La información de referencia de cada muestra de extracto de polen se describe en el Cuadro 1. ♦ <sup>2</sup>The reference information of each pollen extract sample is described in Table 1.

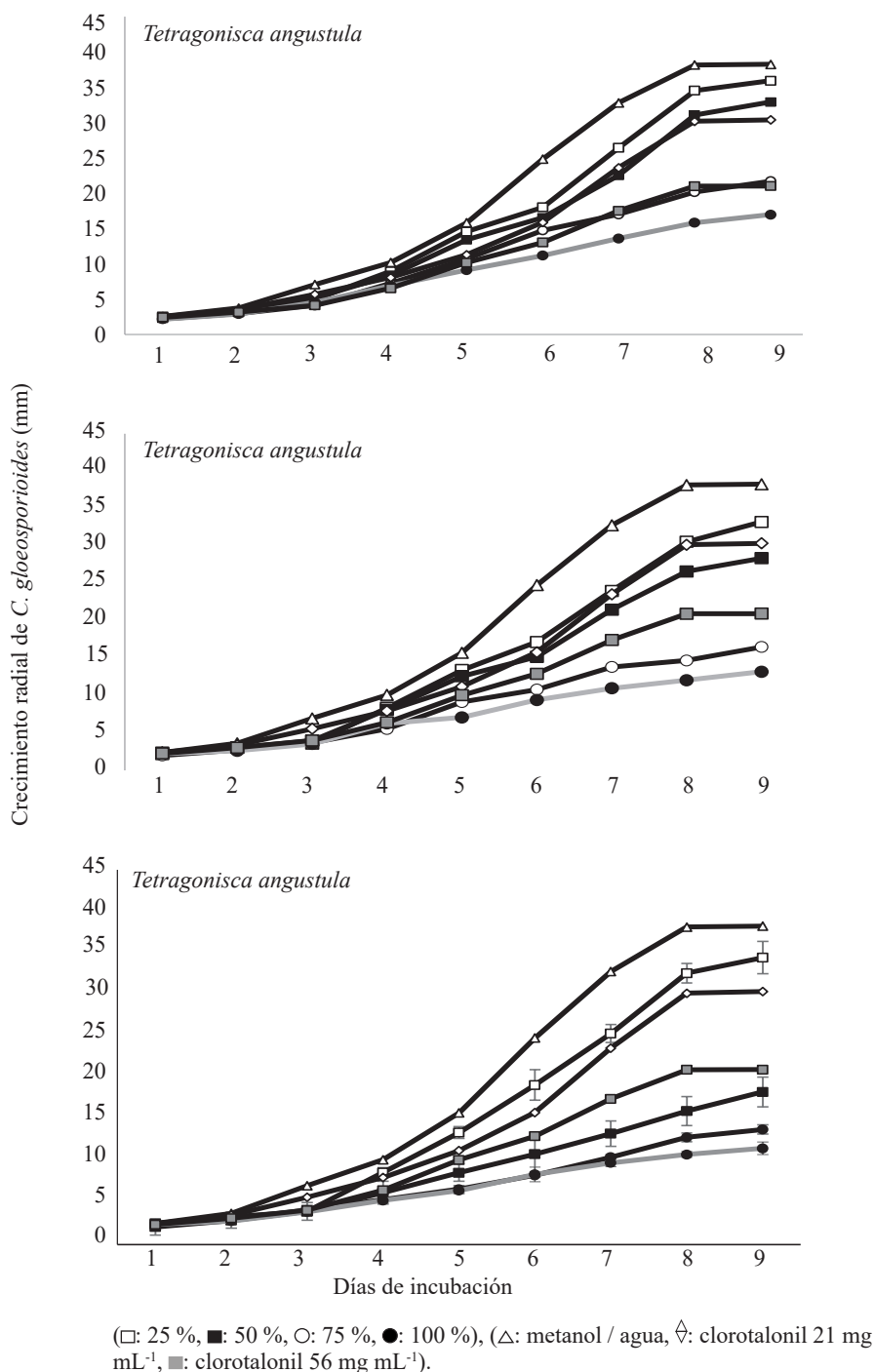


Figura 2. Valores promedio del crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de extracto metanólico a diferentes concentraciones de agregado de polen de *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) y *Tetragonisca angustula* (Ta).

Figure 2. Average values of *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* in the presence of methanolic extract at different concentrations of pollen aggregates of *Melipona beecheii* (Mb), *Scaptotrigona mexicana* (Sm) and *Tetragonisca angustula* (Ta).



del hongo. Por ejemplo, la colecta MB1 de *M. beecheii* tuvo mayor efecto que MB1 y MB2 (Figura 3). Al comparar el crecimiento micelial final de los testigos relativos con el testigo absoluto (5.1 cm) se encontró que metanol/agua (3.8 cm) redujo el crecimiento del hongo en 25.4% y el clorotalonil en 35.3 % (3.3 cm, 21 mg mL<sup>-1</sup>) y 58.8 % (2.1cm, 56 mg mL<sup>-1</sup>). En general, la velocidad de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* estuvo en el rango de 0.027-0.041, 0.022-0.037, 0.012-0.025, y 0.009-0.013 mm h<sup>-1</sup> en las concentraciones 25, 50, 75 y 100%, respectivamente.

## DISCUSIÓN

La composición fisicoquímica de los agregados de polen colectados de colmenas comerciales de abeja sin aguijón fue heterogénea a nivel intra- e inter-especie debido a la capacidad de exploración territorial de las abejas y a la recolección de polen

possible to classify the species in groups, observing that *M. beecheii* was segregated from the other species. The species effect can be associated with vegetal exploitation niches in order to prevent interspecific competence more than some metabolic effect. Previous reports indicate that this is a single-flower species which prefer fabaceae 45% in contrast with *M. solani* and *S. mexicana* (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). The physicochemical composition at the pollen aggregates level has an implication in its quality, and nutritional, therapeutic, antioxidant and antimicrobial value (Márgãoan *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2013). Physicochemical heterogeneity has also been reported in studies about honey produced by meliponines in Soconusco (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018), and the value of these attributes for ecological purposes has been recognized (Vit, 2008). The correlation from the physicochemical variables with the antioxidant capacity of the extracts of pollen aggregates suggests that phenols, flavonoids and free acidity

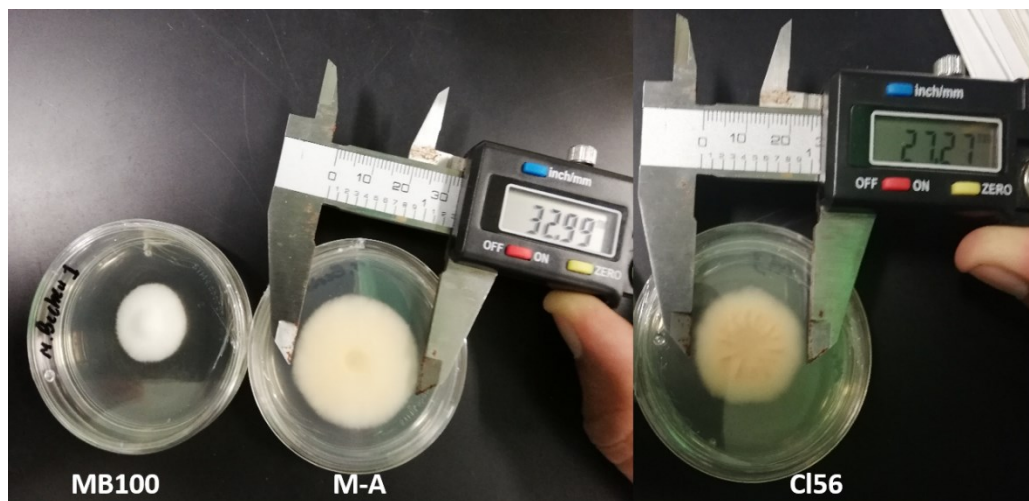


Figura 3. Crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de extracto metanólico de agregado de polen de *Melipona beecheii* (MB100) (100%), así como los controles metanol/agua (M-A) y clorotalonil 56 mg mL<sup>-1</sup> (CI56).  
Figure 3. *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* in the presence of methanolic extract of *Melipona beecheii* (MB100) (100%) pollen aggregate, as well as the controls methanol/water (M-A) and chlorothalonil 56 mg mL<sup>-1</sup> (CI56).

de diferentes especies vegetales (Cuadro 1). Sin embargo, se pudieron clasificar las especies en grupos, observándose que *M. beechii* se segregó del resto de las especies. El efecto de especie puede estar asociado a nichos de explotación vegetal con el fin de evitar competencia interespecífica más que a algún efecto metabólico. Previamente se reportó que esta especie es monofloral con preferencia en fabáceas 45%, en contraste a *M. solani* y *S. mexicana* (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). La composición fisicoquímica a nivel de agregados de polen tiene implicación en su calidad y valor nutrimental, terapéutico, antioxidante y antimicrobiano (Mărgăoan *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2013). La heterogeneidad fisicoquímica también se ha reportado en estudios de miel producida por meliponinos en el Soconusco (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018), y se ha reconocido el valor de estos atributos con fines ecológicos (Vit, 2008).

La correlación obtenida de las variables fisicoquímicas con la capacidad antioxidante de los extractos de agregados de polen sugiere que los fenoles, flavonoides y acidez libre ejercen mayor acción inhibitoria en el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* (Cuadro 3) (Mărgăoan *et al.*, 2010). Lo anterior podría estar relacionado con el tipo de compuestos fenólicos extraídos de los agregados de polen, que no tengan la propiedad de ser donadores de electrones y sean ácidos, evitando reaccionar con el radical oxidado ABTS. Este compuesto actúa sobre polifenoles donadores de átomos de hidrógeno mientras que el complejo férrico en FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones (Schaich *et al.*, 2015). No se pudo atribuir que la capacidad oxidante observada en las muestras de extracto de agregado de polen de abeja sin guijón se deba a un componente en particular. La capacidad antioxidante es el resultado de la interacción entre moléculas que componen cada muestra (Paulino-Zunini *et al.*, 2010). Por lo anterior, la

exert a higher inhibitory action on *C. gloesporioides* mycelial growth (Table 3) (Mărgăoan *et al.*, 2010). This could be associated with the type of phenolic compounds extracted from pollen aggregates, which do not have the property of donating electrons and are acidic and prevent a reaction with the ABTS oxidized radical. This compound acts on polyphenols which donate hydrogen atoms, while the ferric complex in FRAP acts on polyphenols that can donate electrons (Schaich *et al.*, 2015). It was not possible to state that the oxidizing capacity observed in the samples of extracts of stingless bee pollen aggregate was caused by a component in particular. The antioxidant capacity is the result of the interaction between molecules that make up each sample (Paulino-Zunini *et al.*, 2010). Based on this, the low relationship obtained with the antifungal activity would be defined by diverse factors, such as the chemical composition of the sample, geographical region and plant from which the pollen was taken (Bertrams *et al.*, 2013; Duran *et al.*, 2011).

The lowest relationship between the antioxidant and antifungal capacity in the extracts of *T. angustula* pollen aggregates could be caused by the sample composition (Mărghitaș *et al.*, 2009). On the other hand, it could also be due to a methodological effect, since, according to the solvent, it is possible to determine what molecule was extracted (Muñoz *et al.*, 2015). The inhibitory effect of the extracts of pollen aggregates is consistent with other reports where it is recognized that the type of biomolecule and its bioactivity can vary making it possible to differentiate regions and taxa, but implying the sample effect (Pellati *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Ruíz-Montañez *et al.*, 2014).

The extracts of pollen aggregates showed a clear inhibitory effect on *C. gloesporioides* compared to chlorothalonil commercial fungicide. The inhibitory action in each extract of pollen

baja relación obtenida con la actividad antifúngica estaría definida por diversos factores como la composición química de la muestra, región geográfica y fuente vegetal del polen (Bertrams *et al.*, 2013; Duran *et al.*, 2011).

La menor relación entre la capacidad antioxidante y la antifúngica en extractos de agregado de polen de *T. angustula* puede deberse a la composición de la muestra (Mărghitaş *et al.*, 2009). Por otra parte, también puede haber un efecto metodológico ya que de acuerdo al solvente se puede determinar la molécula extraída (Muñoz *et al.*, 2015). El efecto inhibitorio de extractos de agregados de polen es consistente con otros reportes donde se reconoce que el tipo de biomolécula y su bioactividad puede ser variable permitiendo diferenciar regiones y taxas pero implicando el efecto de la muestra (Pellati *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Ruíz-Montañez *et al.*, 2014).

Los extractos de agregados de polen mostraron un claro efecto inhibitorio en *C. gloeosporioides* comparados con el fungicida comercial clorotalonil. La acción inhibitoria observada en cada extracto de agregado de polen estuvo asociada con la acción extractora del solvente y a la composición química de las muestras de polen. La concentración relativamente alta de compuestos fenólicos, en los cuales pueden estar incluidos terpenoides, fenilpropanoides, estilbenos y saponinas (Soto y Rosales, 2016), pueden estar implicados en la actividad antifúngica. Los extractos hidrofílicos de células vegetales están fuertemente relacionados con la inhibición del crecimiento celular y la germinación de conidios de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* y, además pueden ser tóxicos en procesos de respiración microbiana (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). El 60% de extractos hidrofílicos presentan alta cantidad de flavonoides y fenoles (Pietarinen *et al.*, 2006; Okwu y Nnamdi, 2008).

aggregate was associated with the extracting action of the solvent and the chemical composition of the pollen samples. The relatively high concentration of phenolic compounds, which may include terpenoids, phenylpropanoids, stilbenes and saponins (Soto and Rosales, 2016), can be involved in the antifungal activity. The hydrophilic extracts of plant cells are strongly related to *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* cell growth inhibition and conidia germination and can also be toxic in microbial respiration processes (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). 60% of hydrophilic extracts contain a large amount of flavonoids and phenols (Pietarinen *et al.*, 2006; Okwu and Nnamdi, 2008).

The antifungal property of the pollen aggregates collected by *A. mellifera* has been reported to inhibit up to 70% of mycelial growth in *Aspergillus niger* and 99.9% in *A. fumigatus* (Kacaniova *et al.*, 2012). Similar effects have been reported in *Alternaria*, *Botrytis* and *Fusarium* (Cabrera and Montenegro, 2013). Regarding antifungal properties of pollen aggregates associated with stingless bees, there are reports of *T. angustula* and 26% inhibition in *Candida albicans* (Rojas, 2015). In Soconusco, previous studies using meliponines honey showed 40% more effectiveness than chlorothalonil fungicide in *C. gloeosporioides* (Albores-Flores *et al.*, 2018). In contrast, these results, using extracts of pollen aggregates collected by the same species (*M. beecheii*, *S. mexicana*), had a higher effect up to 50% than the fungicide in high commercial doses (56 mg mL<sup>-1</sup>), depending on the extract concentration. This study provides the first report of the antifungal properties of meliponines pollen aggregates. In particular, for Soconusco, Chiapas, stingless bees are an alternative for pollination of different economically important crops, besides honey, pollen aggregates and propolis are medical alternatives for treating diabetic ulcers, and are also

La propiedad antifúngica de agregados de polen colectadas por *A. mellifera* se ha reportado hasta en 70% de inhibición micelial en *Aspergillus niger* y 99.9% en *A. fumigatus* (Kacaniova *et al.*, 2012). Similares efectos se han reportado en *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium* (Cabrera y Montenegro, 2013). Respecto a las propiedades antifúngicas de agregados de polen asociados a abeja sin aguijón, se tienen reportes con *T. angustula* e inhibición del 26% en *Candida albicans* (Rojas, 2015). En el Soconusco, estudios previos con mieles de meliponinos demostraron un efecto 40% mayor que el fungicida clorotalonil en *C. gloeosporioides* (Albores-Flores *et al.*, 2018). En contraste, estos resultados con extractos de agregados de polen colectados por las mismas especies (*M. beecheii*, *S. mexicana*) mostraron un efecto superior hasta del 50% en comparación con el fungicida en dosis comercial alta (56 mg mL<sup>-1</sup>) dependiendo de la concentración del extracto. Este trabajo constituye el primer reporte sobre propiedades antifúngicas de agregados de polen de meliponinos. En particular, en el Soconusco, Chiapas, las abejas sin aguijón son una alternativa para la polinización de diversos cultivos de importancia económica, además de que la miel, los agregados de polen y propóleos son alternativas médicas para el tratamiento de úlceras diabéticas, así como en manejo en pre y postcosecha frutícola (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018, Grajales-Conesa *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONES

En las muestras de agregados de polen, los valores observados de cada propiedad fisicoquímica estudiada oscilaron como sigue: pH: 2.2 a 3.5, humedad: 2 a 31%, cenizas: 0.9 a 5.9%, acidez libre: 117 a 133 meq kg<sup>-1</sup>, fenoles: 1.4 a 2.6 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoides: 0.9 a 3.1 mg EQ g<sup>-1</sup>, glucosa: 0.01 a

used in fruit crops pre- and postharvest processes (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Albores-Flores *et al.*, 2018, Grajales-Conesa *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONS

In the pollen aggregates samples, the values of each of the physicochemical properties that were evaluated ranged as follows: pH: 2.2 to 3.5, humidity: 2 to 31 %, ashes: 0.9 a 5.9 %, free acidity: 117 to 133 meq kg<sup>-1</sup>, phenols: 1.4 to 2.6 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoids: 0.9 to 3.1 mg EQ g<sup>-1</sup>, glucose: 0.01 to 0.3 mg L<sup>-1</sup> and Trolox: 4.3 to 8.0 mg g<sup>-1</sup>. The highest values of pH, ashes, glucose and Trolox corresponded to *S. mexicana* and *T. angustula* species. The highest values of free acidity, phenols and flavonoids corresponded to *M. beecheii*.

The bioactive compounds of the pollen aggregates involved in the antifungal action were free acidity, phenols, and flavonoids. The inhibition values reached by *M. beecheii* were 38-66% higher in *C. gloeosporioides* than those of chlorothalonil.

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

0.3 mg L<sup>-1</sup> y Trolox: 4.3 a 8.0 mg g<sup>-1</sup>. Los mayores valores de pH, cenizas, glucosa y Trolox, correspondieron a las especies de *S. mexicana* y *T. angustula*. Las que presentaron valores mayores de acidez libre, fenoles y flavonoides fueron las de *M. beecheii*.

Los compuestos bioactivos de los agregados de polen involucrados en la acción antifúngica fueron acidez libre, fenoles y flavonoides. La especie *M. beecheii* alcanzó valores de 38 a 66 % más inhibición de *C. gloeosporioides* comparado con el clorotalonil.



## LITERATURA CITADA

- Albores-Flores V, Marín SIM, López-García JA, Sánchez GA y Grajales-Conesa J. 2018. Propiedad antifúngica de mieles sobre el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(3): 423–431. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1805-3>
- Ayala R, González VH and Engel MS. 2013. Mexican stingless bees (Hymenoptera:Apidae): diversity, distribution, and indigenous Knowledge. In: Vit P, Pedro SR and Roubik D (eds.). Honey-Pot: A legacy of stingless bees. New York: Springer. 366p. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7\\_9](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9)
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2003. Methods of analysis. Washington, D.C. AOAC. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1994521](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1994521)
- Basim E, Basim H and Özcan M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering 77(4): 992–996. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027>
- Beltrán CMC y García JDJ. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. Investigaciones Andinas 8(13): 73-80. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239017515006>
- Bertrams J, Müller M, Kunz N, Kammerer D and Stintzing FC. 2013. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. Journal of Applied Botany and Food Quality 86(1):143-153. <http://dx.doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.020>
- Bogdanov S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. Apiacta 38: 334–341. [http://www.researchgate.net/publication/229041189\\_Quality\\_and\\_standards\\_of\\_pollen\\_and\\_beeswax](http://www.researchgate.net/publication/229041189_Quality_and_standards_of_pollen_and_beeswax)
- Bogdanov S. 2002. Harmonized Methods of the International Honey Commission. International Honey Commission. [http://www.researchgate.net/publication/285841406\\_Harmonised\\_methods\\_of\\_the\\_International\\_Honey\\_Commission](http://www.researchgate.net/publication/285841406_Harmonised_methods_of_the_International_Honey_Commission)
- Borkraâ L and Sulaiman S. 2010. Rediscovering the antibiotics of the hive. Recent patents on anti-effective drug discovery 4(3):2006-2013. <http://dx.doi.org/10.2174/157489109789318505>
- Cabrera C and Montenegro G. 2013. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. Ciencia e Investigación Agraria 40(1): 223-230. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202013000100020>
- Carpes S, Begnini R, de Alencar S and Masson M. 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. Ciência e Agrotecnologia 31(6): 1818-1825. <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n6/a32v31n6.pdf>
- Chacini C, Blanco M, Sanchez S y Acevedo I. 2013. Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum* sp. agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. Innovación 1(1): 30-35. <https://doi.org/10.15649/2346075X.214>
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO and Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chemistry 196: 309–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dötterl S and Vereecken N. 2010. The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. Canadian Journal of Zoology 88(7): 668-697. <http://dx.doi.org/10.1139/Z10-031>
- Duran N, Muz M, Culha G, Duran G and Ozer B. 2011. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. Parasitology Research 108(1):95-105. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2039-z>
- Espinoza-Toledo C, Vázquez-Ovando A, Torres de los Santos R, López García A, Albores-Flores V and Grajales-Conesa J. 2018. Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. Revista de Biología Tropical 66(4): 1536-1546. <http://dx.doi.org/10.15517/RBT.V66I4.32181>
- Grajales-Conesa J, Ibarias TC, Ruíz TJ y Sánchez D. 2018. Miel de abejas sin aguijón en el tratamiento de úlceras de pie diabético. Salud Pública de México 60:102-104. <http://doi.org/10.21149/8604>
- Huerta G, Holguin F, Benítez C y Toledo J. 2009. Epidemiología de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz and Sacc) en mango (*Mangifera indica* L.) CV. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 93-105. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n2/v27n2a2.pdf>
- Kacaniova M, Vuković N, Chlebo R, Haščík P, Rovná K, Cubon J and Pasternakiewicz A. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. Archives of Biological Sciences 64(3): 927–934. <http://doi.org/10.2298/ABS1203927K>
- Komosinska VK, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L and Olczyk K. 2015. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/297425>
- Li Y, Skouroumounis GK, Elsey GM and Taylor DK. 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. Food Chemistry 129(2):570-6. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.068>
- Mărgăoan R, Mărgăhiș L, Dezmiorean D, Mihai CM and Bobiș O. 2010. Bee collected pollen – general aspects and chemical composition. Bull UASVM Animal Science and Biotechnologies 67(1-2): 254-259. <file:///C:/Users/RMF/Downloads/5305-19198-1-PB.pdf>
- Mărgăhiș LA, Stanciu OG, Dezmiorean DS, Bobiș O, Popescu O, Bogdanov S and Campos MG. 2009. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry 115(3): 878-83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014>
- Molan P and Betts N. 2004. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. Journal of Wound Care 13: 353-356. <https://doi.org/10.12968/jowc.2004.13.9.26708>
- Muñoz CW, Chavez RW, Pabón LC, Rendón FMR, Patricia CM y Otálvaro AAM. 2015. Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*) Revista CENIC Ciencias Químicas 46: 38–46. <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>



- Okwu DE and Nnamdi FU. 2008. Evaluation of the chemical composition of *Dacryodes edulis* and *Raphia hookei* Mann and wendl exudates used in herbal medicine in South Eastern Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 5(2): 194-200. <http://doi.org/10.4314/ajtcam.v5i2.31273>
- Overveld FWPC, Haenen GRMM, Rhemrev J, Vermeiden JPW and Bast A. 2000. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions* 127(2): 151 – 161. [http://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00179-4](http://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00179-4)
- Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X and Estevinho L. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflamatorio. *Food and Chemical Toxicology* 63: 633-639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>
- Paulino-Zunini M, Rojas C, De Paula S, Elingold I, Alvareda ME, Casanova MB, Iribarne RF, Aguilera MS and Dubin M. 2010. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society* 55(1):141-146. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072010000100033>
- Pellati F, Orlandini G, Pinetti D and Benvenuti S. 2011. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(5): 934-48. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.024>
- Pietarinen SP, Willfor SM, Vikstrom FA and Holmbom BR. 2006. Aspen knots, a rich source of flavonoids. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 26(3): 245 – 258. <http://doi.org/10.1080/02773810601023487>
- Rao PV, Krishnan KT, Salleh N and Gan SH. 2016. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 657-664. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Restrepo SDC, Narváez CCE and Restrepo SPL. 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez Santander, Colombia. *Química Nova* 32: 1517-1522. <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/30.pdf>
- Rodríguez-Maturino A R, Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, González-Mendoza D, Ruíz-Sánchez E, Zamora-Bustillos R, Cece na-Duran, C, Grimaldo-Juarez O, Avilez-Marin M. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de microbiología* 47(1): 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>
- Rojas YPM. 2015. Valoración *in vitro* del potencial antimicrobiano de extractos etanólicos de polen de *Apis mellifera* y de *Tetragonisca angustula*, en busca de posibles usos terapéuticos. Tesis magister. Universidad Nacional de Colombia 83 p. <http://bdigital.unal.edu.co/51696/1/yurleyapaolamonserraterojas.2015.pdf>
- Ruiz-Montañez G, Ragazo SJ, Calderón SM, Velázquez de la CG, Ramírez de LJ and Navarro OA. 2014. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 159: 267-272. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
- Saavedra CKI, Rojas IC y Delgado PGE. 2013. Características polínicas y composición química del polen apícola colectado de Cayaltí (Lambayeque-Perú). *Revista Chilena de Nutrición* 40: 71-78. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000100011>
- Schaich K, Tian X and Xie J. 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* 14: 111-25. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Soto GM y Rosales CM. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa / solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas, Ciencia y Tecnología* 18(4): 701 – 714. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Trinidad-Ángel E, Ascencio VFJ, Ulloa JA, Ramírez RJC, Ragazzo SJA, Calderon SM y Bautista RPU. 2017. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. Causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 19: 3953-3964. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8nspe19/2007-0934-remexca-8-spe19-3953-en.pdf>
- Vit P, Gutiérrez MG, Titera D, Bednar M y Rodríguez-Malaver AJ. 2008. Mielles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42(2): 237-244. <http://www.redalyc.org/pdf/535/53542209.pdf>
- Vit P. 2008 Review: valorization honey of stingless bees (Meliponini). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 50: 20-28.
- Vit P, Santiago B, Silva P, Ruíz J, Maza F, Peña M and Pérez E. 2016. Chemical and bioactive characterization of pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28(2): 78-84. <http://doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-245>
- Villanueva-Gutiérrez R, Roubik D and Porter-Bolland L. 2015. Bee-Plant interactions: Competition and phenology of flowers visited by bees. In: Islebe G, Calmé S, León-Cortés J, Schmook B. (eds). *Biodiversity and conservation of the Yucatán Peninsula*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8_6)
- Zainol M, Mohd K and Mohd Y. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC complementary and alternative Medicine* 13(129): 1-10. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-129>

# Gains in recurrent selection cycles for grain yield and resistance to head smut in maize

## Ganancia en ciclos de selección recurrente para rendimiento y resistencia a carbón de la espiga en maíz

<sup>1</sup>Gelasino Díaz-Ramírez, <sup>1</sup>Carlos De León-García de Alba\*, <sup>1</sup>Daniel Nieto-Ángel, <sup>2</sup>Ma. del Carmen Mendoza-Castillo, <sup>1</sup>Programa de Fitosanidad-Fitopatología, <sup>2</sup>Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, México. \*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Recibido: 06 de Agosto, 2020.

Aceptado: 20 de Noviembre, 2020.

Díaz-Ramírez G, De León-García de Alba C, Nieto-Ángel D and Mendoza-Castillo MC. 2021. Gains in recurrent selection cycles for grain yield and resistance to head smut in maize. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 61-74.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-1>

Primera publicación en línea: 14 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 14, 2020.

**Resumen.** El basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* infecta al cultivo de maíz y causa importantes pérdidas en regiones donde existen condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo se evaluó la respuesta a la selección de seis ciclos de selección recurrente de maíces de endospermo blanco y cinco ciclos de maíces de endospermo amarillo para caracteres agronómicos deseables, rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga. Los diferentes

**Abstract.** The basidiomycet *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* infects the maize plant causing important losses in regions with adequate conditions for disease development. In this work, the response to selection of six and five cycles of selection in a white and a yellow endosperm maize populations improved through S<sub>1</sub> recurrent selection for desirable agronomic characters, grain yield and resistance to head smut were evaluated. In a separate trial, same cycles were planted to measure progress in disease resistance and to evaluate a new method of inoculation were artificially inoculated. A randomized complete block design with three replications was used for the yield trials and two replications in the inoculated trial. Cycles evaluated in the two populations showed an increase in disease resistance of 0.94 y 1.2% cycle<sup>-1</sup>, and a genetic gain in grain yield of 272.9 y 620 kg ha<sup>-1</sup> cycle<sup>-1</sup> for the white and yellow endosperm populations, respectively. Results showed that recurrent S<sub>1</sub> selection was efficient in improvement

ciclos en las dos poblaciones se obtuvieron siguiendo el método de selección recurrente de familias  $S_1$ , los cuales fueron evaluados para determinar el avance genético. En un ensayo anexo, las poblaciones fueron inoculadas artificialmente para medir el progreso de la resistencia a la enfermedad y evaluar un nuevo método de inoculación. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones para el ensayo de rendimiento y dos repeticiones para el ensayo inoculado. Los ciclos evaluados en las dos poblaciones mostraron un incremento en la resistencia de 0.94 y 1.2% ciclo<sup>-1</sup>, una ganancia genética para rendimiento de grano de 272.9 y 620 kg ha<sup>-1</sup> ciclo<sup>-1</sup> para la población blanca y amarilla, respectivamente. Los resultados mostraron que la selección recurrente de familias  $S_1$  fue eficiente para mejorar el rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga en ambas poblaciones.

**Palabras claves:** Familias  $S_1$ , resistencia poligénica, resistencia genética, carbón de la espiga.

El maíz (*Zea mays*) es ampliamente cultivado en el mundo, superando en producción al trigo y al arroz (FAOSTAT, 2018), es el cereal con mayor demanda como producto alimenticio, para consumo humano y animal, así como materia prima para la industria (Eckhoff *et al.*, 2003; Kaul and Olakh, 2019); sin embargo, su producción se ve afectada por plagas y enfermedades. Una de las enfermedades fúngicas de importancia económica es el carbón de la espiga causado por el basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae), sin. *Sphacelotheca reiliana*, que se encuentra distribuido en varias regiones del mundo productoras del cereal (Stromberg, 1981; Lynch *et al.*, 1980; Martínez de la Parte *et al.*, 2016; Bernardo *et al.*, 1992; Fullerton *et al.*, 1974). En México,

of grain yield and resistance to head smut in both populations.

**Key words:**  $S_1$  families, polygenic resistance, genetic resistance, head smut.

Maize (*Zea mays*) is widely planted worldwide, surpassing wheat and rice in production (FAOSTAT, 2018). It is the cereal with the highest demand as a food product for both human and animal consumption, as well as for raw material in industries (Eckhoff *et al.*, 2003; Kaul and Olakh, 2019). However, its production is affected by pests and diseases. One of the diseases with great economic importance is head smut, caused by the basidiomycete *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae), sin. *Sphacelotheca reiliana*, which is distributed in several regions of the world where this cereal is grown (Stromberg, 1981; Lynch *et al.*, 1980; Martínez de la Parte *et al.*, 2016; Bernardo *et al.*, 1992; Fullerton *et al.*, 1974). In Mexico, there are reports of its presence in areas of the Bajío and the Highlands (Aquino *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011).

The inoculum is found in the soil and in the initial stages of infection the infective hypha penetrates the seedling through the root, invades the vascular bundles and grows systematically in the phloem (Kruger, 1962; Qi *et al.*, 2019). In the stage of vegetative growth, symptoms are difficult to observe, although some authors have reported development of chlorotic spots on the leaves (Matyac and Kommendhal, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Quezada-Salinas *et al.*, 2017), as well as stunting (Stromberg *et al.*, 1984; Halisky, 1963). In the reproductive stage of the plant, signs and symptoms become visible in both inflorescences, the flowers of which are replaced by a dusty carbonlike mass,

se tienen reportes de su presencia en zonas del Bajío y valles altos (Aquino *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011).

El inóculo se encuentra en el suelo y en las primeras etapas de infección, la hifa infectiva penetra por la raíz de la plántula e invade los haces vasculares y crece sistemáticamente a través del floema (Kruger, 1962; Qi *et al.*, 2019). En la etapa de crecimiento vegetativo, los síntomas son difíciles de observar; sin embargo, algunos autores han reportado manchas cloróticas en las hojas (Matyac y Kommendhal, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Quezada-Salinas *et al.*, 2017) y enanismo (Stromberg *et al.*, 1984; Halisky, 1963). En la etapa reproductiva de la planta los síntomas y signos se hacen visibles en ambas inflorescencias, cuyas flores son reemplazadas por una masa carbonosa pulverulenta compuesta por teliosporas o produciendo filodia en las estructuras afectadas, causando pérdidas de rendimiento (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2019). En México, el control de la enfermedad ha sido principalmente con productos químicos, prácticas culturales (CESAVEM, 2015) y por la evaluación de genotipos tolerantes mediante infección natural (Pérez-Camarillo y Bobadilla-Meléndez, 2003 y 2007; Pérez-Camarillo *et al.*, 2009; Aquino *et al.*, 2011). La mayoría de los programas de mejoramiento genético están enfocados a incrementar el rendimiento de grano y existen pocos reportes de programas diseñados para seleccionar resistencia a enfermedades en el cultivo de maíz.

Un esquema de mejoramiento genético eficiente para la generación de cultivares resistentes a plagas y enfermedades es la selección recurrente de familias  $S_1$ . Este método es reconocido ya que incrementa la frecuencia de alelos favorables de uno o más caracteres agronómicos que se heredan de manera cuantitativa y porque elimina 50% de los alelos indeseables después de cada autofecundación,

composed of teliospores or producing phyllodia in the affected structures, causing a reduction in yield (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2019). In Mexico, the disease has been controlled using mainly chemical products, cultural practices (CESAVEM, 2015) and with the selection of tolerant genotypes using natural infection (Pérez-Camarillo and Bobadilla-Meléndez, 2003 and 2007; Pérez-Camarillo *et al.*, 2009; Aquino *et al.*, 2011). Most genetic breeding programs focus on increasing grain yield and there are few reports of programs designed to select resistance to maize diseases.

An efficient genetic breeding scheme to generate pest and disease-resistant cultivars is the recurring selection of  $S_1$  families. This method is well-known for increasing the frequency of favorable alleles of one or more agronomic traits which are quantitatively inherited, and because it eliminates 50% of undesirable alleles after every self-pollination, helping to set traits of interest which are additively inherited (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010). This method is recommended for low-heritability traits, since it improves the population mean and maintains the genetic variability of the population, which helps continue the selection through breeding cycles. The following steps are taken to carry out a recurring  $S_1$  family selection scheme: 1)  $S_1$  families are generated by self-pollinating 400 healthy and vigorous plants from a widely based gene population, 2) The  $S_1$  families are evaluated in different environments, and 3) The best  $S_1$  families are recombined with superior traits of interest to the breeder (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010).

There is also the possibility that the evaluation and recombination of the  $S_1$  families are done in one cycle, reducing costs and time. However, it is important to consider if the trait of interest is expressed before flowering (Dhillon and Khehra,

permitiendo fijar caracteres de interés que se heredan de forma aditiva (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010). Este método es recomendado para caracteres de baja heredabilidad ya que mejora la media poblacional y mantiene la variabilidad genética de la población, lo que permite continuar la selección a través de los ciclos de mejoramiento. Para realizar un ciclo de selección recurrente de familias  $S_1$  se llevan a cabo los siguientes pasos: 1) Obtención de familias  $S_1$ , autofecundando 400 plantas sanas, vigorosas, de una población de amplia base genética, 2) Evaluación de las familias  $S_1$  en diferentes ambientes y 3) Recombinación de las mejores familias  $S_1$  con características superiores o de interés para el mejorador (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010).

También existe la posibilidad de que en un mismo ciclo se lleve a cabo la evaluación y recombinación de las familias  $S_1$ , reduciendo costo y tiempo; sin embargo, se debe considerar si el carácter de interés se expresa antes de la floración (Dhillon y Khehra, 1989). Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de éste trabajo fue evaluar seis ciclos de selección recurrente de maíz con endospermo blanco y cinco ciclos con endospermo amarillo para determinar su rendimiento de grano, resistencia al carbón de la espiga y caracteres agronómicos de interés incluyendo severidad en roya mediante infección natural, sincronía floral, relación altura de planta y mazorca y aspecto de planta, entre otros, así como evaluar un método de inoculación que facilite la adherencia de las teliosporas en la semilla y asegurar la distribución del inóculo en campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del área de estudio

La evaluación de la ganancia en los ciclos de selección se llevó a cabo en parcelas del Centro de

1989). With this information, the aim of this investigation was to evaluate six cycles of recurrent selection of maize with white endosperm and five cycles with yellow endosperm to determine their grain yield, resistance to head smut and agronomic traits of interest, including severity of common rust (*Puccinia sorghi*) by natural infection, floral synchrony, relationship between plant and ear height, plant aspect, and others, as well as to evaluate an inoculation method to facilitate the adherence of teliospores in the seed and ensure the uniform distribution of inoculum in the field.

## MATERIALS AND METHODS

### Description of the study area

The evaluation of gains in the cycles of selection was done in plots at the Cinta Larga Technological Innovation and Research Center, in Mixquiahuala, State of Hidalgo (20° 11' N, 99° 14' W, 2100 masl). The crop was sown on March 28, 2019 in the spring-summer planting cycle, under rainfed conditions. The field evaluation was carried out in the state of Hidalgo and the laboratory activities described were performed at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, State of Mexico.

### Maize germplasm evaluated

The genetic material evaluated in this study consisted of six breeding cycles ( $C_0$  to  $C_5$ ) of a population with white endosperm and five cycles ( $C_0$  to  $C_4$ ) of a population with yellow endosperm. The genetically broad based maize populations of white and yellow endosperm were developed including 45 and 55 collections of diverse germplasm, including commercial hybrids, improved varieties and native populations collected in the Mexican Highlands. The different components included



Innovación y Desarrollo Tecnológico de Cinta Larga, en Mixquiahuala, Estado de Hidalgo (20° 11' N, 99° 14' W, 2100 msnm). La siembra se realizó manualmente el 28 de marzo en el ciclo agrícola primavera-verano 2019, en condiciones de temporal. La evaluación agronómica de campo se realizó en el estado de Hidalgo y las actividades de laboratorios descritas en éste trabajo se hicieron en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México.

### Germoplasma de maíz evaluado

Los materiales genéticos evaluados en ésta investigación fueron seis ciclos de mejoramiento ( $C_0$  a  $C_5$ ) de una población con endospermo blanco y cinco ciclos ( $C_0$  a  $C_4$ ) de una población con endospermo amarillo. Las poblaciones base de endospermo blanco y amarillo incluyeron 45 y 55 colectas de diverso germoplasma, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y poblaciones nativas, colectadas en la región del altiplano de México. Los diferentes componentes que entraron en la formación de las poblaciones base se recombinaron en lotes aislados durante dos ciclos consecutivos, en el Ejido Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Edo. de México (19° 13' N, 100° 107' W, 1740 msnm), sembrando en un lote aislado dos surcos de 10 m de largo de cada uno de los componentes colectados que se usaron como hembras, alternando con un surco de macho que estuvo constituido por un compuesto balanceado de semillas de todos los materiales usados como hembra.

Después de dos ciclos de recombinación en aislamiento para su homogenización, se inició el método de selección recurrente intrapoblacional de familias  $S_1$  en ambas poblaciones. Cada ciclo se completó en dos años. Año uno: en cada una de las poblaciones de grano blanco o amarillo se autofecundaron 400 plantas para obtener las familias  $S_1$

in the formation of the base populations were recombined in isolated fields for two consecutive cycles in the Ejido Santa Teresa Tiloxtoc, in Valle de Bravo, State of Mexico (19° 13' N, 100° 107' W, 1740 masl), planting each component in two rows, each one 10 m long, which were used as females, alternating with one row as male which included a mechanical balanced composite of all the materials included as females.

After two cycles of recombination for their homogenization, the method for the intrapopulation selection of  $S_1$  families began in both populations. Each cycle was completed in two years. Year one: in each white or yellow grain population, 400 plants were self-pollinated to generate  $S_1$  families of each population. During the growing cycle and until harvest, plants with undesirable characters were eliminated. Year two: seeds from the best 60-70  $S_1$  selected families were inoculated with head smut (*S. reilianum*) teliospores, as described by Quezada-Salinas *et al.* (2013) and were planted ear-to-row in the field. Out of the total  $S_1$  families under evaluation, a selection pressure of 33% was applied and selected  $S_1$  families from each population were recombined. The best plants of each family selected, with desirable characters, healthy, with no symptoms of head smut and common rust (*P. sorghi*) were manually recombined with a pollen mixture. A balanced, mechanical mixture of seeds of the recombined families formed the next cycle ( $C_1$ ). This sequence was repeated to obtain the six cycles of the white endosperm population and the five of the yellow endosperm population evaluated in this study.

A completely randomized block design with three replications was used in the evaluation trials of the different cycles of selection, in 3m long rows, 80 cm between rows, 16 cm between plants and 44 plants per row to adjust to 22 and at a

de cada población. Durante el ciclo del cultivo y hasta la cosecha se eliminaron plantas con características indeseables. Año dos: semillas de las mejores 60-70 familias  $S_1$  se inocularon con teliosporas del carbón de la espiga (*S. reilianum*) de acuerdo a Quezada-Salinas *et al.* (2013) y se sembraron en campo donde cada surco constituyó una familia. Del total de familias  $S_1$  en evaluación se aplicó una presión de selección de 33%. Así, se seleccionaron y recombinaron las 60-70 mejores familias  $S_1$  de cada población. Las mejores plantas de cada familia seleccionada, con características deseables, sanas, libres de síntomas de carbón de la espiga y de roya (*Puccinia sorghi*) se recombinaron manualmente con mezcla de polen. Una mezcla mecánica balanceada de semilla de las 60-70 familias recombinadas formaron el siguiente ciclo ( $C_1$ ). Esta secuencia se repitió para obtener los seis ciclos de la población blanca y los cinco ciclos de la población amarilla, evaluados en este trabajo.

Para los ensayos de evaluación de los diferentes ciclos de selección se utilizó un diseño experimental bloques completos al azar, con tres repeticiones, en surcos de 3 m de largo y 80 cm de distancia entre surcos, 16 cm entre plantas y 44 plantas por surco, para ajustar a 22, y tener una densidad de 80 000 plantas  $ha^{-1}$ . Cada surco constituyó una parcela útil. La preparación del terreno y las labores de manejo del cultivo fueron realizadas por personal del Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico de Cinta Larga, estado de Hidalgo. Después de la siembra se dio un riego rodado y posteriormente uno o dos cada mes dependiendo de las lluvias. El control de maleza se realizó con cuatro aplicaciones del herbicida (sal de potasio del ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico y 6-Cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5, triazina-2,4 diamina). No hubo necesidad de aplicar fertilizante ni realizar control de plagas y enfermedades.

density of 80 000 plants  $ha^{-1}$ . Each row constituted a plot. Soil preparation and crop management were carried as done at the Cinta Larga Technological Innovation and Research Center, in Mixquiahuala, State of Hidalgo. Furrow irrigation was applied after planting, followed by once or twice monthly depending on rainfalls. Weed control done with four applications of herbicide (potassium salt of 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid and 6-Chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5, triazine-2,4 diamine). There was no fertilizer application or pest and disease control.

### **Trials of artificial inoculation in white and yellow endosperm maize populations**

To evaluate genetic gains by cycle of improvement of head smut resistance, two replications were included with seeds inoculated with *S. reilianum* teliospores were included. The inoculum was collected in September 2018 from infected maize plants from the previous planting at the Cinta Larga field, in Mixquiahuala, Hidalgo. The inoculum was collected from infected tassels and ears dried for seven days in a greenhouse, collecting the teliospores after cleaning with a 117  $\mu m$  sieve and storing them at  $20 \pm 2$  °C for their later use. Seeds from each cycle of both populations were treated using a suspension of  $1 \times 10^6$  teliospores  $mL^{-1}$ , immersed in white glue (Polyvinyl acetate = Resistol 85®) diluted to 20% with water (v/v) and drying them for 2 h at  $35 \pm 2$  °C. Smut incidence was evaluated in the six cycles of the white endosperm population and the five cycles of the yellow endosperm population. The purpose of this trial was to evaluate the incidence of head smut with artificial inoculation and to evaluate the efficiency of white glue used to stick the teliospores to the seeds. The same conditions, design and management were applied as in the yield trial.

## Ensayos con inoculación artificial en la población de maíz blanca y amarilla

Para evaluar las ganancias genéticas por ciclo de mejoramiento de resistencia al carbón de la espiga, se incluyeron dos repeticiones de las poblaciones con semilla inoculada con teliosporas de *S. reilianum*. El inóculo se colectó en septiembre de 2018, a partir de plantas infectadas de maíz del ciclo anterior en el campo de Cinta Larga, Municipio de Mixquiahuala, Hidalgo. Las plantas de donde se obtuvo el inóculo se secaron por siete días en invernadero, recuperando las teliosporas con un tamiz de 117  $\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $20 \pm 2$  °C para su uso posterior. Semillas de cada ciclo de ambas poblaciones se trataron con una suspensión de  $1 \times 10^6$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$  inmersas en pegamento blanco (Acetato de polivinilo= Resistol 85®) diluido a 20% con agua (v/v) secándolas por 2 h a  $35 \pm 2$  °C. La incidencia de carbón se evaluó en los seis ciclos de las poblaciones de endospermo blanco y los cinco ciclos de las de endospermo amarillo. El propósito de éste ensayo fue evaluar la incidencia del carbón de la espiga con inoculación artificial y evaluar la eficiencia del pegamento blanco usado como adherente de las teliosporas a las semillas. Se aplicaron las mismas condiciones, diseño y manejo que para el ensayo de rendimiento.

Para evaluar las diferencias y ganancias obtenidas entre los diferentes ciclos de mejoramiento, se determinaron las siguientes variables:

1) Días a floración masculina (antesis): Se determinó el número de días desde la fecha de siembra hasta que 50% de las plantas en la parcela iniciaron la emisión de polen. 2) Días a floración femenina (emisión de estigmas): se tomó el número de días desde la fecha de siembra hasta que 50% de las plantas mostraban exposición de estigmas. 3) Altura de

To evaluate the differences and gains obtained between the different cycles of selection, the following variables were determined:

1) Days to male flowering (anthesis): Registered as the number of days between the day of planting until 50% of plants began shedding pollen. 2) Days to female flowering (emission of silks): Recorded as the number of days between date of planting to 50% silking. 3) Plant height (cm): height between the basis of the stalk and the insertion of the tassel. 4) Ear height (cm) was measured from the base of the stalk to the basis of the main ear. 5) Grain moisture (%): determined by plot at harvest time, taking 500 g of seeds from the central part of five good ears. It was measured using a Dickey John miniGAC plus moisture tester. For the analysis, grain yield was adjusted to 15% moisture and transformed to  $\text{t ha}^{-1}$ . 6) Rust severity: Data were taken at flowering stage using an arbitrary scale of 1 to 5 where 1: No damage (foliar tissue 100% healthy), 2: few lesions (90% healthy), 3: regular (80% healthy), 4: bad (60 - 70% healthy) and 5: very bad (0 - 60% healthy). 7) Head smut incidence: The response to infection was determined a few days after the emission of both inflorescences. Incidence was determined as a percentage (Num. of diseased plants divided by the total number of diseased plants per plot x 100). The variables studied were determined following IBPGR (1991) and Edmeades *et al.* (2000).

### Statistical analysis

All data were analyzed using the software SAS (Statistical Analysis System, version 9.4) (SAS Institute Inc., 2013), using the procedure PROG GLM and PROG REG to obtain the linear regression. An analysis of variance was used along with a DMS comparison of means with  $\alpha \geq 0.05$ .

planta (cm): Se midió la altura desde la base del tallo hasta el nudo de inserción de la inflorescencia masculina. 4) La altura de la mazorca (cm) se midió desde la base del tallo hasta la base de la mazorca principal. 5) Humedad del grano: Se determinó por parcela, tomando 500 g de semillas de la parte central de cinco de las mejores mazorcas. La humedad de grano se determinó con el medidor de humedad Dickey John miniGAC plus. Para el análisis, el rendimiento de grano se ajustó a 15% de humedad y se convirtió a  $t\ ha^{-1}$ . 6) Severidad de la roya. Los datos se tomaron en la etapa de floración usando una escala arbitraria de 1 a 5 en donde 1: No daño (tejido foliar 100% sano), 2: pocas lesiones (90% sano), 3: regular (80% sano), 4: malo (60 - 70% sano) y 5: muy malo (0 - 60% sano). 7) Incidencia del carbón de la espiga. La respuesta a la infección se determinó unos días después de la emisión de ambas inflorescencias. La incidencia se determinó en porcentaje (No. de plantas enfermas entre el número total de plantas de cada parcela x 100). Las variables estudiadas se realizaron de acuerdo a IBPGR (1991) y Edmeades *et al.* (2000).

### Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron con el software estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.4) (SAS Institute Inc., 2013), usando el procedimiento PROG GLM y PROG REG para la obtención de la regresión lineal. Se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias DMS con  $\alpha \geq 0.05$ .

## RESULTADOS

### Ensayo de rendimiento en la población blanca y amarilla

Por problemas de baja germinación no se incluyó el ciclo dos ( $C_2$ ) de las dos poblaciones. El

## RESULTS

### Yield trial in white and yellow populations

Due to low germination problems, cycle two ( $C_2$ ) of the populations was not included. Table 1 shows the measurements for the different traits described. For the variables of plant and ear height and head smut incidence, there were no significant differences based on the DMS (0.05) in both populations. For the trait of days to male and female flowering, significant differences were observed between cycles of selection in both populations. For the yellow endosperm cycles, the variables of rust severity and grain yield showed significant differences but not in the white endosperm population. In the variables that did not present a statistically significant response, the advanced selection cycles express an improvement in comparison with the initial cycles. To better appreciate the behavior of the traits evaluated in the different cycles of both populations, data were analyzed by linear regression to get the average gain  $\text{cycle}^{-1}$  (Table 2). For the ear height, an increase of 3.5 and 4.3  $\text{cm cycle}^{-1}$  was observed, and for ear height there was also an increase of 1.7 and 2.2  $\text{cm cycle}^{-1}$  in the white and yellow endosperm populations, respectively. For days to tassel, a reduction of -1.51 and -1.6  $\text{day cycle}^{-1}$  was observed, and for days to silking -1.8 and -2.2  $\text{days cycle}^{-1}$  was recorded in both populations, indicating that, as the selection cycles in the populations advanced, populations tend to be earlier in flowering. A reduction of -0.2 and -0.6  $\text{cycle}^{-1}$  was found for common rust severity (Figure 1). For head smut incidence, a reduction of -0.9 %  $\text{cycle}^{-1}$  was found in the population of white endosperm and -1.2 %  $\text{cycle}^{-1}$  in the yellow endosperm population (Figure 1). For grain yield, there was an increase of 0.3 and 0.6  $t\ ha^{-1}\ \text{cycle}^{-1}$  for the white and yellow populations, respectively (Figure 1).

Cuadro 1 muestra las medias para los diferentes caracteres evaluados. Para las variables altura de planta y mazorca e incidencia del carbón de la espiga no hubo diferencias significativas con base en la prueba de medias DMS (0.05) en ambas poblaciones. Para los caracteres días a floración masculina y femenina se observaron diferencias significativas entre los ciclos de selección en las dos poblaciones. Para la población de endospermo amarillo las variables severidad en roya y rendimiento de grano mostraron diferencias significativas, no así, en la población de endospermo blanco. De las variables que no mostraron una respuesta estadísticamente significativa, los ciclos avanzados de selección expresan una mejora con respecto a los ciclos iniciales. Para una mejor apreciación del comportamiento de los caracteres evaluados de los diferentes ciclos en ambas poblaciones, los datos se sometieron a un análisis de regresión lineal para realizar el cálculo correspondiente de ganancia promedio por ciclo (Cuadro 2). Para el carácter altura de mazorca se observó un incremento de 3.5 y 4.3 cm ciclo<sup>-1</sup> y para altura de mazorca también hubo un

## DISCUSSION

The S1 recurrent selection was effective for most of the traits evaluated in the white and yellow endosperm populations, mainly for grain yield and resistance to head smut (*S. reilianum*). Similar results have been found in other investigations, where the breeding method was also the recurring selection of S<sub>1</sub> families. Rodríguez and Hallauer (1988) evaluated 10 populations using different selection models and concluded that the method of S<sub>1</sub> families was better than other methods evaluated. The response to the selection for grain yield was lower than that obtained by Ruiz de Galarreta and Álvarez (2007), but similar to those reported by Tanner and Smith (1987) and Maya-Lozano and Ramírez-Díaz (2002), who reported at least one negative response to the selection, similar as in this study where ear and plant heights showed no responses to selection.

There are also reports indicating that, depending on the size of the base population, the evaluation of the progeny and the recombination method used

**Cuadro 1. Medias para los diferentes caracteres evaluados en la población de maíz de endospermo blanco y amarillo.**  
**Table 1. Means of the different characters evaluated in the white and yellow endosperm maize populations.**

| Ciclos de selección | Días a floración masculina | Días a floración femenina | Población endospermo blanco   |                        |                         |                                    | Rendimiento t ha <sup>-1</sup> |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
|                     |                            |                           | Altura de planta (cm)         | Altura de mazorca (cm) | Severidad en roya (1-5) | Incidencia carbón de la espiga (%) |                                |
| C <sub>0</sub>      | 87.3 a                     | 91.0 a                    | 180.0 b                       | 113.3 a                | 2.8 a                   | 12.6 a                             | 11.2 a                         |
| C <sub>1</sub>      | 79.3 b                     | 82.6 b                    | 195 ab                        | 113.3 a                | 1.6 b                   | 10.7 a                             | 11.4 a                         |
| C <sub>3</sub>      | 77.0 b                     | 81.6 b                    | 190 b                         | 108.3 a                | 1.5 b                   | 10.2 a                             | 12.2 a                         |
| C <sub>4</sub>      | 79.6 b                     | 82.3 b                    | 196.6 ab                      | 116.6 a                | 1.5 b                   | 8.5 a                              | 11.6 a                         |
| C <sub>5</sub>      | 79.6 b                     | 83.3 b                    | 196.6 ab                      | 120.0 a                | 1.8 ab                  | 9.0 a                              | 12.4 a                         |
| DMS (0.05)          | 2.9                        | 2.6                       | 19.9                          | 23                     | 1                       | 16.6                               | 4.5                            |
|                     |                            |                           | Población endospermo amarillo |                        |                         |                                    |                                |
| C <sub>0</sub>      | 87.3 a                     | 91.3 a                    | 208.3 a                       | 121.6 b                | 3.6 a                   | 14.2 a                             | 12.5 b                         |
| C <sub>1</sub>      | 79.0 bc                    | 83.3 bc                   | 206.6 a                       | 121.6 b                | 2.0 b                   | 8.3 a                              | 12.3 b                         |
| C <sub>3</sub>      | 78.6 bc                    | 81.0 bc                   | 215.0 a                       | 138.3 a                | 1.5 b                   | 12.5 a                             | 12.2 b                         |
| C <sub>4</sub>      | 82.0 b                     | 84.6 b                    | 220.0 a                       | 123.3 b                | 1.6 b                   | 8.8 a                              | 14.6 a                         |
| DMS (0.05)          | 3.6                        | 4                         | 35                            | 13.4                   | 1                       | 28                                 | 2                              |



**Cuadro 2. Respuesta a la selección en las poblaciones de endospermo blanco y amarillo.**  
**Table 2. Response to selection in the white and yellow endosperm populations.**

| Carácter                          | Población endospermo blanco |                |                             | Población endospermo amarillo |       |                |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|-------|----------------|
|                                   | <sup>x</sup> b              | <sup>y</sup> I | <sup>z</sup> R <sup>2</sup> | b                             | I     | R <sup>2</sup> |
| Días a floración masculina        | -1.51                       | 85.0           | 0.4                         | -1.63                         | 85.8  | 0.30           |
| Días a floración femenina         | -1.8                        | 88.9           | 0.4                         | -2.24                         | 90.6  | 0.50           |
| Altura de planta (cm)             | 3.48                        | 181.2          | 0.61                        | 4.35                          | 201.6 | 0.82           |
| Altura de mazorca (cm)            | 1.67                        | 109.3          | 0.4                         | 2.18                          | 120.7 | 0.20           |
| Severidad roya (1-5)              | -0.21                       | 2.47           | 0.4                         | -0.65                         | 3.80  | 0.75           |
| Incidencia del carbón (%)         | -0.94                       | 13.02          | 0.86                        | -1.2                          | 13.95 | 0.30           |
| Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> ) | 0.2729                      | 10.9           | 0.63                        | 0.62                          | 11.35 | 0.5            |

<sup>x</sup>Coefficiente de regresión (b); <sup>y</sup>intercepto (I); <sup>z</sup> coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>). ♦ <sup>x</sup>Regression coefficient (b); <sup>y</sup>interception (I); <sup>z</sup>Determination coefficient (R<sup>2</sup>).

incremento de 1.7 y 2.2 cm ciclo<sup>-1</sup> en la población de endospermo blanco y amarillo, respectivamente. Para días a floración masculina se observó una disminución de -1.51 y -1.6 días ciclo<sup>-1</sup> y para floración femenina -1.8 y -2.2 días ciclo<sup>-1</sup> en las dos poblaciones, lo que indica que conforme se avanza en los ciclos de selección las poblaciones tienden a ser precoces. En severidad de roya se obtuvo una reducción de -0.2 y -0.6 ciclo<sup>-1</sup> (Figura 1). Para la variable incidencia del carbón de la espiga se encontró una disminución de -0.9% ciclo<sup>-1</sup> en la población de endospermo blanco y -1.2% ciclo<sup>-1</sup> en la de endospermo amarillo (Figura 1). Para el carácter rendimiento de grano hubo un incremento de 0.3 y 0.6 t ha<sup>-1</sup> por ciclo para la población blanca y amarilla, respectivamente (Figura 1).

## DISCUSIÓN

La selección S<sub>1</sub> recurrente fue efectiva para la mayoría de los caracteres evaluados en las poblaciones blanca y amarilla, principalmente para rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga (*S. reilianum*). Resultados similares se han encontrado en otros trabajos donde el método de mejoramiento también fue la selección recurrente

are variables that modify their response to selection (Hallauer *et al.*, 2010). Kebede (2001) suggests that to avoid genetic drift, 30 families should be used in case five or more selection cycles are desired. Weyhrich *et al.* (1998) mention that genetic drift is stronger when less than 10 families are used in the recombination. In this investigation 60-70 families were used per cycle, which ensures the maintenance of genetic variability.

Regarding resistance to head smut (*S. reilianum* f. sp. *zeae*), it is inherited additively and is partially dominant (Whyte and Gevers, 1988). In this research, there was a gain in resistance of 0.94% cycle<sup>-1</sup> in the white population and 1.2% cycle<sup>-1</sup> in the yellow population, indicating that, as the breeding cycles progress, genes are accumulated additively with each cycle. Resistance is given by the genes *zmWAK*, *zmNL* and *GRMZM2G047152*, which are expressed in the first stages of the infection process, where they inhibit the spread of the infective hypha of the fungus *S. reilianum* f. sp. *zeae* (Zuo *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONS

The S<sub>1</sub> families recurrent selection was effective to increase the grain yield in 272.9 kg ha cycle<sup>-1</sup>

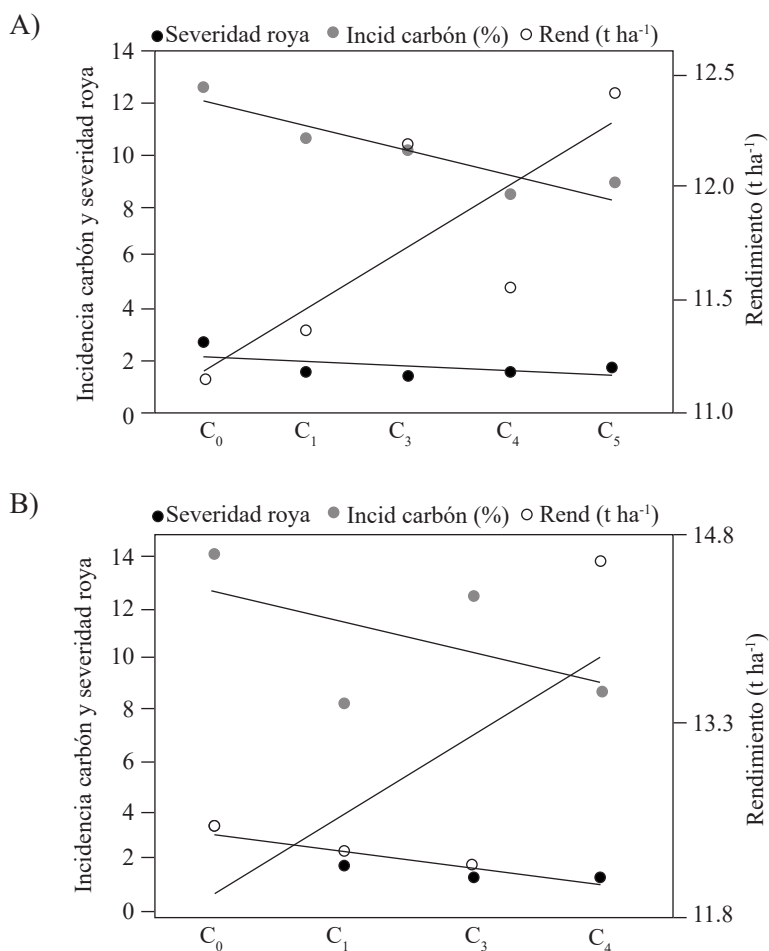


Figura 1. Regresión lineal para las variables severidad en roya, incidencia del carbón de la espiga y rendimiento de grano. Población de maíz de endospermo blanco (A) y población de maíz endospermo amarillo (B).

Figure 1. Linear regression for the variables of rust severity, head smut incidence and grain yield. Population of white endosperm maize (A) and population of yellow endosperm maize (B).

de familias S<sub>1</sub>. Rodríguez y Hallauer (1988) evaluaron 10 poblaciones usando diferentes métodos de selección, concluyeron que el método de familias S<sub>1</sub> fue mejor que los otros métodos evaluados. La respuesta a la selección para rendimiento de grano fue inferior a la obtenida por Ruiz de Galarreta y Álvarez (2007), pero similar a lo reportado por Tanner y Smith (1987) y Maya-Lozano y Ramírez-Díaz (2002), quienes reportan al menos una respuesta negativa a la selección similar a lo obtenido

and resistance to head smut in 0.94% cycle<sup>-1</sup> in the white endosperm population and 620 kg ha cycle<sup>-1</sup> and 1.2% cycle<sup>-1</sup> for resistance to head smut in the yellow endosperm population.

All other variables considered in the present research showed a positive response to selection, except for plant and ear heights in both populations, therefore, greater selection pressure must be applied on these traits to advance the populations to the following cycles.

en éste trabajo, donde altura de planta y mazorca no mostraron una respuesta a la selección.

También, existen reportes en los que se indica que dependiendo del tamaño de la población base, la evaluación de las progenies y el método de recombinación empleado son variables que modifican la respuesta a la selección (Hallauer *et al.*, 2010). Kebede (2001) sugiere que, para evitar la deriva genética, se deben usar 30 familias en caso de pretender llevar a cabo cinco, o más ciclos de selección. Weyhrich *et al.* (1998), mencionan que la deriva genética es más fuerte cuando se usan menos de 10 familias en la recombinación. En éste trabajo se seleccionaron 60-70 familias por ciclo, lo que asegura mantener la variabilidad genética.

Con respecto a la resistencia al carbón de la espiga (*S. reilianum* f. sp. *zetae*), esta se hereda de forma aditiva y es parcialmente dominante (Whyte y Gevers, 1988). En el presente trabajo se obtuvo un incremento en la resistencia de 0.94 % ciclo<sup>-1</sup> en la población blanca y 1.2 % ciclo<sup>-1</sup> en la población amarilla. Lo que indica que conforme se avanzan en los ciclos de mejoramiento se van acumulando genes de manera aditiva con cada ciclo obtenido. La resistencia está dada por los genes *zmWAK*, *zmNL* y *GRMZM2G047152* que se expresan en las primeras etapas del proceso de infección en donde inhiben la dispersión de la hifa infectiva del hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae* (Zuo *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

El método de selección recurrente de familias S<sub>1</sub> fue efectivo para incrementar el rendimiento de grano 272.9 kg ha ciclo<sup>-1</sup> y la resistencia al carbón de la espiga 0.94 % ciclo<sup>-1</sup> en la población de endospermo blanco y 620 kg ha ciclo<sup>-1</sup> y 1.2 % ciclo<sup>-1</sup> en la resistencia al carbón de la espiga para la población de endospermo amarillo.

Artificial seed inoculation using white glue 20% v/v as an adherent was efficient to produce a uniform infection in the field.

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

Todas las otras variables consideradas en la presente investigación mostraron una respuesta positiva a la selección, excepto para altura de planta y altura de mazorca en las dos poblaciones, por lo que el manejo de las poblaciones para obtener los siguientes ciclos se debe aplicar una mayor presión de selección hacia estos caracteres.

La inoculación artificial a la semilla usando pegamento blanco a 20 % v/v como adherente fue eficiente para inducir una infección uniforme en campo.

## LITERATURA CITADA

- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 39-49. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004)
- Bernardo R, Bourrier M and Oliver JL. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12(4): 303-306. <https://doi.org/10.1051/agro:19920403>
- CESAVEM (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México). 2015. Campaña manejo fitosanitario del maíz. 8p. <http://www.cesavem.mx/img/fitosanitariodelmaiz/maiz2.pdf>
- Dhillon BS and Khehra AS. 1989. Modified S<sub>1</sub> recurrent selection in maize improvement. *Crop Science* 29: 226-228. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010049x>
- Eckhoff SR, Paulsen MR and Yang SC. 2003. Maize. pp 3647-3653. *In: Caballero B, Finglas P and Toldra F. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd Edition. Academic Press. 6000p. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00725-2>
- Edmeades GO, Bolaños J, Elings A, Ribaut JM, Bänziger M and Westgate ME. 2000. The role and regulation of the anthesis silking interval in maize. *In: Westgate M, Boote K,*

- Knievel D and Kiniry J (eds.). Physiology and modeling kernel set in maize. Crop Science Society of America and the American Society of Agronomy 48: 65-80. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub29.c4>
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2018. Producción mundial de maíz. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fullerton RA, Scott DJ and Graham GJ. 1974. Effect of fungicides on the control of head smut of maize and the relationship between infection level and crop yield. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 2: 177-179. <https://doi.org/10.1080/03015521.1974.10425757>
- Hallauer AR, Carena MJ and Miranda JB. 2010. Quantitative Genetics in Maize Breeding, Handbook of Plant Breeding. New York: Springer Science and Business Media. 663p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0>
- Halisky PM. 1963. Head smut of sorghum, sudan grass, and corn, caused by *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. Journal of Agricultural Science 34(8): 287-304. <http://dx.doi.org/10.3733/hilg.v34n08p287>
- IBPGR. 1991. Descriptors for Maize. International Maize and Wheat Improvement Center, México City/International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 85p.
- Kaul J, Jain K and Olakh D. 2019. An overview on role of yellow maize in food, feed and nutrition security. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8(2): 3037-3048. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.802.356>
- Kebede PM. 2001. Response to  $S_1$  recurrent selection and estimation of genetic parameters in effective population sizes of the BS11 maize population. Retrospective theses and dissertations. 663p. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-14332>
- Kruger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies. South African Journal of Agricultural Science. 5: 43-56. [https://hdl.handle.net/10520/AJA05858860\\_650](https://hdl.handle.net/10520/AJA05858860_650)
- Lynch KV, Edgington LV and Busch LV. 1980. Head smut, a new disease of corn in Ontario. Canadian Journal Plant Pathology 2: 176-178. <https://doi.org/10.1080/070606680095014371B>
- Márquez SF. 1985. Genotecnía vegetal: Métodos, teoría, resultados. Tomo I. México D.F. AGT Editor, S. A. 357p.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. Phytopathology 75: 577-581. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n05\\_577.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n05_577.PDF)
- Martínez CA, Roux A, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f.sp. *zeae*: an overview using microscopy. Mycologia 94: 505-514. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2003.11833215>
- Martínez- de la Parte E, Wilson BD, Lorenzo ME, Guerrero BD, García RD, Rodríguez GG, Sierra RP y Gómez LY. 2016. El carbón de la espiga del maíz causado por *Sphacelotheca reiliana* (J.G. Kühn) GP. Clinton en Cuba. Fitosanidad 20(1): 3-38. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209157223005>
- Maya-Lozano JB y Ramírez-Díaz JL. 2002. Selección recurrente en tres poblaciones de maíz para el subtropico de México. Revista Fitotecnía Mexicana 25(2): 201-207. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-2/11a.pdf>
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2007. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2006. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 15. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 2 p.
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2003. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2002. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 6. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 4 p.
- Pérez-Camarillo JP, Martínez-Ruiz E y Bobadilla-Meléndez M. 2009. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2008. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 21. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 4 p.
- Quezada-Salinas A, De León-García De Alba C, Hernández-Anguiano AM y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología 31(2): 80-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>
- Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Solano-Báez AR. 2017. Resistencia genética a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas seleccionadas de maíz (*Zea mays* L.) con endospermo blanco y amarillo. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 534-548. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1705-2>
- Qi F, Zhang L, Dong X, Di H, Zhang J, Yao M, Dong L, Zeng X, Liu X, Wang Z and Zhou Y. 2019. Analysis of Cytology and Expression of Resistance Genes in Maize Infected with *Sporisorium reilianum*. Plant Disease 103(8): 2100-2107. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1687-RE>
- Ramírez Dávila JF, Sánchez Pale JR y De León C. 2011. Estabilidad espacio temporal de la distribución del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum*) en el Estado de México, México. Revista Mexicana de Fitopatología 29: 1-14. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a1.pdf>
- Rodríguez OA and Hallauer AR. 1988. Effects of recurrent selection in corn populations. Crop Science 28: 276-280. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800050015x>
- Ruiz de Galarreta JI and Álvarez RA. 2007. Six cycles of  $S_1$  recurrent selection in two Spanish maize synthetics. Spanish Journal Agriculture Research 5(2): 193-198. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2007052-239>
- SAS (Statistical Analysis System). 2013. The SAS system. Version 9.4. SAS OnlineDoc. HTML. Format, SAS Institute, Cary, NC, USA
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA, Windels CE and Gadelmann JL. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Disease 69: 880-884. <https://doi.org/10.1094/PD-68-880>
- Stromberg EL. 1981. Head smut of maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71: 906.
- Tanner AH and Smith OS. 1987. Comparison of half-sib and  $S_1$  recurrent selection in the Krug yellow dent maize populations. Crop Science 27: 509-513. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700030016x>

Weyhrich RA, Lamkey KR and Hallauer AR. 1998. Effective population size and response to S1 progeny selection in the BS11 maize population. *Crop science* 38(5): 1149-1158. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800050008x>

Whyte IV and Gevers HO. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 78: 65-68. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n01\\_65.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n01_65.PDF)

Zuo W, Chao Q, Zhang N, Ye J, Tan G, Li B, Xing Y, Zhang B, Liu H, Fengler K, Zhao J, Zhao X, Chen Y, Lai J, Yan J and Xu M. 2015. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. *Natural Genetic* 47: 151–57. <https://doi.org/10.1038/ng.3170>



# Morphological characterization of *Phytophthora capsici* isolates from Jalisco and Michoacán, Mexico

## Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de Jalisco y Michoacán, México

<sup>1</sup>Alfredo Reyes-Tena, <sup>1</sup>Gerardo Rodríguez-Alvarado, <sup>1</sup>Sylvia P. Fernández-Pavía\*, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), <sup>2</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5, carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán. C.P. 58880; **Martha E. Pedraza-Santos**, Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo General Lázaro Cárdenas y Berlín s/n, Viveros, Uruapan, Michoacán. C. P. 60170; **John Larsen**, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Colonia Ex Hacienda de San José de la Huerta, Morelia, Michoacán. C. P. 58190; <sup>2</sup>Gerardo Vázquez-Marrufo. \*Autor para correspondencia: fpavia@umich.mx.

Recibido: 27 de Julio, 2020.

Aceptado: 12 de Diciembre, 2020.

Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP, Pedraza-Santos ME, Larsen J and Vázquez-Marrufo G. 2021. Morphological characterization of *Phytophthora capsici* isolates from Jalisco and Michoacán, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 75-93.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-5>

Primera publicación en línea: 23 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 23, 2020.

**Resumen.** *Phytophthora capsici* es el principal fitopatógeno del cultivo de chile (*Capsicum annuum*) y de diversas plantas de interés comercial en México. El desconocimiento por parte de los productores sobre la presencia de este patógeno en zonas de cultivo dificulta la prevención y manejo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar morfológicamente

**Abstract.** *Phytophthora capsici* is the main phytopathogen of the chili pepper crop (*Capsicum annuum*) and diverse commercial plants in Mexico. The limited knowledge of farmers on the presence of this pathogen in cropping areas makes it difficult to prevent and manage the disease. In order to identify and morphologically characterize isolates obtained from cucurbits and solanaceous crops with “wilt” symptoms, in Jalisco and Michoacán, Mexico, samples were collected during 2016 and 2017. The 41 *P. capsici* isolates obtained from diseased plants were analyzed by comparative morphology based on sexual and asexual characteristics. Were characterized 33 isolates from the *C. annuum* crop, six from *C. pepo* and two *S. lycopersicum*. Most isolates showed typical characteristics of *P. capsici*, whereas only one isolate showed terminal, globose chlamydospores (isolated from Queréndaro, Mich.). Forty heterothallic isolates were registered and only one homothallic isolate was reported.

aislados obtenidos de cultivos de cucurbitáceas y solanáceas con síntomas de “marchitez” en Jalisco y Michoacán, México. Los muestreos se realizaron durante 2016 y 2017. Los 41 aislados de *P. capsici* obtenidos de plantas enfermas se analizaron por morfología comparativa con base a caracteres sexuales y asexuales. Se caracterizaron 33 aislamientos del cultivo de *C. annuum*, seis de *C. pepo* y dos de *S. lycopersicum*. La mayoría de los aislados presentaron características morfológicas típicas de *P. capsici*. Solo un aislado presentó clamidosporas, globosas y terminales (aislado de Queréndaro, Mich). Se registraron 40 aislados heterotálicos y un aislado homotálico. Se determinó la patogenicidad de siete aislados, asociando a *P. capsici* como el agente causal de la marchitez para estos aislados y para siete analizados en un estudio previo. Los 27 aislamientos restantes solo se asociaron a la enfermedad. Se sugiere realizar un manejo integrado de este patógeno en las zonas de producción de Jalisco y Michoacán.

**Palabras clave:** *Capsicum*, *Cucurbita*, aislamiento, marchitez del chile, diagnóstico.

La producción de solanáceas y cucurbitáceas en México es importante, destaca la producción de jitomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*) y calabacita zuchinni (*Cucurbita pepo*), se considera uno de los principales países exportadores de estos productos hortícolas con un valor de exportación conjunta de los tres cultivos estimada en más de 65 millones de pesos mexicanos (MXN) (SADER, 2020). Con respecto a la producción de chile verde, México es uno de los principales países productores, en 2019 se exportaron 3'239,244 toneladas de chiles y pimientos (SADER, 2020). Los estados productores más importantes son Chihuahua, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa

The pathogenicity of seven isolates was tested, therefore according to the results obtained, *P. capsici* is the main causal agent of wilt for these isolates and for seven more analyzed in a previous study, the remaining 27 are associated with the disease. Calling for the development of a strategy for integrated management of this pathogen in the Jalisco and Michoacán production areas.

**Key words.** *Capsicum*, *Cucurbita*, isolation, chili wilt, diagnosis.

Solanaceae and cucurbitaceae production in Mexico is important, where tomato (*Solanum lycopersicum*), chili pepper (*Capsicum annuum*) and zucchini squash (*Cucurbita pepo*) cropping stands out. Mexico is considered one of the major exporting countries of these horticultural products with a joint export value of the three crops estimated at more than MXN\$65 million (SADER, 2020). As for green chili pepper, Mexico is one of the largest producing countries. In 2019, Mexico exported 3,239,244 tons of chili and bell peppers (SADER, 2020). The most important producing states are Chihuahua, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa, and Zacatecas. In the states of Jalisco and Michoacán alone, the value of green chili pepper production in 2019 reached more than MXN\$3,144 million with a joint production area of 8,793.51 ha. In Michoacán, chili pepper production is concentrated in the municipalities of Queréndaro, Tanhuato, Vista Hermosa and Yurécuaro. However, the factor that limits this crop in most of these states is chili wilt, a disease caused by *P. capsici* (Castro-Rocha *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2010).

This phytopathogen is one of the most important species of the *Phytophthora* genus in the world, because it affects at least 50 species of cultivable

y Zacatecas. Tan solo en los estados de Jalisco y Michoacán, el valor de producción de chile verde en 2019 fue superior a 3,144 millones de pesos mexicanos, con un área de producción conjunta de 8,793.51 ha. En Michoacán la producción se concentra en los municipios de Queréndaro, Tanhuato, Vista Hermosa y Yurécuaro. Sin embargo, el factor limitante de este cultivo en la mayoría de los estados es la enfermedad “marchitez del chile” causada por *P. capsici* (Castro-Rocha *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2010).

Este fitopatógeno es una de las especies del género *Phytophthora* con mayor importancia a nivel mundial, debido a que afecta al menos 50 especies de plantas cultivables y causa importantes pérdidas de producción (Bautista-Calles *et al.*, 2010). Los hospedantes de interés comercial incluyen: chile (*C. annuum*), jitomate (*S. lycopersicum*), calabaza (*C. pepo*), sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Citrullus melo*) y pepino (*Cucumis sativus*) (Granke *et al.*, 2012; Quesada-Ocampo y Hausbeck, 2010; Tian y Babadoost, 2004). Actualmente se conocen 94 hospedantes de 27 familias botánicas y año con año se registran nuevos hospedantes (Reis *et al.*, 2018). *Phytophthora capsici* se considera uno de los patógenos de mayor interés científico debido a su tasa evolutiva, diversidad genética, rapidez de dispersión, adaptación hacia nuevos hospedantes y ambientes, y podría representar una amenaza para la seguridad alimentaria a nivel mundial (Kamoun *et al.*, 2015; Lamour *et al.*, 2012).

Por este motivo, en México se han desarrollado distintos estudios sobre la presencia, diversidad genética, control biológico y búsqueda de variedades resistentes contra de este patógeno (Castro-Rocha *et al.*, 2016; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010; Palma-Martínez *et al.*, 2017; Pons-Hernández *et al.*, 2020; Reyes-Tena *et al.*, 2017). Estos estudios se han realizado con aislados provenientes de zonas productoras de los

plants and causes significant production losses (Bautista-Calles *et al.*, 2010). Hosts of commercial interest include chili pepper (*C. annuum*), tomato (*S. lycopersicum*), pumpkin (*C. pepo*), watermelon (*Citrullus lanatus*), melon (*Citrullus melo*) and cucumber (*Cucumis sativus*) (Granke *et al.*, 2012; Quesada-Ocampo and Hausbeck, 2010; Tian and Babadoost, 2004). Currently, 94 hosts of 27 botanical families are known, and new hosts are recorded every year (Reis *et al.*, 2018). *Phytophthora capsici* is considered one of the pathogens of greatest scientific interest because of its rate of evolution, genetic diversity, rapid dispersion, adaptation to new hosts and environments, and because it could pose a threat to global food security (Kamoun *et al.*, 2015; Lamour *et al.*, 2012).

For this reason, in Mexico, different studies about the presence, genetic diversity and biological diversity of the pathogen have been conducted, as well as efforts to identify resistant varieties (Castro-Rocha *et al.*, 2016; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010; Palma-Martínez *et al.*, 2017; Pons-Hernández *et al.*, 2020; Reyes-Tena *et al.*, 2017). These studies have been conducted using isolates from producing areas of the states of Aguascalientes, Chihuahua, and Guanajuato, but there are no studies about the pathogen's presence or distribution nor their host range in economically important crops of the Solanaceae and Cucurbitaceae families in the major production areas of Jalisco and Michoacán. This information is needed to prevent the application of chemical products against other pathogens that cause wilt, such as *Fusarium* spp. or *Rhizoctonia* sp. (Anaya-López *et al.*, 2011; Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Velarde-Félix *et al.*, 2018). The objectives of this study were to identify and morphologically characterize the isolates obtained from cucurbitaceae and solanaceae crops causing “wilt” in Jalisco and Michoacán, Mexico.

estados de Aguascalientes, Chihuahua y Guanajuato y no existen estudios sobre la presencia o distribución del patógeno y su gama de hospedantes en cultivos de importancia económica de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae, en las principales zonas de producción de Jalisco y Michoacán. Esta información resulta necesaria para evitar que se apliquen productos químicos contra otros patógenos que pueden causar marchitez como *Fusarium* spp. o *Rhizoctonia* sp. (Anaya-López *et al.*, 2011; Rivera-Jiménez *et al.*, 2018; Velarde-Félix *et al.*, 2018). Los objetivos de este estudio consistieron en identificar y caracterizar morfológicamente los aislados obtenidos de cultivos de cucurbitáceas y solanáceas con síntomas de “marchitez”, en Jalisco y Michoacán, México.

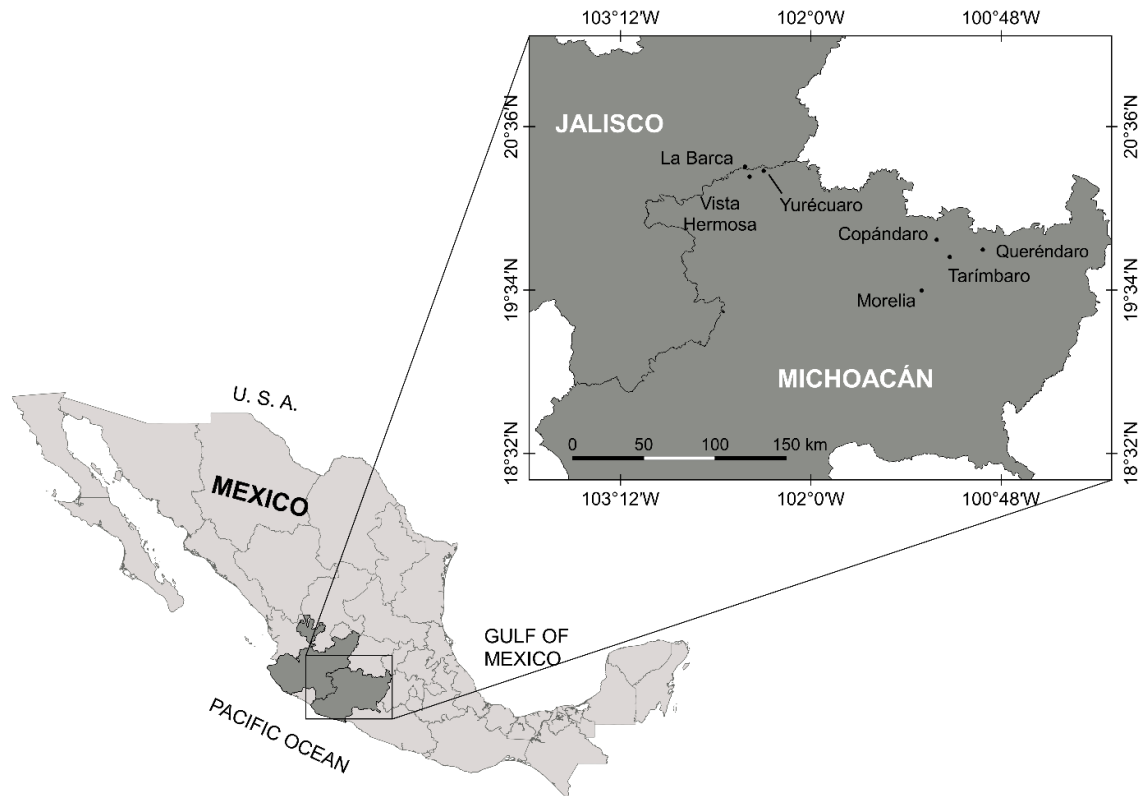
## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo de suelo y tejido vegetal enfermo.** Durante 2016 y 2017 se realizaron muestreos en los municipios de Copándaro, Morelia, Queréndaro, Tarímbaro, Vista Hermosa y Yurécuaro, Michoacán; y La Barca, Jalisco (Figura 1). Las muestras se obtuvieron de secciones de raíz, corona y tallo (10 a 20 cm de longitud) y de suelo en una parcela con antecedentes de cultivos previos de solanáceas y cucurbitáceas (Figura 2). En estos municipios, el cultivo de chile se realiza cada año, con excepción de Queréndaro donde se efectúan rotaciones de cultivos con gramíneas y otros cultivos por 3 a 5 años, y Morelia, donde se cultiva calabacita tipo zuchinni (*C. pepo*) principalmente. Las parcelas muestreadas presentaron suelos francos a franco-arenosos en Queréndaro, franco-arcillo-arenosos en Copándaro, Morelia y Tarímbaro y franco-arcillosos en Yurécuaro y La Barca. En las parcelas el riego fue por goteo. El tipo de chile que principalmente se cultiva en las regiones muestreadas es chile poblano y en menor proporción se cultivan los chiles tipo

## MATERIALS AND METHODS

**Soil and infected plant tissue sampling.** In 2016 and 2017, samples were collected at the municipalities of Copándaro, Morelia, Queréndaro, Tarímbaro, Vista Hermosa and Yurécuaro, Michoacán; and La Barca, Jalisco (Figure 1). The samples were taken from root, crown, and stem sections (10-20 cm long), and soil from a plot where solanaceae and cucurbitaceae had been previously cultivated (Figure 2). In these municipalities, chili pepper is cultivated every year, except in Queréndaro, where rotation with grains and other crops is practiced for 3-5 years, and Morelia, where zucchini-type squash (*C. pepo*) is mainly grown. The soils collected in Queréndaro plots were loam to loam-sandy; loam-clay-sandy in Copándaro, Morelia and Tarímbaro; and loam-clay in Yurécuaro and La Barca. Drip irrigation was applied to the plots. Poblano is the type of chili most cultivated in the areas where samples were collected, and, to a lesser degree, pasilla, serrano, jalapeño, and güero-type chilis. Zucchini squash samples were collected in the study sites of the Morelia municipality, and tomato samples (*S. lycopersicum*) in the municipality of Tarímbaro; the rest were samples from serrano-type chili pepper crops.

**Preliminary detection of *Phytophthora* using immunostrips.** The samples of infected plant tissue were serologically tested to rapidly detect *Phytophthora*, including *P. capsici*, using immunostrips (ImmunoStrip, Agdia®). According to the manufacturer's instructions, approximately 25 g of necrotic root tissue were taken and placed in a saline solution, gentle friction was applied and the immunostrip was inserted. The positive samples were processed to isolate the pathogen. When isolation was performed in a plot in Queréndaro, where the result had been negative, *Fusarium solani* was detected (Reyes-Tena *et al.*, 2019c).



**Figura 1.** Sitios de colecta de solanáceas y cucurbitáceas con síntomas de marchitez.  
**Figure 1.** Sites where solanaceae and cucurbitaceae showing wilt symptoms were collected.

pasilla, serrano, jalapeño y güero. Los sitios muestreados en el área del municipio de Morelia presentaron cultivos de calabaza zucchini; mientras que en el municipio de Tarímbaro se muestreó un cultivo de jitomate (*S. lycopersicum*), el resto fueron cultivos de chile tipo serrano.

**Detección preliminar de *Phytophthora* mediante inmuno-tiras.** Las muestras de tejido vegetal enfermo se sometieron a una prueba serológica para la detección rápida de *Phytophthora*, incluyendo *P. capsici*, mediante el empleo de inmuno-tiras (ImmunoStrip, Agdia®). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se tomaron aproximadamente 25 g de tejido radicular necrótico y se colocó en solución

**Isolation of *Phytophthora* from soil.** The soil samples were taken from the rhizosphere of *C. annuum* showing wilt symptoms in a plot located in Copándaro municipality. Each sample consisted of 100-150 g of soil collected at 10-15 cm depth; the samples were placed in a cooler and taken to the laboratory. To isolate *Phytophthora*, a bioassay using *Rhododendron* leaves as bait was established. For the bioassay, 10 g of soil and 20 mL of sterile distilled water were spread on Petri dishes 16 cm in diameter. The *Rhododendron* leaves were washed with soap and water, rinsed with sterile distilled water, and placed with the petiole submerged in the soil suspension in order to facilitate the pathogen's invasion (Erwin and





Figura 2. Cultivos de solanáceas y cucurbitáceas con síntomas de marchitez: a) calabacita tipo zuchinni en Morelia; b) chile serrano en Tarímbaro; c) chile pasilla en Queréndaro y d) chile poblano en Copándaro, Michoacán; e) chile poblano en La Barca, Jalisco; y f) chile poblano en Yurécuaro, Michoacán.

Figure 2. Solanaceae and cucurbitaceae crops showing wilt symptoms: a) zuchinni type-squash in Morelia; b) serrano chili in Tarímbaro; c) pasilla chili in Queréndaro; and d) poblano chili in Copándaro, Michoacán; e) poblano chili in La Barca, Jalisco; and f) poblano chili in Yurécuaro, Michoacán.

salina, se aplicó una fricción ligera y se insertó la inmuno-tira. Las muestras positivas se procesaron para aislar el patógeno. En una parcela de Queréndaro en la que se obtuvo un resultado negativo se procedió a realizar el aislamiento y se detectó a *Fusarium solani* (Reyes-Tena *et al.*, 2019c).

#### Aislamiento de *Phytophthora* a partir de suelo.

Las muestras de suelo se obtuvieron de la rizósfera de *C. annuum* con síntomas de marchitez, cultivadas en una parcela localizada en el municipio de Copándaro. Cada muestra consistió en 100 - 150 g de suelo tomado de 10 - 15 cm de profundidad; las muestras se colocaron en una hielera para su traslado al laboratorio. Para el aislamiento de *Phytophthora* se realizó un bioensayo empleando hojas de *Rhododendron* como tejido trampa. El bioensayo

Ribeiro, 1996). The boxes were sealed with plastic paraffin (Parafilm®) and stored at 24 °C for 36-48 h or until the petiole became necrotic. Later on, the petiole was transferred to a NARPH medium with natamycin (0.02 g L<sup>-1</sup>), ampicillin (0.27 g L<sup>-1</sup>), rifampicin (0.01 g L<sup>-1</sup>), pentachloronitrobenzene (0.10 g L<sup>-1</sup>) and hymexazol (0.075 g L<sup>-1</sup>) and stored at 24 °C (Soto-Plancarte *et al.*, 2017).

#### Isolation of *Phytophthora* using plant tissue.

To favor *Phytophthora* isolation, pieces of root and stem were cut in the pathogen's active growth zone, that is, pieces with the interface between necrosis and healthy tissue. The tissue pieces were disinfested with a 10% v/v solution of commercial chlorine (0.6% sodium hypochlorite active ingredient), rinsed with sterile distilled water,

consistió en colocar 10 g de suelo y 20 mL de agua destilada estéril en cajas Petri de 16 cm de diámetro. Las hojas de *Rhododendron* se lavaron con agua y jabón, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron con el pecíolo sumergido en la suspensión de suelo para facilitar la invasión del patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996). Las cajas se sellaron con parafina plástica Parafilm® y se colocaron a 24 °C durante 36-48 h o hasta la presencia de necrosis en el pecíolo. Posteriormente, el pecíolo se transfirió a medio NARPH con natamicina (0.02 g L<sup>-1</sup>), ampicilina (0.27 g L<sup>-1</sup>), rifampicina (0.01 g L<sup>-1</sup>), pentacloronitrobenzoceno (0.10 g L<sup>-1</sup>) e himexazol (0.075 g L<sup>-1</sup>) y se almacenó a 24 °C (Soto-Plancarte *et al.*, 2017).

**Aislamiento de *Phytophthora* a partir de tejido vegetal.** Para favorecer el aislamiento de *Phytophthora*, se cortaron trozos de raíz y tallo en la zona de crecimiento activo del patógeno, es decir, trozos con la interfase entre necrosis y tejido sano. Los trozos de tejido se desinfectaron en una solución de cloro comercial 10% v/v (0.6% ingrediente activo de hipoclorito de sodio). Posteriormente, se enjuagaron en agua destilada estéril y se colocaron en papel secante estéril de acuerdo al procedimiento descrito por Soto-Plancarte *et al.* (2017). Los trozos de tejido se sembraron en medio NARPH. Después de 48 a 72 h se observó el crecimiento de micelio. Los aislados obtenidos se transfirieron a medio agar-agua para su purificación mediante la técnica de punta de hifa, y posteriormente al medio agar-harina de maíz. Para determinar si los aislados presentaban bacterias contaminantes se colocó un disco de agar con micelio por 24 h a 24 °C en un tubo de ensaye con medio Luria Bertani estéril, si no se observó turbidez, el aislado se consideró libre de bacterias. En caso de observarse contaminación por bacterias, el cultivo se transfirió a medio agar-papa-dextrosa con ácido tartárico a 0.14% (Soto-

and placed on sterile blotting paper, according to the procedure described by Soto-Plancarte *et al.* (2017). The tissue pieces were placed in NARPH medium. Mycelial growth was observed 48-72 h later.

The obtained isolates were transferred to agar-water medium to be purified using the hyphal tip technique and then placed on an agar-corn meal medium. To determine if the isolates had contaminant bacteria, an agar disk containing mycelium was kept in a test tube with sterile Luria Bertani medium at 24 °C for 24 h; the isolate was considered free of bacteria when no turbidity was observed. When bacteria contamination was observed, the culture was transferred to agar-potato-dextrose medium with 0.14% tartaric acid (Soto-Plancarte *et al.*, 2017). Then, medium disks with 5-7 days-old mycelium were transferred to microtubes containing sterile distilled water and kept at 15 °C. The isolates were deposited in the oomycetes collection (Plant Pathology Collection) of the Plant Pathology Laboratory, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Comparative morphology of *Phytophthora capsici* isolates.** The obtained isolates were grown on Agar-V8 medium and stored at 24 °C for 5-7 days. When growth covered the culture medium plates, pieces of approximately 1x1cm were cut. To induce the formation of sporangia, 15-18 mL of sterile distilled water were added, and the water was changed every 24 h for three days. To the isolates that formed few sporangia, non-sterile soil extract was added, and then they were left at 24 °C for 24 h (Almaraz-Sánchez *et al.*, 2013). When the isolates sporulated, the asexual traits were described. The test to determine sporangia expiration was conducted as follows: a drop of water was deposited

Plancarte *et al.*, 2017). Posteriormente, se transfirieron discos de medio con micelio de 5-7 días de edad para su conservación en agua destilada estéril dentro de micro-tubos a 15 °C. Los aislados se depositaron en la colección de oomycetes (Colección Patología Vegetal) del Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Morfología comparativa de aislados de *Phytophthora capsici*.** Los aislados obtenidos se crecieron en medio Agar-V8 y se almacenaron a 24 °C durante 5-7 días. Cuando el crecimiento cubrió las placas de medio de cultivo, se cortaron en trozos de aproximadamente 1x1 cm. Para inducir la formación de esporangios se adicionaron de 15 a 18 mL de agua destilada estéril, el agua se cambió cada 24 h durante tres días. A los aislados que formaron pocos esporangios, se les adicionó extracto de suelo no estéril y se dejaron a 24 °C durante 24 h (Almaraz-Sánchez *et al.*, 2013). Cuando los aislados esporularon se realizó la descripción de los caracteres asexuales. La prueba de caducidad de los esporangios se realizó de la siguiente manera. Se colocó una gota de agua en un portaobjetos y se colocó un trozo de agar con micelio sobre la gota de agua agiténdolo ligeramente. Las observaciones bajo el microscopio óptico se realizaron a una ampliación de 40X para registrar la caducidad o persistencia del pedicelo en los esporangios. Se registró el tipo de esporangióforo, forma de los esporangios, longitud de la papila, longitud del pedicelo y presencia o ausencia de clamidosporas. Por otro lado, todos los aislados se sometieron a una prueba de crecimiento a 35 °C en medio Agar-V8 durante 48 h.

Para determinar el tipo de compatibilidad sexual, los aislados se cruzaron con dos aislados de tipo de compatibilidad conocido (A1 y A2) en medio agar-V8. Los cultivos se observaron 5-10 días

on a slide and then a piece of agar with mycelium was placed on the drop of water by slightly shaking it. Observations under an optical microscope were made at 40X amplification to record the pedicel caducity or persistence in sporangia. The data recorded were type of sporangiophore, form of sporangia, papilla and pedicel length, as well as the presence or absence of chlamydospores. On the other hand, all the isolates were growth tested on Agar-V8 medium at 35 °C for 48 h.

To determine the mating type, the isolates were crossed with two isolates of known mating type (A1 and A2) on Agar-V8 medium. The cultures were observed 5-10 days after inoculation to detect the formation of oospores. The type of oospore and antheridium was recorded. The results were compared to the interactive key described by Abad *et al.* (2019) for *Phytophthora* of the United States Department of Agriculture (USDA), which is available at <http://idtools.org/id/phytophthora/index.php>.

**Pathogenicity test.** The pathogenicity of seven isolates (CPV259, CPV260, CPV267, CPV271, CPV272, CPV277 and CPV279) was determined in a previous study (Reyes-Tena *et al.*, 2019a). In this study, a group of seven isolates (CPV282, CPV290, CPV291, CPV293, CPV296, CPV297 and CPV301) was additionally selected to conduct pathogenicity tests. These 14 isolates corresponded to different hosts, municipalities both of Michoacán and Jalisco, and the two mating types. The production of inoculum and chili pepper seedlings was carried out following the protocol described by Reyes-Tena *et al.*, (2019a). Planting and production of seedlings of the California Wonder susceptible variety was carried out in 100 cm<sup>3</sup> six-cell trays filled with Mix 3 (Sunshine<sup>®</sup>) as substrate. The plants were inoculated with the pathogen 56 days after planting. Six plants per isolate were inoculated



después de la inoculación para detectar la formación de oosporas. Se registró el tipo de oospora y el tipo de anteridio. Los resultados se compararon con la clave lúcida descrita por Abad *et al.* (2019) para *Phytophthora* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), la cual se encuentra disponible en <http://idtools.org/id/phytophthora/index.php>.

**Prueba de Patogenicidad.** La patogenicidad de siete aislados (CPV259, CPV260, CPV267, CPV271, CPV272, CPV277 y CPV279) se determinó en un estudio previo (Reyes-Tena *et al.*, 2019a). En el presente estudio se seleccionó adicionalmente un grupo de siete aislados para realizar pruebas de patogenicidad, estos fueron CPV282, CPV290, CPV291, CPV293, CPV296, CPV297 y CPV301. Estos 14 aislados correspondieron a diferentes hospedantes, municipios tanto de Michoacán como de Jalisco y los dos tipos de compatibilidad. Para la producción de inóculo y desarrollo de plántulas de chile se siguió el protocolo descrito por Reyes-Tena *et al.*, (2019a). La siembra y producción de plántulas de la variedad susceptible California Wonder se realizó en bandejas de seis celdas de 100 cm<sup>3</sup> con Mezcla 3 (Sunshine®) como sustrato. Después de 56 días de la siembra las plantas se inocularon con el patógeno. Se inocularon seis plantas por aislado, con 1 mL de una suspensión de  $1 \times 10^4$  zoosporas en la base del tallo de cada planta, utilizando una jeringa dosificadora de 50 mL (Ape®). Las plantas se mantuvieron saturadas con agua por 24 h para favorecer la infección. Se registró la aparición de síntomas y se reaisló al patógeno en medio selectivo NARPH.

## RESULTADOS

En total se obtuvieron 41 aislados de *Phytophthora* spp. de cultivos de cucurbitáceas y solanáceas que

with 1 mL of a suspension of  $1 \times 10^4$  zoospores mL<sup>-1</sup>, which was applied at the base of each plant's stem using a 50 mL dosing syringe (Ape®). The plants remained saturated with water for 24 h to favor infection. The appearance of symptoms was recorded, and the pathogen was re-isolated in NARPH selective medium.

## RESULTS

A total of 41 *Phytophthora* spp. isolates from cucurbitaceae and solanaceae crops with a range of 20-80% wilt incidence were obtained (Table 1). Seventy-six percent of the isolates were recovered from samples collected in the municipalities of Copándaro, Morelia, Queréndaro and Yurécuaro, Michoacán.

Table 2 shows the description of the different sexual and asexual traits that were observed. The isolates had sporangia arranged in simple sympodia sporangiophores. Forty isolates showed caducous and papillated sporangia, and long pedicel; only the CPV-269 isolate had semi-papillated sporangia with medium-sized pedicel. Regarding the form of sporangia, 10 isolates had irregular or distorted form (Figure 3c). Overall, ellipsoid, ovoid and globose forms prevailed. The presence of globose and terminal chlamydospores (Figure 3d) was detected on the CPV-279 isolate. Eighty-eight percent of the isolates grew at 35 °C, except CPV-280, CPV-285, CPV-294, CPV-295 and CPV-296. All the isolates had plerotic oospores with amphigynous antheridia (Figure 3d). Forty isolates were heterothallic, and one was homothallic. In regard to the mating type, 21 isolates were of A1 type, and 19 of A2 type. Both were recovered from chili pepper plots at the municipalities of Copándaro, Queréndaro, Tarímbaro and Yurécuaro, Michoacán; and La Barca, Jalisco. A ratio of mating types close to 1:1 was found in the municipalities of Copándaro, La

presentaron un rango de incidencia de la enfermedad marchitez de 20-80% (Cuadro 1). El 76% de los aislados fueron recuperados de muestras provenientes de los municipios de Copándaro, Morelia, Queréndaro y Yurécuaro, Michoacán

En el Cuadro 2 se presenta la descripción de los diferentes caracteres sexuales y asexuales observados. Los aislados mostraron esporangios dispuestos en esporangióforos simples simpódicos. Cuarenta aislados presentaron esporangios caducos, papilados y con pedicelo largo, solo el aislado CPV-269 mostró esporangios semipapilados con pedicelo mediano. Con respecto a la forma de los esporangios, 10 aislados mostraron formas irregulares o distorsionadas (Figura 3c). En general, predominaron las formas elipsoide, ovoide y globosa. La presencia de clamidosporas globosas y terminales (Figura 3e) se detectó en el aislado CPV-279. El 88% de los aislados crecieron a 35 °C, excepto los aislados CPV-280, CPV-285, CPV-294, CPV-295 y CPV-296. Todos los aislados presentaron oosporas pleróticas con anteridio anfigino (Figura 3d). Cuarenta aislados fueron heterotálicos y un aislado fue homotálico. En el tipo de compatibilidad, 21 aislados fueron tipo A1 y 19 fueron tipo A2. Ambos se recuperaron en parcelas de cultivos de chile en los municipios de Copándaro, Queréndaro, Tarímbaro y Yurécuaro, Michoacán y en La Barca, Jalisco. Una proporción de tipos de compatibilidad sexual cercana a 1:1 se encontró en los municipios de Copándaro, La Barca, Tarímbaro y Yurécuaro. En Morelia se obtuvieron aislados del tipo A2.

Con lo que respecta a la prueba de patogenicidad, se observaron síntomas de marchitez a partir del tercer día en la variedad California Wonder con los siete aislados inoculados, y en todos los casos se reaisló a *P. capsici*, comprobando la patogenicidad de los aislados.

Barca, Tarímbaro and Yurécuaro. In Morelia, type A2 isolates were obtained.

In regard to the pathogenicity test, wilt symptoms were observed on the California Wonder variety at day three with the seven isolates that were inoculated; in all the cases, *P. capsici* was re-isolated to confirm the isolates pathogenicity.

## DISCUSSION

*P. capsici* was identified as the causal agent in a total of 14 isolates (seven correspond to a pathogenicity test conducted in a previous study (Reyes-Tena *et al.*, 2019a) and 27 are associated to wilt disease in cucurbitaceae and solanaceae crops in the Jalisco and Michoacán municipalities where samples were collected. The morphological identification was in agreement with the molecular identification in a sample of isolates (Reyes-Tena *et al.*, 2019a; Reyes-Tena *et al.*, 2019b). The isolates of this pathogen had the two mating types (A1 and A2) in a ratio close to 1:1 in four municipalities: Copándaro, La Barca, Tarímbaro and Yurécuaro. This result suggests that sexual reproduction could occur (Castro-Rocha *et al.*, 2016). A similar result regarding the ratio of both mating types was reported in *P. capsici* populations recovered from crops in Aguascalientes, Chihuahua, Mexico City, State of Mexico, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, and Zacatecas (Castro-Rocha *et al.*, 2016; Fernández-Pavía *et al.*, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Silva-Rojas *et al.*, 2009). A ratio of mating types close to 1:1 was also found in populations from China, the United States and South Africa (Bi *et al.*, 2014; Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Gevens *et al.*, 2007; Meitz *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2012). The presence of a single mating type (A2) in Morelia is comparable



**Cuadro 1. Aislados de *Phytophthora* obtenidos de solanáceas y cucurbitáceas con síntomas de marchitez provenientes de municipios de Michoacán y Jalisco.**  
**Table 1. *Phytophthora* isolates from solanaceae and cucurbitaceae showing wilt symptoms collected in Michoacán and Jalisco municipalities.**

| Aislado              | Fuente | Hospedante                  | Municipio            | Año de colecta |
|----------------------|--------|-----------------------------|----------------------|----------------|
| CPV-259 <sup>z</sup> | Suelo  | <i>Capsicum annuum</i>      | Copándaro Mich.      | 2016           |
| CPV-260              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2016           |
| CPV-261              | Suelo  | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2016           |
| CPV-262              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-263              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-264              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2016           |
| CPV-265              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-266              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2016           |
| CPV-267              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-268              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-269              | Tejido | <i>C. pepo</i>              | Morelia, Mich.       | 2016           |
| CPV-270              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Tarímbaro, Mich.     | 2016           |
| CPV-271              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Tarímbaro, Mich.     | 2016           |
| CPV-272              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Tarímbaro, Mich.     | 2016           |
| CPV-273              | Tejido | <i>Solanum lycopersicum</i> | Tarímbaro, Mich.     | 2016           |
| CPV-274              | Tejido | <i>S. lycopersicum</i>      | Tarímbaro, Mich.     | 2016           |
| CPV-277              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Queréndaro, Mich.    | 2017           |
| CPV-278              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Queréndaro, Mich.    | 2017           |
| CPV-279              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Queréndaro, Mich.    | 2017           |
| CPV-280              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Queréndaro, Mich.    | 2017           |
| CPV-281              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Queréndaro, Mich.    | 2017           |
| CPV-282              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2017           |
| CPV-283              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-284              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-285              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-286              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | La Barca, Jal.       | 2017           |
| CPV-287              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2017           |
| CPV-288              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2017           |
| CPV-289              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-290              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | La Barca, Jal.       | 2017           |
| CPV-291              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-292              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | La Barca, Jal.       | 2017           |
| CPV-293              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-294              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2017           |
| CPV-295              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-296              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Copándaro Mich.      | 2017           |
| CPV-297              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Vista Hermosa, Mich. | 2017           |
| CPV-298              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-299              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-300              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |
| CPV-301              | Tejido | <i>C. annuum</i>            | Yurécuaro, Mich.     | 2017           |

<sup>z</sup> Código de la Colección de oomycetes del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF-UMSNH. / <sup>z</sup> Code of the oomycetes collection of the Plant Pathology Laboratory, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana of San Nicolás de Hidalgo.

**Cuadro 2. Morfología comparativa de aislados de *Phytophthora capsici* obtenidos de solanáceas y cucurbitáceas con síntomas de marchitez provenientes de municipios de Michoacán y Jalisco.**

**Table 2. Comparative morphology of *Phytophthora capsici* isolates obtained from solanaceae and cucurbitaceae showing wilt symptoms collected in Michoacán and Jalisco municipalities.**

| Aislado | Esporangiofóro   | Esporangios   | Presencia de clamidosporas | Papila  | Pedicelo                           | Oospora   | Anteridio | Compatibilidad sexual | Crec. a 35 °C |
|---------|------------------|---|----------------------------|---|------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|---------------|
| CPV-259 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos.            | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.8 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 45.6 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-260 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.                   | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 38.7 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-261 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 40.6 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-262 | Simple simpódico | Formas irregulares, globosos, bipapilados. Caducos.           | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.9 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 43.2 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-263 | Simple simpódico | Globosos, formas irregulares, elipsoides. Caducos.            | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.1 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 37.1 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-264 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 38.9 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-265 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.8 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 42.3 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-266 | Simple simpódico | Globosos y ovoides. Caducos.                                  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.0 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 32.4 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-267 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 36.2 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-268 | Simple simpódico | Elipsoides y globosos. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.0 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 46.2 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-269 | Simple simpódico | Elipsoides y globosos. Caducos.                               | -                          | Esporangios semipapilados ( $\bar{x}$ 3.2 $\mu$ m). | Mediano ( $\bar{x}$ 18.6 $\mu$ m). | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-270 | Simple simpódico | Elipsoides, ovoides. Caducos.                                 | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 38.6 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-271 | Simple simpódico | Ovoides, globosos, formas irregulares, bipapilados. Caducos.  | -                          | Esporangios papilados ( $<\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).    | Largo ( $\bar{x}$ 43.8 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-272 | Simple simpódico | Ovoides, elipsoides, bipapilados. Caducos.                    | -                          | Esporangios papilados ( $<\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).    | Largo ( $\bar{x}$ 45.6 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |
| CPV-273 | Simple simpódico | Elipsoides, ovoides. Caducos.                                 | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.38 $\mu$ m).    | Largo ( $\bar{x}$ 51.9 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-274 | Simple simpódico | Ovoides, elipsoides, bipapilados, formas irregulares. Caducos | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.85 $\mu$ m).    | Largo ( $\bar{x}$ 45.7 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-275 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, limoniformes. Caducos.                  | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.5 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 41.9 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-277 | Simple simpódico | Ovoides, formas irregulares, bipapilados. Caducos.            | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 62.0 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-278 | Simple simpódico | Ovoides, bipapilados. Caducos.                                | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 47.5 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A1                    | +             |
| CPV-279 | Simple simpódico | Elipsoides y ovoides. Caducos.                                | +                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.1 $\mu$ m).     | Largo ( $\bar{x}$ 56.4 $\mu$ m).   | Plerótica | Anfigino  | A2                    | +             |

Cuadro 2. Continúa

**Cuadro 2. Continuación.**  
**Table 2. Continuation.**

| Aislado | Esporangioforo   | Esporangios  | Presencia de clamidosporas | Papila   | Pedicelo                         | Oospora   | Anteridio | Compatibilidad sexual | Crec. a 35 °C |
|---------|------------------|--|----------------------------|--|----------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|---------------|
| CPV-280 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.        | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.8 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 36.8 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | -             |
| CPV-281 | Simple simpódico | Globosos, obpiriformes, ovoides. Caducos.          | -                          | Esporangios semipapilados ( $\bar{x}$ 2.83 $\mu$ m). | Largo ( $\bar{x}$ 57.5 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-282 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.1 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 65.0 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-283 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos. Caducos.                     | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.6 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 38.8 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-284 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.        | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.7 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 42.8 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-285 | Simple simpódico | Elipsoides, ovoides. Caducos.                      | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 53.3 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | -             |
| CPV-286 | Simple simpódico | Elipsoides, ovoides. Caducos.                      | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.1 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 30.7 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | Homotálico            | +             |
| CPV-287 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, bipapilados. Caducos.        | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 65.0 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-288 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.7 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 58.5 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-289 | Simple simpódico | Elipsoides y globosos. Caducos.                    | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 74.8 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-290 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos. | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.4 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 34.5 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-291 | Simple simpódico | Ovoides, elipsoides. Caducos.                      | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 52.3 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-292 | Simple simpódico | Ovoides, elipsoides. Caducos.                      | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 62.7 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-293 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.8 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 41.4 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-294 | Simple simpódico | Globosos, elipsoides, formas irregulares. Caducos. | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 41.5 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | -             |
| CPV-295 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos. Caducos.                     | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 29.8 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | -             |
| CPV-296 | Simple simpódico | Elipsoides, globosos, formas irregulares. Caducos. | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.7 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 37.3 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | -             |
| CPV-297 | Simple simpódico | Elipsoides, formas irregulares. Caducos.           | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 48.4 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-298 | Simple simpódico | Globosos, ovoides, elipsoides. Caducos.            | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 43.2 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-299 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.3 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 31.3 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A1                    | +             |
| CPV-300 | Simple simpódico | Ovoides, elipsoides. Caducos.                      | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 4.2 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 41.1 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |
| CPV-301 | Simple simpódico | Elipsoides. Caducos.                               | -                          | Esporangios papilados ( $\bar{x}$ 3.9 $\mu$ m).      | Largo ( $\bar{x}$ 33.5 $\mu$ m). | Plerótica | Anfíginos | A2                    | +             |

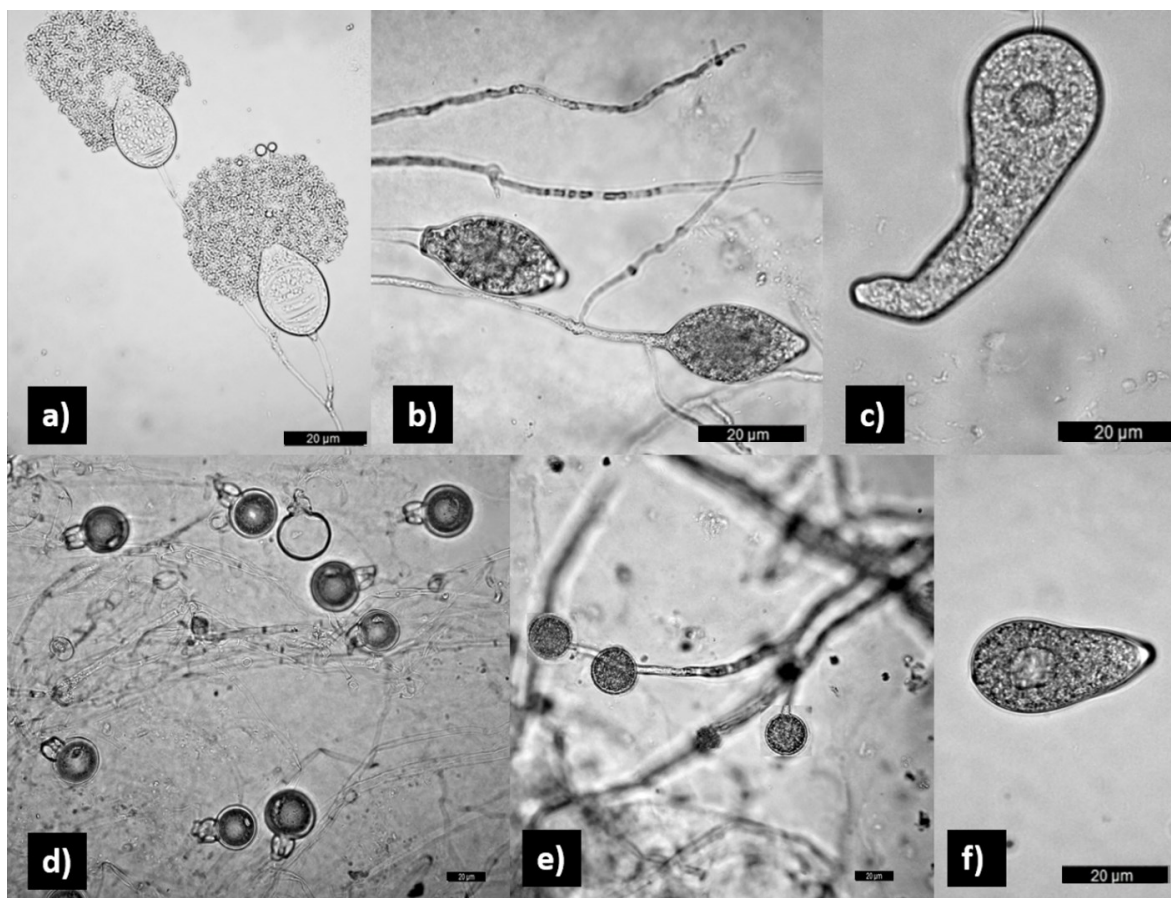


Figura 3. Estructuras sexuales y asexuales de *Phytophthora capsici*: a) esporangióforo simple simpódico, b) esporangios elipsoides papilados, c) esporangio con formas irregulares, d) oosporas pleróticas con anteridio anfigino, e) clamidosporas globosas, terminales, y f) esporangio caduco.

Figure 3. *Phytophthora capsici* sexual and asexual structures: a) simple sympodia sporangiophore; b) papillated and ellipsoid sporangia; c) sporangia with irregular forms; d) plerotic oospores with amphigynous antheridium; e) globose and terminal chlamydospores; and f) expired caducous sporangium.

## DISCUSIÓN

Se identificó a *P. capsici* como agente causal en un total de 14 aislados (siete corresponden a una prueba de patogenicidad de un estudio previo, Reyes-Tena *et al.*, 2019a) y 27 asociados a la enfermedad marchitez, en cultivos de cucurbitáceas y solanáceas en los municipios muestreados de Jalisco y Michoacán. La identificación morfológica, coincidió con la identificación molecular que se realizó en una muestra de aislados (Reyes-Tena *et al.*,

to that reported by Pérez-Moreno *et al.* (2003) with isolates obtained in Salvatierra, Guanajuato, where only A2 was found, as well as to studies using populations from Argentina, Spain, and Peru, where clonal populations were detected (Gobena *et al.*, 2012; Hurtado-González *et al.*, 2008; Silvar *et al.*, 2006). This suggests that the presence of the pathogen is recent and that no isolates with both mating types have been introduced. Eighty-eight percent of the isolates grew at 35 °C, a result that was similar to that obtained by Pons-Hernández



2019a; Reyes-Tena *et al.*, 2019b). Los aislados de este patógeno presentan los dos tipos de compatibilidad sexual (A1 y A2) en una proporción cercana a 1:1, en cuatro municipios, Copándaro, La Barca, Tarímbaro y Yurécuaro. Lo que sugiere que podría estar ocurriendo reproducción sexual (Castro-Rocha *et al.*, 2016). Un resultado similar en la proporción de ambos tipos de compatibilidad se reportó en poblaciones de *P. capsici* recuperadas en cultivos provenientes de Aguascalientes, Chihuahua, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Querétaro y Zacatecas (Castro-Rocha *et al.*, 2016; Fernández-Pavía *et al.*, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Silva-Rojas *et al.*, 2009). La proporción de compatibilidad sexual cercana a 1:1 también se encontró en poblaciones de China, Estados Unidos de América y Sudáfrica (Bi *et al.*, 2014; Fernández-Pavía *et al.*, 2004; Gevens *et al.*, 2007; Meitz *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2012). La presencia de un solo tipo de compatibilidad (A2) en Morelia es comparable con lo reportado por Pérez-Moreno *et al.* (2003) con aislados obtenidos en Salvatierra, Guanajuato donde se encontró solo A2; y con estudios en poblaciones de Argentina, España y Perú, donde se detectaron poblaciones clonales (Gobena *et al.*, 2012; Hurtado-González *et al.*, 2008; Silvar *et al.*, 2006). Esto podría sugerir que la presencia del patógeno es reciente y no se han introducido aislados de ambos tipos de compatibilidad. El 88% de los aislados crecieron a 35 °C lo cual fue similar a lo observado por Pons-Hernández *et al.*, 2020, quienes reportan un 96% para aislados de Guanajuato.

La ocurrencia de reproducción sexual en poblaciones de *P. capsici* en cultivos de cucurbitáceas y solanáceas en Jalisco y Michoacán, podría favorecer la supervivencia y el surgimiento de mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones de este patógeno en esta región del país, lo que podría dificultar los programas de manejo (Babadoost y

*et al.*, 2020, who reported 96% for isolates from Guanajuato.

The sexual reproduction observed on *P. capsici* populations in cucurbitaceae and solanaceae crops in Jalisco and Michoacán could favor the survival and emergence of greater genetic variability within the pathogen's populations in this Mexican region and thus hinder the management programs efforts (Babadoost and Pavon, 2013; Lamour and Hausbeck, 2000). Although there is information about a high level of genetic diversity in populations from central Mexico (Castro-Rocha *et al.*, 2016), it is necessary to consider additional genetic factors that could cause variability, since the high level of *P. capsici* polymorphism could be mediated by other processes that produce variability, such as mutations, genetic recombination, epigenetic processes, and horizontal gene and chromosome transfer (Raffaele and Kamoun, 2012). Another unfavorable factor in wilt management is the practice of susceptible crops rotation, such as *C. pepo* and *S. lycopersicum*. Crop rotation with non-susceptible hosts in 3-5-year periods is preferred in order to reduce the levels of the pathogen's inoculum (Barchenger *et al.*, 2018).

The form of sporangia observed on this study agrees with the description for *P. capsici*, which develop varied forms, ranging from ovoid, ovo-ovoid, sub-globose, globose, ellipsoid, fusiform, piriform, to irregular forms, as well as the frequent presence of bi-papillated sporangia (Li *et al.*, 2007; Soto-Plancarte *et al.*, 2017). The *C. pepo* isolates had sporangia with irregular or distorted forms, a fact that reflects the phenotypic plasticity of this species (Iribarren *et al.*, 2015). On the other hand, the CPV-269 isolate had semi-papillated sporangia with pedicel medium in size, which is a typical characteristic of *P. capsici*, and short, medium, and large pedicels (Granke *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012). Semi-papillated sporangia have been



Pavon, 2013; Lamour y Hausbeck, 2000). Existe el antecedente de una elevada diversidad genética en poblaciones del centro de México (Castro-Rocha *et al.*, 2016); sin embargo, es necesario considerar factores genéticos adicionales que pudieran ocasionar variabilidad porque el elevado polimorfismo que presenta *P. capsici* podría estar mediado por otros procesos causantes de variabilidad como: mutaciones, recombinación genética, procesos epigenéticos y transferencia horizontal de genes y cromosomas (Raffaele y Kamoun, 2012). Otro factor desfavorable en el manejo de la marchitez, es la práctica de rotación de cultivos susceptibles como *C. pepo* y *S. lycopersicum*. Es preferible que la rotación de cultivos se lleve a cabo en periodos de 3 a 5 años con hospedantes no susceptibles, con el propósito de reducir los niveles de inóculo del patógeno (Barchenger *et al.*, 2018).

La forma de los esporangios registrada en el presente estudio coincide con la descripción para *P. capsici*, la cual puede presentar formas variadas desde ovoides, ovo-ovoides, sub-globosos, globosos, elipsoides, fusiformes, piriformes y con formas irregulares y la frecuente presencia de esporangios bipapilados (Li *et al.*, 2007; Soto-Plancarte *et al.*, 2017). Los aislados provenientes de *C. pepo* mostraron esporangios con formas irregulares o distorsionadas; reflejo de la plasticidad fenotípica de esta especie (Iribarren *et al.*, 2015). Por otro lado, el aislado CPV-269 presentó esporangios semipapilados con pedicelo mediano, esta característica es típica de *P. capsici* con pedicelos cortos, medianos y largos (Granke *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012). Esporangios semipapilados han sido reportados previamente en aislados de *P. capsici* (French-Monar *et al.*, 2006). En este estudio, el aislado CPV-279

previously reported in *P. capsici* isolates (French-Monar *et al.*, 2006). In this study, the CPV-279 isolate that was obtained from *C. annuum* had apical globose chlamyospores; this isolate was previously identified as *P. capsici* at the molecular level by sequencing the cytochrome oxidase genes 1 and 2 (Reyes-Tena *et al.*, 2019a). The presence of chlamyospores is an unusual characteristic in *P. capsici* and is not considered in the description of the interactive key for this species (Aragaki and Uchida, 2001; Bowers *et al.*, 2007; Donahoo and Lamour, 2008; Martin *et al.*, 2012). However, there are several reports of *P. capsici* forming these structures in the United States and Malaysia (Farhana *et al.*, 2013; Granke *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2004). For this reason, the high level of phenotypic variability that this pathogen shows could be associated with the location and the host from which they were obtained, but more studies need to be conducted to confirm this fact.

## CONCLUSIONS

The results provide information about the presence and distribution of *P. capsici* in solanaceae (35 isolates) and cucurbitaceae (six isolates) producing areas in Michoacán and Jalisco municipalities. Thirty-three isolates from *C. annuum*, six from *C. pepo*, and two from *S. lycopersicum* were obtained. Since no previous studies have been conducted in these production areas, the information provided in this research will help horticultural producers to adopt preventive measures and apply specific products to combat this pathogen.

obtenido de *C. annuum* presentó clamidosporas apicales globosas, este aislado previamente fue identificado a nivel molecular como *P. capsici* mediante la secuenciación de los genes de la citocromo oxidasa 1 y 2 (Reyes-Tena *et al.*, 2019a). La presencia de clamidosporas es una característica poco común en *P. capsici* y no está considerada en la descripción de la clave lúcida para esta especie (Aragaki y Uchida, 2001; Bowers *et al.*, 2007; Donahoo y Lamour, 2008; Martin *et al.*, 2012). Sin embargo, existen varios reportes de *P. capsici* en EE. UU. y Malasia que forman estas estructuras (Farhana *et al.*, 2013; Granke *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2004). Por este motivo, la alta variabilidad fenotípica que presenta este patógeno podría correlacionarse con el lugar y el hospedante de donde fueron obtenidos, sin embargo, se necesitan estudios para confirmarlo.

## CONCLUSIONES

Los resultados proveen información acerca de la presencia y distribución de *P. capsici* en zonas de producción de solanáceas (35 aislados) y cucurbitáceas (seis aislados) en municipios de Michoacán y Jalisco. Se aislaron 33 aislamientos del cultivo de *C. annuum*, seis de *C. pepo* y dos de *S. lycopersicum*. Debido a que no existen estudios previos en estas zonas de producción, la información de este trabajo es útil para que los productores adopten medidas de prevención y apliquen productos específicos contra este patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado.

## ACKNOWLEDGMENTS

The first author of this study wishes to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted for his Ph.D. studies.

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

## LITERATURA CITADA

- Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora* Collection. [http://idtools.org/id/phytophthora/tabular\\_key.php](http://idtools.org/id/phytophthora/tabular_key.php)
- Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D y Saavedra-Romero LL. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 19(1): 5-12. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.062>
- Anaya-López JL, González-Chavira MM, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R, Rodríguez-Martínez R, Guevara-González RG, Guevara-Olvera L, Montero-Tavera V y Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(3): 373-383. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342011000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Aragaki M and Uchida JY. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. Mycologia 93(1): 137-145. <https://www.jstor.org/stable/3761611>
- Babadoost M and Pavon C. 2013. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. Plant Disease 97(11): 1478-1483. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1123-RE>
- 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>

- Bautista-Calles JR, García-Espinosa R, Zavaleta-Mejía E, Pérez-Moreno J, Montes-Belmont R, Ferrera-Cerrato R and Huerta-Lara M. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia* 35(9): 613-618. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33914212007.pdf>
- Bi Y, Hu J, Cui X, Shao J, Lu X, Meng Q, and Liu X. 2014. Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathology* 63(6): 1365-1373. <https://doi.org/10.1111/ppa.12220>
- Bowers JH, Martin FN, Tooley PW and Luz EDMN. 2007. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97(4): 492-503. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0492>
- Castro-Rocha A, Fernández-Pavía SP y Osuna-Ávila P. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 49-65. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092012000100005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092012000100005&lng=es&nrm=iso)
- Castro-Rocha A, Shrestha S, Lyon B, Grimaldo-Pantoja GL, Flores-Marges JP, Valero-Galván J, Aguirre-Ramírez M, Osuna-Ávila P, Gómez-Dorantes N, Ávila-Quezada G, Luna-Ruiz JJ, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP and Lamour K. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycological Progress* 15:15. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1157-0>
- Donahoo RS and Lamour KH. 2008. Interspecific hybridization and apomixes between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia* 100(6): 911-920. <https://doi.org/10.3852/08-028>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Farhana MDSN, Bivi MR, Khairulmazmi A, Wong SK and Sariah M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora capsici*, the causal agent of foot rot disease of black pepper in Sarawak, Malaysia. *International Journal of Agriculture and Biology* 15(6) 1083-1090. [http://www.fspublishers.org/published\\_papers/70113\\_.pdf](http://www.fspublishers.org/published_papers/70113_.pdf)
- Fernández-Pavía SP, Biles CL, Waugh ME, Onsurez-Waugh K, Rodríguez-Alvarado G and Lidell CM. 2004. Characterization of southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1): 82-89. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222111>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G and Sánchez-Yáñez JM. 2007. Buckeye rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* in Michoacan, Mexico. *Plant Disease* 87(7): 872-872. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.7.872C>
- French-Monar RD, Jones JB and Roberts PD. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease* 90(3): 345-350. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0345>
- García-Rodríguez MR, Chiquito-Almanza E, Loeza-Lara PD, Godoy-Hernández H, Villordo-Pineda E, Pons-Hernández JL, González-Chavira J y Anaya-López JL. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44(6): 701-709. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952010000600009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952010000600009&lng=es&nrm=iso)
- Gevens AJ, Donahoo RS, Lamour KH and Hausbeck MK. 2007. Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water. *Phytopathology* 97(4): 421-428. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0421>
- Gobena D, Roig J, Galmarini C, Hulvey J and Lamour K. 2012. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates from pepper and pumpkin in Argentina. *Mycologia* 104(1): 102-107. <https://doi.org/10.3852/11-147>
- Gómez-Rodríguez O, Corona-Torres T and Aguilar-Rincón VH. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. *Crop Protection* 92 (2):148-152. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.023>
- Granke LL, Quesada-Ocampo LM and Hausbeck MK. 2011. Variation in phenotypic characteristics of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection. *Plant Disease* 95(9): 1080-1088. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0190>
- Granke LL, Quesada-Ocampo L, Lamour K and Hausbeck MK. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease* 96(11): 1588-1600. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0211-FE>
- Hurtado-González O, Aragon-Caballero L, Apaza-Tapia W, Donahoo R and Lamour K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in coastal Peru. *Phytopathology* 98(6): 688-694. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-6-0688>
- Iribarren MJ, Pascuan C, Soto G and Ayub ND. 2015. Genetic analysis of environmental strains of the plant pathogen *Phytophthora capsici* reveals heterogeneous repertoire of effectors and possible effector evolution via genomic island. *FEMS Microbiology Letters* 362(22): 1-6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv189>
- Islam SZ, Babadoost M, Lambert NK, Ndeme A and Fouly HM. 2004. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Disease* 89(2): 191-197. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0191>
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalió RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grünwald NJ, Mukhtar MS, Tomé DFA, Tör M, Van den ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuze H, Meijer HJG, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PRJ and Govers F. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 16(4): 413-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Lamour KH and Hausbeck MK. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90(4): 396-400. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.396>

- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant Pathology 13(4): 319-337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Li Z, Long W, Zheng J and Lei J. 2007. Isolation and identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation. Frontiers of Agriculture in China 1(4): 377-381. <https://doi.org/10.1007/s11703-007-0063-2>
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. Plant Disease 96(8): 1080-1103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Meitz JC, Linde CC, Thompson A, Langenhoven S and McLeod A. 2010. *Phytophthora capsici* on vegetable hosts in South Africa: distribution, host range and genetic diversity. Australasian Plant Pathology 39(5): 431-439. <http://link.springer.com/10.1071/AP09075>
- Morán-Bañuelos SH, Aguilar-Rincón VH, Corona-Torres T y Zavaleta-Mejía E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana 33(4): 21-26. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_isoref&pid=S0187-73802010000500006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0187-73802010000500006&lng=es&tlng=es)
- Palma-Martínez E, Aguilar-Rincón VH, Corona-Torres T and Gómez-Rodríguez O. 2017. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en líneas de chile huacle (*Capsicum annum* L.). Revista Fitotecnia Mexicana 40(3): 359-363. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-3/13a.pdf>
- Pérez-Moreno L, Durán-Ortiz LJ, Ramírez-Malagón R, Sánchez-Pale JR y Olalde-Portugal V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 21(1): 19-25. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221103>
- Pons-Hernández JL, Guerrero-Aguilar BZ, González-Chavira MM, González-Pérez E, Villalobos-Reyes S y Muñoz-Sánchez CI. 2020. Variabilidad fenotípica de aislados de *Phytophthora capsici* en Guanajuato. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(8): 1891-1901. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i8.2618>
- Quesada-Ocampo LM and Hausbeck MK. 2010. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 100(6): 619-627. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0619>
- Raffaele S and Kamoun S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. Nature Reviews Microbiology 10(6): 417-430. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2790>
- Reis A, Paz-Lima ML, Moita AW, Aguiar FM, Fonseca MEN, Café-Filho AC and Boiteux LS. 2018. A reappraisal of the natural and experimental host range of neotropical *Phytophthora capsici* isolates from *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae* and *Fabaceae*. Journal of Plant Pathology 100: 215-223. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0069-z>
- Reyes-Tena A, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L and Quiñones-Aguilar EE. 2017. Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annum* L. against *Phytophthora capsici*. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 54(3): 513-522. <https://www.pakjas.com.pk/papers/2730.pdf>
- Reyes-Tena A, Castro-Rocha A, Rodríguez-Alvarado G, Vázquez-Marrufo G, Pedraza-Santos ME, Lamour K, Larsen J and Fernández-Pavía SP. 2019a. Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico. HortScience 54(9): 1526-1531. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13964-19>
- Reyes-Tena A, Huguet-Tapia JC, Lamour KH, Goss EM, Rodríguez-Alvarado G, Vázquez-Marrufo G, Santillán-Mendoza R and Fernández-Pavía SP. 2019b. Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico. Molecular Plant-Microbe Interactions 32(10): 1267-1269. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0014-A>
- Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2019c. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annum*) en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-1>
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. Mycological Progress 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2020 Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <https://www.gob.mx/siap> (consulta, julio 2020).
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 27(2): 134-147. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092009000200006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000200006)
- Silvar C, Merino F and Díaz J. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in northwest Spain: analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. Plant Disease 90(9): 1135-1142. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1135>
- Soto-Plancarte A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, López-Pérez L, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(8): 1867-1880. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263153822011>
- Velarde-Félix S, Garzón-Tiznado JA, Hernández-Verdugo S, López-Orona CA and Retes-Manjarrez JE. 2018. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. Canadian Journal of Plant Pathology 40(2): 238-247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>
- Yin J, Jackson KL, Candole BL, Csinos AS, Langston DB and Ji P. 2012. Aggressiveness and diversity of *Phytophthora capsici* on vegetable crops in Georgia. Annals Applied Biology 160(2): 191-200. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00532.x>



# ***Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels**

## ***Fusarium* spp. y estimación de carga de inóculo asociados a hijuelos de *Agave tequilana* en diferentes niveles de inductividad epidémica regional**

Coral Mendoza-Ramos, Gustavo Mora-Aguilera\*, <sup>1</sup>Programa Fitosanidad-Fitopatología; Juan José Coria-Contreras, Baldemar Santana-Peñaloza, Gerardo Acevedo-Sánchez, Verónica Martínez-Bustamante, <sup>2</sup>Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF); María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, <sup>3</sup>Programa Fruticultura. <sup>1,2,3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México; Ramón Rubio-Cortés, Área de Investigación, Casa Sauza, Francisco Javier Sauza #80, Tequila, Jalisco, C.P. 46400. \*Autor de Correspondencia: morag@colpos.mx

Recibido: 28 de Junio, 2020.

Aceptado: 10 de Diciembre, 2020.

Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutiérrez-Espinosa MA and Rubio-Cortés R. 2021. *Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 94-121.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-8>

Primera publicación en línea: 30 de Diciembre, 2020.

First published on line: December 30, 2020.

**Resumen.** Esta investigación tuvo como objetivos identificar la especie(s) de *Fusarium* asociada(s) a hijuelos comerciales de *Agave tequilana* y desarrollar una metodología para cuantificar la carga de inóculo en hijuelos provenientes de plantaciones madre de Jalisco con inductividad epidémica

**Abstract.** The research objective was to identify the *Fusarium* specie(s) associated with commercial offsets of *Agave tequilana* and to develop a methodology to quantify the inoculum load in offsets from Jalisco mother plantations with differential epidemic inductivity to wilt and dry bud rot syndrome (SMAP). The purpose was to provide criteria for the certification of mother plantations. The samples were collect between March and May in 2018 and 2019, from 21 commercial plantations of 14 municipalities of Los Altos, South, and Valley of Jalisco. The number of diseased plants (PE) and SMAP severity (S) were estimated in 63 and 200 plants/plantation using App-SIVEA for 2018 and 2019 respectively. The CIFUSAG method was developed and applied in 7055 offsets and 46656 fungal colonies obtained from 2364 basal ‘piña’ wash isolates, internal tissue sections, and offset total maceration. Colony



diferencial al síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP). La finalidad fue proporcionar criterios para la certificación de plantaciones madre. La fase de campo se realizó entre marzo-mayo 2018 y 2019 en 21 plantaciones comerciales en 14 municipios de Los Altos, Sur y Valles de Jalisco. Se estimó el número de plantas enfermas (PE) y severidad SMAP (S) en 63 y 200 plantas/plantación mediante App-SIVEA para 2018 y 2019 respectivamente. Se desarrolló y aplicó el método CIFUSAG en 7055 hijuelos y 46 656 colonias fungosas obtenidas de 2364 siembras de lavado basal de la ‘piña’, secciones de tejido interno y macerado total de hijuelo. Unidades formadoras de colonia de *Fusarium* spp. (Fsp) y hongos totales (HT), purificación, monospóricos, caracterización morfológica y cultural se realizó con los medios Komada, agua-agar, Sabouraud, SNA y Sabouraud, respectivamente, diferenciando 557 aislados. La mayor inductividad epidémica en Los Altos significó moderado Índice de *Fusarium* [(IF) = ( $\sum$ Fsp) / ( $\sum$ HT)] (0.30 y 0.40) y Fsp (20 y 72UFC) respecto al Sur que tuvo valores más altos (0.69, 0.50; 23, 84UFC, respectivamente) (Tukey  $p=0.05$ ). Calibre de hijuelo no tuvo influencia en IF y Fsp ( $p=0.183$ ). IF y Fsp de lavado basal no estuvieron correlacionadas con S de plantas madres ( $r^2 = 0.036$  y  $0.13$ ), mientras que PE únicamente se correlacionó con Fsp ( $r^2 = 0.94$ ). La carga de inóculo obtenida por lavado fue superior al de tejido interno con un total de 17,828 UFC (93%) e IF=0.42. Análisis molecular con el gen EF-1a evidenció asociación de 23 cepas con cuatro complejos filogenéticos: *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. incarnatum-equiseti* con identidad superior al 98%. El hijuelo comercial de *Agave tequilana* constituye un factor de dispersión de al menos cuatro especies de *Fusarium* spp. en el rango de  $3.3\pm 3$  y  $6.83\pm 4.2$  UFC/hijuelo.

**Palabras clave:** Agave azul, marchitez, pudrición seca, suelo, supresividad.

Forming Units (CFU) of *Fusarium* spp. (Fsp) and total fungi (HT), purification, monosporic, morphological and cultural characterization was made with Komada, water-agar, Sabouraud, SNA, and Sabouraud media, respectively, selecting 557 contrasting isolates. The highest epidemic inductivity in Los Altos was associated to moderate *Fusarium* Index [(FI) = ( $\sum$ Fsp) / ( $\sum$ HT)] (0.30 and 0.40) and Fsp (20 and 72 CFU) compared to South, which had higher values (0.69, 0.50; 23, 84 CFU, respectively) (Tukey  $p=0.05$ ). The offset base-size had no influence on FI and Fsp ( $p=0.183$ ). FI and Fsp of basal ‘piña’ washing were not correlated with S in mother plants ( $r^2 = 0.036$  and  $0.13$ ), while PE only was correlated with Fsp ( $r^2 = 0.94$ ). The inoculum load obtained by washing was higher than internal tissue with a total of 17,828 CFU (93%) and FI=0.42. Molecular analysis with the EF-1a gene showed an association of 23 isolates with four phylogenetic complexes: *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* and *F. incarnatum-equiseti* with identity greater than 98%. Offsets of *Agave tequilana* constitutes a dispersal factor of at least four species of *Fusarium* spp. in the range of  $3.3\pm 3$  y  $6.83\pm 4.2$  CFU/offset.

**Key words:** Blue Agave, wilt, dry rot, soil, supresive.

*Agave tequilana* variety Blue is the raw material used to produce tequila. Mexico is the only tequila producer in the world and holds the Denomination of Origin of Tequila (DOT) since 1977. This beverage is also supported by NOM-006-SCFI-2012. Its DOT condition restricts the growing of *Agave tequilana* var. Blue for tequila production in five Mexican states, of which Jalisco represents 77% of the total production (SIAP, 2020; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019). According to records of Mexico’s Consejo Regulador del

El *Agave tequilana* variedad Azul, se utiliza como materia prima para la elaboración del tequila. México es el único productor de ésta bebida a nivel mundial, contando con la Denominación de Origen del Tequila (DOT) desde 1977. Esta bebida también se encuentra respaldada por la NOM-006-SCFI-2012. La condición DOT restringe la siembra de *Agave tequilana* var. Azul para producción de tequila en cinco estados del país, de los cuales Jalisco representa el 77% de producción total (SIAP, 2020; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Acorde a datos del CRT, en 2018 y 2019, la superficie plantada de agave aumentó aproximadamente 31% implicando un máximo histórico de 96 millones de hijuelos plantados (3,200 hijuelos ha<sup>-1</sup>), sin incluir hijuelos para restitución de hectáreas jimadas (CRT, 2020).

En la actualidad existe consenso empírico que el material propagativo de agave contribuye en la diseminación de plagas en general, entre las que se incluye *Fusarium* sp., agente de gran impacto productivo (SENASICA-DGSV, 2017; NOM-083-FITO-2003). Sin embargo, no existen estudios que demuestren en hijuelos de *A. tequilana* la asociación de *Fusarium* spp. ni la carga de inóculo que pueden diseminar y constituir un factor de riesgo para el establecimiento de nuevas plantaciones. Considerando la existencia de zonas con diferente nivel de inductividad y nivel de daño por el síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP) (López-Bautista *et al.*, 2020), y que algunos predios se emplean como plantaciones madre, con limitada o nula regulación, p.e. la certificación sanitaria genérica se realiza en Guanajuato, pero no en otros estados productores de la DOT, se justifican estudios etiológicos y epidemiológicos a nivel de planta madre-hijuelo con el fin de fortalecer y justificar el establecimiento de plantaciones certificadas para producir y comercializar hijuelos de bajo riesgo sanitario. A nivel de plantaciones comerciales

Tequila (CRT), in 2018 and 2019, the area planted with agave increased approximately 31%, which represents an all-time-record of 96 million of planted offsets (3,200 offsets ha<sup>-1</sup>), not including offsets to replant harvested hectares (CRT, 2020).

At present, there is an empirical consensus that the agave propagative material contributes to pests dissemination, such as *Fusarium*, an agent of great productive impact (SENASICA-DGSV, 2017; NOM-083-FITO-2003). However, there are no studies to demonstrate, using *A. tequilana* offsets, that these are associated with *Fusarium* spp. nor the inoculum load that they can disseminate and become a risk factor for the establishment of new plantations. Considering the existence of areas with different levels of epidemic inductivity and damage caused by the wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) (López-Bautista *et al.*, 2020), and that some plantations are used as mother plantings, with limited or null regulation, for example, the generic sanitary certification is carried out in Guanajuato, but not in any other producing states of DOT, etiological and epidemiological studies at mother plant-offset level are justified to strengthen and justify the establishment of certified plantations where low sanitary risk offsets can be produced and marketed. At commercial plantations of adult plants, which are commonly used as offset mother plants, López-Bautista and collaborators carried out a comprehensive regional study in Jalisco with emphasis on *Fusarium* species (López-Bautista *et al.*, 2020). In that study, agave wilt and dry bud rot were identified as a syndrome (SMAP) associated with a *Fusarium* species complex. These researchers reported a total of 16 binomial and phylogenetic species, plus six non-identified species isolated from soil, root and aerial tissue, which belong to four phylogenetic complexes: *Fusarium oxysporum* [FOSC], *F. solani* [FSSC], *F. fujikuroi* [FFSC] and *F. incarnatum-equiseti*

de plantas adultas, normalmente empleadas como plantas madre de hijuelos, López-Bautista y colaboradores realizaron un trabajo exhaustivo regional en Jalisco con énfasis en las especies de *Fusarium* (López-Bautista *et al.*, 2020). En este trabajo se identificó a la marchitez y pudrición seca del cogollo del agave como un síndrome (SMAP) asociado con un complejo de especies de *Fusarium*. Éstos investigadores reportaron un total de 16 especies binomiales y filogenéticas, y otras seis no identificadas aisladas de suelo, raíz y tejido aéreo pertenecientes a cuatro complejos filogenéticos: *Fusarium oxysporum* [FOSC], *F. solani* [FSSC], *F. fujikuroi* [FFSC] y *F. incarnatum-equiseti* [FIESC]. Al menos dos especies binomiales ya se habían reportado previamente: *F. oxysporum* y *F. solani* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

La implicación de la sanidad de planta madre y la inductividad parasítica del suelo en la salud del hijuelo es importante para determinar estrategias de certificación y manejo de riesgos productivos regionales. La extensiva asociación de complejos de especies de *Fusarium* SMAP en plantaciones comerciales de *Agave tequilana* (López-Bautista *et al.*, 2020), permite postular como base racional del presente trabajo que la asociación diferencial cuantitativa y composicional de *Fusarium*, tanto en condición externa no parasítica, como en forma internalizada en tejidos de hijuelos de agave azul, está en función del tiempo de crecimiento del hijuelo y del nivel de inductividad epidémica regional en la cual estén establecidas las plantación madre. En este contexto, este trabajo se propuso con el objetivo de desarrollar y aplicar una metodología que permitiera establecer la asociación parasítica de *Fusarium* spp. con hijuelos de *A. tequilana* y estimar la carga de inóculo en función de regiones epidémicas inductivas SMAP en Jalisco y al estado de desarrollo del hijuelo al momento del corte con fines comerciales.

[FIESC]. At least two binomial species had been previously reported: *F. oxysporum* and *F. solani* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

The implication of mother plant healthiness and the soil parasitic inductivity in the offset health is important to determine certification strategies and risk management of agave production at regional level. The extensive association of *Fusarium* species complexes with SMAP in commercial plantations of *Agave tequilana* (López-Bautista *et al.*, 2020) allows to postulate, as the rational basis of the present work, that the differential quantity and compositional association of *Fusarium*, both in a non-parasitic external condition and in an internalized form in tissues of blue agave offsets, is dependent upon the offset growth time as well as of the epidemic inductivity level in the region where mother plantations are established. In this context, the purpose of this study was to develop and apply a methodology to demonstrate the parasitic association of *Fusarium* spp. with *A. tequilana* offsets, and to estimate the inoculum load based on SMAP inductive epidemic regions in Jalisco and the status of the offsets development by the time they are cut for commercial purposes.

## MATERIALS AND METHODS

**Establishment of the experimental site in the field.** Samples were collected from offsets for commercial use in 2018 and 2019 with nine and 12 commercial plantations of *A. tequilana* variety Blue between 3-4-years-old, respectively. The samples were collected in 14 municipalities distributed across the agave production regions of Los Altos, Valley, and South Jalisco. The plantations were selected based on the regional epidemic inductivity level represented by diseased plants or showing

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Establecimiento del sitio experimental en campo.** La colecta de muestras a partir de hijuelos para uso comercial se realizó en 2018 y 2019 con nueve y 12 plantaciones comerciales de *A. tequilana* variedad azul entre 3-4 años de edad, respectivamente. Las muestras se obtuvieron de 14 municipios, distribuidas en las regiones agaveras de Los Altos, Valles y Sur de Jalisco. Las plantaciones se seleccionaron con base al nivel de inductividad regional representado por plantas enfermas o sintomáticas a marchitez del agave en el ciclo epidémico 2017. Se utilizaron datos de la campaña contra plagas reglamentadas del agave de SENASICA y del Sistema Integral de Protección y Vigilancia Epidemiológica del Agave (SIVEA) (Cuadro 1).

**Características de plantaciones madre.** Las plantaciones madre se caracterizaron por edad de 3-4 años en periodo de arranque comercial de hijuelos según los criterios regionales aplicados por los productores, apariencia asintomática y manejo agronómico estándar consistente en aplicación de herbicidas (junio-julio), fertilización, “barbeo” (despunte de las hojas laterales para permitir el paso al surco) previo al corte de hijuelos, aporques en los primeros dos años y desquiete en plantaciones que lo presentaron.

**Diseño experimental.** El diseño experimental seleccionado para análisis de varianza fue un parcelas subdivididas en factorial 3x3x3 correspondiente a Altos, Valles y Sur, el factor región en parcela grande; inductividad alta, moderada y baja, del factor Intensidad epidémica de marchitez y pudrición seca, en parcela mediana; y tres calibres de hijuelos en parcela chica. Por región, las parcelas se seleccionaron con registros programados de arranque de hijuelos de empresas y productores cooperantes,

SMAP symptoms in the 2017 epidemic cycle. Data from SENASICA and Sistema Integral de Protección y Vigilancia Epidemiológica del Agave (SIVEA) campaign against agave regulated pests were used for that purposes (Table 1).

**Mother plantation characteristics.** Mother plantations were 3-4-year-old and offsets were commercially uprooting during the experiment development. These plantations conformed the regional criteria applied by producers including asymptomatic appearance and good standard agronomic management, which consists in the application of herbicides (June-July), fertilization, “trimming” (removal of side-leaf tips to access the rows) before offsets are cut, hillings in the first two years and removal of flower stalks when found.

**Experiment design.** The experiment design selected for the analysis of variance consisted in subdivided plots in factorial 3x3x3 that corresponded to Los Altos, Valley and South, the region factor in large plots; high, moderate, and low inductivity, the epidemic intensity factor of wilt and dry rot (SMAP) in medium-size plots; and three offset base-size in small plots. By region, the plantations were selected according to offset uproot scheduled records from cooperative companies and producers and based on their regional distribution to have two sites/inductivity/region available. Each plot was divided into three blocks with three rows each (3 m apart) with an approximated distribution in one hectare. Offsets for each base-size to obtain samples were taken from the site of field “temporary” harvest collection where offsets are stored after uprooting. In each plot, samples of the three base-size were collected: Lime, Orange, and Grapefruit (8-10, 10-12 and 12-15 cm in diameter of base-size or ‘piña’, respectively.) The total sample of 270 offsets plot<sup>-1</sup> was made up of 15

**Cuadro 1. Localización y caracterización tecnológica de 21 plantaciones comerciales de *Agave tequilana* seleccionadas en 2018 y 2019 para estudios etiológicos y carga de inóculo de hijuelos asociado con el síndrome de marchitez y pudrición seca del cogollo de planta madre en Jalisco.****Table 1. Location and technological characterization of 21 commercial plantations of *Agave tequilana* with agave wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) selected in 2018 and 2019 to study the etiology and inoculum load in commercial offsets.**

| Año  | Región | Inducti-<br>vidad   | Municipio           | Latitud     | Longitud    | Altitud<br>(msnm) | Tecnifi-<br>cación | Manejo     | ID Plantación |           |
|------|--------|---------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------------|--------------------|------------|---------------|-----------|
| 2018 | Altos  | Alta                | Atotonilco          | 20.51509    | -102.6127   | 1556              | Medio              | Inorgánico | A-ATO-P4      |           |
|      |        | Moderada            | Jesús María         | 20.59527    | -102.15688  | 2180              | Medio              | Inorgánico | A-JM-M2       |           |
|      |        | Baja                | Jesús María         | 20.76863    | -102.14421  | 2279              | Medio              | Inorgánico | A-JM-M1       |           |
|      | Sur    | Baja                | Juchitlán           | Juchitlán   | 20.08979    | -104.08275        | 1245               | Alto       | Inorgánico    | S-JUC-PM6 |
|      |        |                     | Juchitlán           | Juchitlán   | 20.09765    | -104.07422        | 1199               | Alto       | Inorgánico    | S-JUC-PM7 |
|      |        |                     | Juchitlán           | Juchitlán   | 20.05530    | -104.06809        | 1324               | Alto       | Inorgánico    | S-JUC-PM8 |
|      | Valles | Moderada            | Amatitán            | Amatitán    | 20.83527    | -103.66876        | 1224               | Medio      | Inorgánico    | V-AMA-P9  |
|      |        |                     | El Arenal           | El Arenal   | 20.78533    | -103.71006        | 1387               | Medio      | Inorgánico    | V-ARE-PM4 |
|      |        | Baja                | Amatitán            | Amatitán    | 20.87292    | -103.76204        | 1229               | Medio      | Inorgánico    | V-AMA-PM5 |
| 2019 | Altos  | Alta                | Zapotlanejo         | Zapotlanejo | 20.5677961  | -102.891988       | 1856               | Alto       | Inorgánico    | AZAP-A01  |
|      |        |                     | Arandas             | Arandas     | 20.6467737  | -102.273707       | 2078               | Alto       | Inorgánico    | AARA-A02  |
|      |        | Moderada            | Tepatitlán          | Tepatitlán  | 20.8714019  | -102.685529       | 1979               | Medio      | Inorgánico    | Atep-M01  |
|      |        |                     | Jesús María         | Jesús María | 20.5994848  | -102.15713        | 2186               | Alto       | Inorgánico    | AJM-M02   |
|      | Baja   | Ixtlahuacan del río | Ixtlahuacan del río | 21.0554448  | -103.192341 | 1674              | Alto               | Inorgánico | AIXT-B01      |           |
|      |        | Cañadas de Obregón  | Cañadas de Obregón  | 21.1631611  | -102.675379 | 1829              | Bajo               | Orgánico   | ACDO-B02      |           |
|      | Sur    | Alta                | Pihuamo             | Pihuamo     | 19.1997579  | -103.426473       | 707                | Medio      | Inorgánico    | SPIH-A01  |
|      |        |                     | Pihuamo             | Pihuamo     | 19.2114215  | -103.481563       | 655                | Medio      | Inorgánico    | SPIH-A02  |
|      |        | Moderada            | Juchitlan           | Juchitlan   | 20.1064934  | -104.061595       | 1190               | Medio      | Inorgánico    | SJUC-M01  |
|      |        |                     | Pihuamo             | Pihuamo     | 19.2475873  | -103.430513       | 681                | Medio      | Inorgánico    | SPIH-M02  |
| Baja |        | Tecolotlán          | Tecolotlán          | 20.1694819  | -104.042434 | 1177              | Medio              | Orgánico   | STEC-B01      |           |
|      |        | Tuxcacuesco         | Tuxcacuesco         | 19.7303572  | -103.906454 | 927               | Alto               | Inorgánico | STUX-B02      |           |

y con base en su distribución regional para contar con dos sitios/inductividad/región. Cada parcela se dividió en tres bloques separados por tres surcos (3 m de distancia), con representatividad aproximada de una hectárea. La muestra de hijuelos por tipo de calibre para toma de muestra se realizó de los sitios de acopio “temporal” parcelario donde se acomodan después arrancados. En cada parcela se colectaron muestras de los tres tamaños de calibre de hijuelos: Lima, Naranja y Toronja (8-10, 10-12 y 12-15 cm de diámetro de piña, respectivamente).

offsets per base-size in two replications per block. In 2018, three composite samples per base-size/block were selected, and two samples only in 2019, mainly in Los Altos and South regions, to widen the internalization sampling. Per plot, for external tissue samples from the 2018 production cycle, 27 samples/plot were obtained for a total of 243 total composite samples, and in 2019, 18 samples/plot for a total of 216 samples. For internal tissue samples, in 2018, 30 offsets were collected in a high-inductivity plot in Los Altos, and in 2019, 140



La muestra total de 270 hijuelos parcela<sup>1</sup> estuvo constituida de 15 hijuelos por calibre en dos repeticiones por bloque. En 2018, se seleccionaron tres muestras compuestas por calibre/bloque y en 2019 únicamente dos muestras principalmente en la región Los Altos y Sur para ampliar el muestreo de internalización. Por parcela, en tejido externo del ciclo productivo 2018 se obtuvieron 27 muestras/parcela para un total de 243 muestras compuestas totales; y en 2019, 18 muestras/parcela para un total de 216 muestras. En tejido interno en 2018, se colectaron 30 hijuelos de una parcela de alta inductividad en Los Altos, y en 2019 se colectaron 140 hijuelos (20 por predio), 120 de Los Altos y 20 de una parcela de baja inductividad en la región Sur.

**Método CIFUSAG para obtención de lavados basales.** Para seleccionar los hijuelos con base a su tamaño correcto de calibre se usaron aros metálicos con diámetros correspondientes a cada calibre; Lima 10 cm, Naranja 12 cm y Toronja 14 cm. Se realizó un lavado del cuello y base de las hojas de todos los hijuelos de la muestra compuesta. El lavado se realizó en una cubeta plástica de 15 L, con 1 L de agua desmineralizada estéril. Los hijuelos se sumergieron parcialmente y se tallaron con un cepillo plástico para desprender la mayor cantidad de suelo adherido. Una vez obtenido el lavado éste se agitó con un taladro modificado para homogenizar la muestra y con una malla plástica (abertura 2x2 mm) se filtró a otro recipiente de 2 L. El filtrado se dejó reposar durante 10-15 min para eliminar el excedente de agua y recuperar el suelo en tubos Falcon estériles de 50 mL (Figura 1 A1-A8). Las muestras se transportaron a laboratorio en hieleras con geles refrigerantes para conservación de temperatura y realizar su secado inmediato. La Figura 1 explica la metodología CIFUSAG. La descripción de literales y numerales (A1-E5) se indica a continuación: (A1) Distribución de hijuelos

offsets (20 per plot), 120 in Los Altos, and 20 in a low-inductivity plot in the South region.

**CIFUSAG method to obtain basal washings.** To select offsets based on their base-size, metallic rings with diameters were used: Lime 10 cm, Orange 12 cm and Grapefruit 14 cm. The base (neck) and leaf base per offset of the composite sample were washed. This was done with sterile demineralized water in a 15 L plastic bucket. The offsets were partially submerged and scrubbed with a plastic brush to remove as much adhered soil as possible. Once the wash liquid was obtained, it was agitated with a modified drill to homogenize the sample, and then filtered to another 2 L container with a plastic mesh (2x2 mm opening). The filtrate was left stand for 10-15 min to remove water excess and recover the soil in 50 mL sterile Falcon tubes (Figure 1 A1-A8). The samples were taken to the laboratory in coolers with cooling gels to maintain the temperature and dry them immediately. Figure 1 explains the CIFUSAG methodology: (A1) Offsets distribution in the field. (A2) Composite sample of 15 offsets for Lime, Orange, and Grapefruit base-size. (A3) 1L of sterile demineralized water. (A4) Offset basal washig. (A5) Modified drill. (A6) Sedimentation for 10-15min of washing. (A7) Removal of excess water and collection of solid phase. (A8) Sample of basal external tissue (whasing) in 50 mL sterile Falcon tubes. (B1) Sample of 20 Orange base-size offsets. (B2) Cut of leaves. (B3) Individual washing with soap and tap water to remove residues. (B4) Offset drying. (B5) Removal of external tissue. (B6) Individual cut of offsets. (C1) Scheme of the internal tissue selected per offset. (C2) Selection of tissue for direct *in vitro* medium-plated. (D1) Offset remaining tissue in disinfection process. (D2) Tissue maceration at 3000 rpm for 30s. (D3) Tissue of macerated offset. (D4) Bagasse filtering using plastic mesh. (D5) 50 ml homogeneous sample in a sterile Falcon tube. (E1)

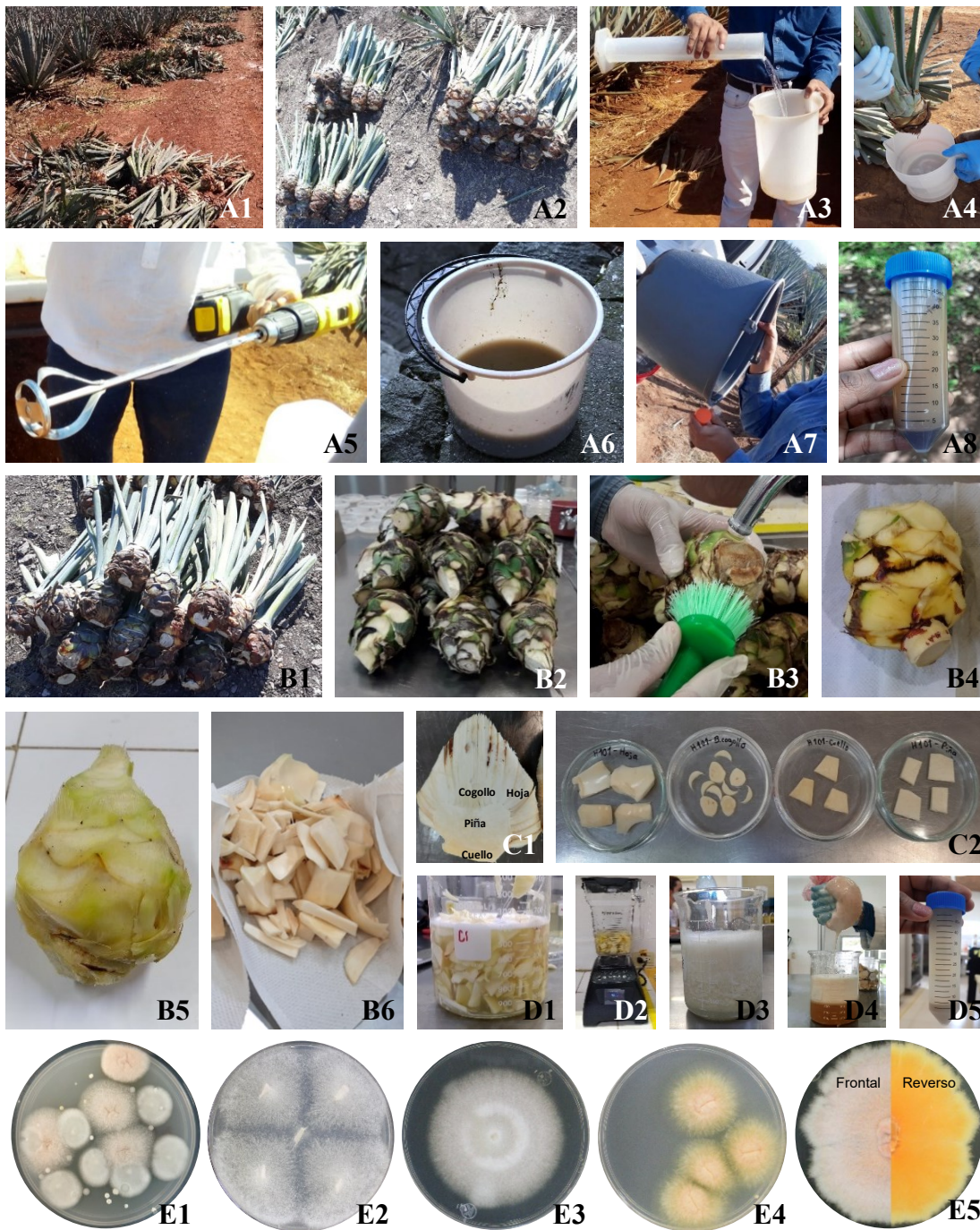


Figura 1. Método CIFUSAG para el procesamiento de toma de muestras de hijuelos de plantas madre de *Agave tequilana* para tejido externo basal (lavado) (A), tejido interno (B y C), tejido macerado (B y D) y metodología de laboratorio (E). La explicación de literales y numerales (A1-E5) se indica en la sección Método CIFUSAG para obtención de lavados basales (Páginas 7 y 9).

Figure 1. CIFUSAG method to collect samples of *Agave tequilana* mother plants for basal external tissue (A), internal tissue (B and C), macerated tissue (B and D) and laboratory methodology (E). Letters and numerals explanation can be found in CIFUSAG method to obtain basal washings (Pages 7 and 9).



en campo. (A2) Muestra compuesta de 15 hijuelos para calibre Lima, Naranja y Toronja. (A3) 1L de agua desmineralizada estéril. (A4) Lavado basal del hijuelo. (A5) Taladro modificado. (A6) Lavado en reposo 10-15min. (A7) Eliminación de agua excedente y recolección de material sólido. (A8) Muestra de tejido externo basal en tubo Falcon estéril de 50mL. (B1) Muestra de 20 hijuelos calibre Naranja. (B2) Corte de hojas del cogollo alto. (B3) Lavado individual con jabón y agua del grifo para eliminación de residuos. (B4) Secado del hijuelo. (B5) Eliminación de tejido externo. (B6) Corte individual de hijuelos. (C1) Esquematación de tipos de tejido interno en hijuelo. (C2) Selección de tejido para siembras directas. (D1) Tejido restante del hijuelo en proceso de desinfestación. (D2) Macerado de tejido a 3000 rpm. durante 30s. (D3) Tejido de hijuelo macerado. (D4) Filtrado de bagazo con malla plástica. (D5) Muestra homogénea de 50ml en Tubo Falcon estéril. (E1) Siembra de tejido externo en medio Komada. (E2) Siembra de tejido interno. (E3) Cepa en purificación en agua-agar. (E4) Monospórico y (E5) Caracterización en medio Sabouraud.

**Selección de hijuelos para estudios de internalización y carga de inóculo interno (CII).** En adición a las muestras de tejido externo, en 2018 se colectaron 30 hijuelos distribuidos en calibre Lima, Naranja y Toronja de un predio de alta inductividad para estudios de internalización y en 2019 se seleccionaron hijuelos para disección individual y obtención de aislamientos de tejido interno. De las 12 parcelas totales, se seleccionaron seis de Los Altos, dos por cada nivel de inductividad (alta, moderada y baja inductividad) y una de Sur (baja inductividad). Por parcela, se seleccionaron 20 hijuelos de tamaño Naranja distribuidos en los tres bloques del diseño experimental (Figura 1 B1). En total se colectaron y procesaron 140 hijuelos los cuales

External tissue in Komada medium. (E2) Internal tissue in culture medium. (E3) Purification of isolates in water-agar. (E4) Monosporic culture (E5) and Culture characterization in Sabouraud medium.

**Offset selection for internalization and internal inoculum load studies (IIL).** In addition to the external tissue samples, 30 offsets were collected in 2018 from a high-inductivity plot for internalization studies distributed in Lime, Orange, and Grapefruit base-sizes. In 2019, offsets were also selected for individual dissection and collection of internal tissue isolates: Of the 12 total plantations, six from Los Altos were selected, two per inductivity level (high, moderate, and low inductivity) and one from the South region (low inductivity). Per plot, 20 Orange-size offsets were selected and distributed in the three experiment design blocks (Figure 1B1). A total of 140 offsets were collected and processed, and then used to obtain different internal tissue (neck, piña, and leaves and bud base), the rest of the tissue was macerated to evaluate the total internal inoculum load.

**Mother plants evaluation.** To estimate the commercial plantations phytosanitary status, the phytosanitary mother plants condition at the sampling and collection offsets plot was evaluated using the diagrammatic scale proposed by Jiménez-González *et. al.* (2017) (Figure 1B-C) and the sampling system (<3 ha) proposed by SIVEA.

The *in situ* evaluation was performed with App-SIVEA v4.1 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). The sampling started with the third plant of each row to prevent edge effects. In 2018, 63 plants/plots were evaluated divided in three rows, one per block, with 21 plants each. In 2019, 20 quadrants divided in the three experiment blocks were evaluated using 20 continuous plants for each one, which totaled 200

se utilizaron para obtener diferente tejido interno (cuello, piña, base de las hojas y base del cogollo), el tejido restante, se maceró para evaluar carga de inóculo interno total.

**Evaluación de plantas madre.** Con la finalidad de registrar el estatus fitosanitario de plantaciones comerciales en la parcela de muestreo y colecta de hijuelos se evaluó la condición fitosanitaria de plantas madre mediante la escala diagramática propuesta por Jiménez-González y colaboradores (2017) (Figura 1B-C) con el sistema de muestreo (<3 ha) propuesto por SIVEA.

La evaluación *in situ* se realizó con App-SIVEA v4.1 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). El muestreo comenzó a partir de la tercera planta de cada surco para evitar efecto orilla. En 2018 se evaluaron 63 plantas/parcela, divididos en tres surcos, uno por bloque, con 21 plantas cada uno. En 2019 se evaluaron 10 cuadrantes distribuidos en los tres bloques del experimento, con 20 plantas continuas por cada uno, dando un total de 200 plantas evaluadas por plantación para marchitez del agave y pudrición seca del cogollo (Figura 1A). Los datos se enviaron en tiempo-real a la plataforma [www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx) desde los módulos respectivos de App-SIVEA, posteriormente se realizó la descarga de la matriz epidemiológica para análisis.

**Procesamiento en Laboratorio. Secado de muestras de tejido externo.** Las muestras colocadas en tubos Falcon tuvieron un periodo de 8-48 h para su traslado al laboratorio debido a las distancias de los predios para toma de muestra. Durante este tiempo se mantuvieron en hieleras con geles refrigerantes. Una vez en laboratorio se mantuvieron en refrigeración a 4 °C por 6-8 h para dejar precipitar la muestra y eliminar el exceso de agua. Posteriormente, las muestras se colocaron sobre toallas interdoblas (Sanitas®) estériles por 12 h en una

evaluated plants per plantation for agave wilt and dry bud rot (SMAP) (Figure 1A). The data were sent in real time to the platform [www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx) from the corresponding App-SIVEA modules and then the epidemiological matrix data was downloaded for analysis.

**Laboratory Processing: Drying of external tissue samples.** The samples placed in Falcon tubes arrived to the laboratory after a 8-48 h period because of the distance from the plantations where the samples were taken. During the transportation time, samples were kept in coolers with cooling gels. Once in the laboratory, they were refrigerated at 4 °C for 6-8 h for further precipitation and removal of water excess. Then, the samples were placed on sterile interfolded paper towels (Sanitas®) for 12 h in a laminar flow chamber for dried-out (Figure 1 B2-B4).

**External tissue cultivation.** Once the samples were dried-out, a mother dilution was prepared in 15 mL Falcon tubes using 1 g in 9 mL (1:9 ratio) of sterile demineralized water. After 15 min left standing, the mixture was manually homogenized for 1 min and diluted at  $1 \times 10^{0.5}$ . For that 1 mL of the mother dilution and 1 ml of sterile water were mixed to optimize colony counting. Using a Drigalsky spatula, an aliquot of 0.1 mL was distributed in a Petri dish plate containing Komada medium (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 1 E1). The plates were left at room temperature for seven days for counting of colonies of *Fusarium* spp. and total fungi.

**Isolation of internal and macerated tissue for III.** The 140 Orange base-size offsets were washed in the laboratory to remove as much soil from the outside as possible. Using a machete deep cleaned with sodium hypochlorite (3%) and alcohol (70%),

cámara de flujo laminar para su secado (Figura 1 B2-B4).

**Siembra de tejido externo.** Con la muestra seca, se realizó una dilución madre utilizando 1 g en 9 mL de agua desmineralizada estéril (proporción 1:9) en tubos Falcon de 15 mL. Después de un reposo de 15 min, la mezcla se homogenizó por 1 min de manera manual y se realizó una dilución  $1 \times 10^{0.5}$ , donde se utilizó 1 mL de la dilución madre y 1 mL de agua estéril, a fin de optimizar el conteo de colonias. Mediante una espátula Drigalsky se distribuyó una alícuota de 0.1 mL en cajas de Petri con medio Komada (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 1 E1). Las muestras crecieron durante siete días para realizar los conteos de colonias de *Fusarium* spp. y hongos totales.

**Aislamiento de tejido interno y macerado para CII.** Los 140 hijuelos tamaño Naranja colectados se lavaron en laboratorio para eliminar la mayor cantidad de suelo del exterior. Con un machete rambo desinfectado con hipoclorito de sodio (3%) y alcohol (70%) se eliminó el exterior del hijuelo hasta dejar solo tejido interno (piña blanca) (Figura 1 B5). El tejido interno se dividió en trozos con la finalidad de separar muestras de cuello, piña, base de hoja y base de cogollo (Figura 1 B6). De cada tipo de tejido se cortaron 25 trozos de 0.5x0.5 cm para siembras directas. Estos, se desinfectaron en la campana de flujo laminar con hipoclorito (3%) seguido de alcohol (70%) por dos minutos cada uno, finalmente se realizaron dos enjuagues de dos minutos con agua desmineralizada estéril (Figura 1 C2). Los trozos de tejido se colocaron sobre toallas interdobradas durante 24 h para su secado con la finalidad de reducir crecimiento bacteriano. El resto de tejido interno se desinfectó en vasos de precipitado bajo el procedimiento previo para posteriormente macerarlo. Este proceso se realizó por cada hijuelo trabajado.

the external parts of the offset was removed until only internal tissue (white 'piña') was left (Figure 1 B5). The internal tissue was divided in pieces to take samples of neck, 'piña', leave-base and bud-base (Figure 1 B6). Per type of tissue, 25 pieces of 0.5x0.5 cm were cut for direct medium plating. These pieces were disinfested in the laminar flow chamber with hypochlorite (3%), followed by alcohol (70%) for two minutes each, and, finally, rinsed twice with sterile demineralized water (Figure 1 C2). The tissue pieces were placed on interfolded paper towels for 24 h for dry out to reduce bacterial growth. The rest of internal tissue was disinfested in beakers using the previously mentioned procedure to be later macerated. This process was performed independently per each offset.

For maceration, an industrial blender was used (Blendtec®, model TB-621-26) at 3000 rpm for 30 s. The macerated was poured in a beaker using a plastic mesh (0.5 x 0.5 cm opening) to remove bagasse, and a 50 mL sample was taken in sterile Falcon tubes. The samples were left to sediment for approximately 2-3 h to obtain supernatant (Figure 1 D1-D5). This was selected over the solid phase due to the abundant colonies growth in preliminary tests.

Five pieces of each type of tissue (neck, 'piña', and leave-base and bud-base) were placed independently in Petri dishes containing Komada medium (Leslie and Summerell, 2006). Similarly, 100 µL of the supernatant obtained from maceration were distributed in Petri dishes with Komada medium. A total of five Petri dishes per offset were obtained (four of tissues and one of supernatant) (Halfeld-Vieria and Nechet, 2005). The Petri dishes were incubated at room temperature for seven days and then Colony Forming Units (CFU) were counted and the *Fusarium* index was estimated (López-Bautista *et al.*, 2020)..



El macerado se realizó en una licuadora industrial (Blendtec®, modelo TB-621-26) a 3 mil revoluciones durante 30 s. El macerado se vertió en un vaso de precipitado a través de una malla plástica (abertura 0.5 x 0.5 cm) con la finalidad de eliminar el bagazo, se homogenizó y se tomó una muestra de 50 mL en tubos Falcon estériles. Las muestras reposaron durante 2-3 h aproximadamente, para obtener el sobrenadante (Figura 1 D1-D5). Este último se eligió debido a que presentó el mayor crecimiento de colonias en pruebas preliminares, en las cuales también se probó bagazo y precipitado de la muestra homogénea.

En diferentes cajas de Petri con medio de cultivo Komada, se sembraron cinco trozos de cada tipo de tejido (cuello, piña, base de las hojas y base del cogollo) (Leslie y Summerell, 2006). Similarmente, 100 µL del sobrenadante resultado del macerado, se distribuyeron en caja de Petri con medio Komada. En total se obtuvieron cinco cajas de Petri por hijuelo (cuatro de tejido y uno de sobrenadante) (Halfeld-Vieria y Nechet, 2005). Las siembras se incubaron a temperatura ambiente por siete días y posteriormente se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se calculó el índice de *Fusarium* (López-Bautista *et al.*, 2020).

#### **Extracción de ADN, PCR y análisis filogenético.**

Se empleó el gen EF-1a, previamente identificados por su consistencia con especies de *Fusarium* en agave azul y otros sistemas (O'Donnell *et al.*, 2015; López-Bautista *et al.*, 2020). La extracción se realizó con el protocolo AP modificado (SDS 1%) (Green y Sambrook, 2012). Se cuantificó y determinó la calidad del ADN por espectrofotometría con Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente se ajustó a 40 ng µL<sup>-1</sup>. Para PCR el volumen final del mix de reacción fue de 25 µL [1X de buffer de PCR (10X), 1.6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM de desoxinucleótidos trifosfato

#### **DNA extraction, PCR, and phylogenetic analysis.**

The EF-1a gene was used for DNA extraction; this gene has been previously identified because of its consistency with *Fusarium* species in blue agave and other systems (O'Donnell *et al.*, 2015; López-Bautista *et al.*, 2020). Extraction was carried out following the AP protocol with modifications (SDS 1%) (Green and Sambrook, 2012). The DNA quality was quantified and determined using a Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), which was previously adjusted to 40 ng µL<sup>-1</sup>. For PCR, the final volume of the reaction mixture was of 25 µL [1X of PCR buffer (10X), 1.6 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 200 nM of each primer, EF1\* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2\* (5'-GGA DGT ACC AGT RAT CAT G), 0.5 U of Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), and 2.5 µl of DNA (40 ng µL<sup>-1</sup>). A T-100 thermocycler from BioRad was used. The thermocycler program consisted in an initial denaturation at 94 °C for 5 min and 30 denaturation cycles at 94 °C for 30 s, alignments at 58 °C for 40 s, extension at 72 °C for 55 s and a final extension at 72 °C for 7 min. The amplified fragments were analyzed in 1.5% agarose gel and TBE 1X. Each gel deposit was loaded with 4 µL of the PCR product and 4 µL of load buffer (PROMEGA). The molecular weight marker (MMP) 1KB plus from Invitrogen was used with 1.5 µL+4 µL buffer. Bands of 760 bp were visualized with ethidium bromide and UV light. The corresponding PCR product was sequenced by Macrogen Inc. from Korea.

The amplicon sequences were edited with the SeqAssem program (v07/2008) and blasted at the GenBank for preliminary identification and to obtain reference sequences for phylogenetic analyses. For alignments, the MEGA X program (v10.1.8) was used with the ClustalW algorithm. The phylogenetic relation was established using the *maximum likelihood* model of the General Time

(dNTP's), 200 nM de cada iniciador, EF1\* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2\* (5'-GGA DGT ACC AGT RAT CAT G), 0.5 U de Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5 µl de ADN (40 ng µL<sup>-1</sup>). Se utilizó el termociclador T-100 de BioRad. El programa de termociclaje consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 55 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y TBE 1X. Cada depósito del gel se cargó con 4 µL del producto de PCR y 4 µL de buffer de carga (PROMEGA). Se usó el marcador de peso molecular (MMP) 1KB plus de Invitrogen con 1.5 µL+4 µL buffer. Las bandas de 760 pb se visualizaron con bromuro de etidio y luz UV. El producto de PCR respectivo se secuenció con el servicio comercial de Macrogen Inc., Korea.

Las secuencias de los aislados se editaron en el programa SeqAssem (v07/2008) y se blastearon en GenBank para una identificación previa y la obtención de secuencias de referencia para análisis filogenético. En el programa MEGA X (v10.1.8) se realizaron los alineamientos utilizando el algoritmo ClustalW. Se construyó la relación filogenética con el modelo de *máxima verosimilitud* del *General Time Reversible Model (GTR) + Gama Distributed With Invariant (G+I)* con 1000 repeticiones *Bootstrap*.

## RESULTADOS

**Validación del método de muestreo.** El método CIFUSAG se validó con diferentes herramientas y métodos en 2018 para estandarización del proceso descrito en la Figura 2. La revisión exhaustiva sugiere que en la actualidad, no existen trabajos re-

versible Model (GTR) + Gama Distributed With Invariant (G+I) with 1000 Bootstrap replications.

## RESULTS

**Validation of the sampling method.** The CIFUSAG method was validated with different tools and methods in 2018 to standardize the process described in Figure 2. A thorough review suggests that, up until now, there are no reports of studies of agave or similar crops to quantify *Fusarium* spp. in propagating material, such as offsets, corms or bulbs. For external washing in the field, the use of brushes helped remove most of the soil and tissue adhered to the offset base, which includes the neck and leaves base; the modified drill added with a paint-mixture tool was also a useful method in sites where sandy soils prevail and the obtained sample was limited to 5-15 g of soil, unlike plantations with clay soils where up to 30 g of soil were collected. The CFU per plate reached an average of 129 total fungi colonies (Min=3, Máx=422) and six *Fusarium* colonies (Min=0, Máx=269).

Washing and removal the external green tissue of 'piñas' for the internal tissue and macerated processing in the laboratory prevent contamination and ensure that only internalized organisms are grown. In addition, maceration and mother dilution used for plating to obtain IIL ensured a greater number of CFU of total fungi (TF) (4 617), of which 22.5% (1 038) belonged to *Fusarium* spp. Colonies (Fsp). Thus CIFUSAG allowed CFU of TF and Fsp, enabling their analysis for management and control of this and other pathogenic organisms present in the crop.

**Colony forming units by region in external tissue.** The analysis of subdivided plots did not show effects on the large-intermediate and small plot interaction (Tukey  $p>0.05$ ) and, therefore, they

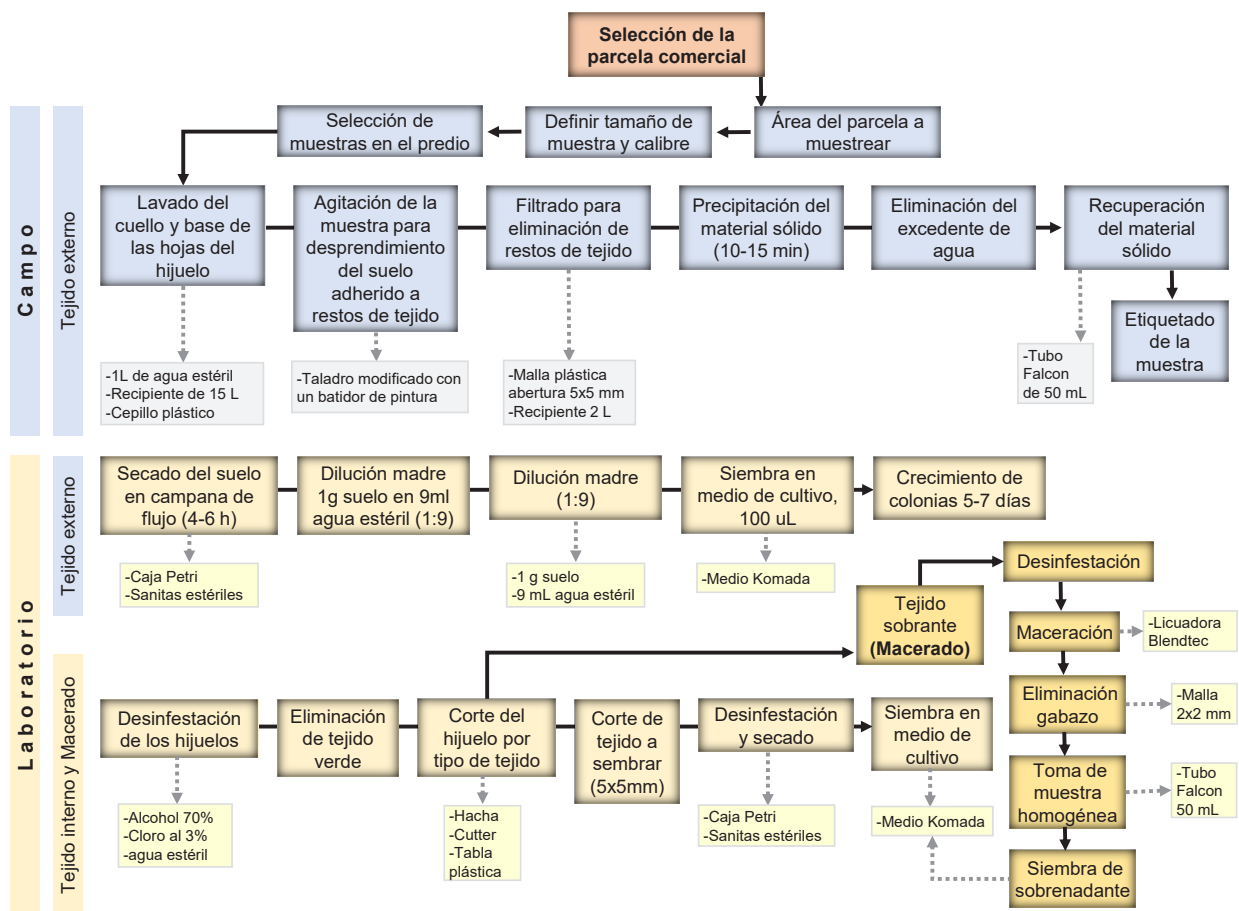


Figura 2. Esquemización del método CIFUSAG desarrollado para estimar carga de inóculo de *Fusarium* spp. a partir de hijuelos de *A. tequilana* con fases de campo y laboratorio. Las muestras incluyeron lavado basal, secciones de tejido interno y macerado total del hijuelo.

Figure 2. Scheme of the CIFUSAG method developed to estimate the *Fusarium* spp. inoculum load using *A. tequilana* offsets with field and laboratory phases. Samples included basal washing, internal tissue sections and total maceration of the offset.

portados en agave o cultivos similares que permita la cuantificación de *Fusarium* spp. en estructuras propagativas como hijuelos, cormos, bulbos u otros mediante métodos análogos. En lavado externo en campo el uso de cepillos permitió mayor desprendimiento del suelo y tejido adherido a la base del hijuelo conformado por el cuello y base de las hojas, así como el taladro modificado con un mezclador de pintura, resultaron un método útil para zonas con suelos arenosos donde la muestra obtenida es solamente de 5-15 g de suelo, contrastante

were individually analyzed. Overall, the *Fusarium* index  $[(FI) = (\sum F_{sp}) / (\sum HT)]$  showed differences by region and year. At regional level, in 2018 and 2019, the South region had lower epidemic inductivity level compared to the other regions, but its IF was statistically higher (0.5-0.7) compared to that of Los Altos (0.3-0.4) and Valley regions (0.2) (Tukey  $p < 0.05$ ) (Figure 3A).

In external tissue, the *Fusarium* CFU was statistically different ( $p < 0.05$ ) *inter*-regions for 2018, but not in 2019, despite the double of CFU

con predios arcillosos donde alcanzó los 30 g. Las UFC de éstas muestras alcanzaron un promedio de 129 (Min=3, Máx=422) colonias de hongos totales por siembra y *Fusarium* en seis colonias (Min=0, Máx=269) promedio.

En tejido interno y macerado en laboratorio el lavado y eliminación del tejido verde externo de la piña del hijuelo evita contaminaciones y asegura la siembra de únicamente organismos internalizados. Además, la maceración y siembra de dilución madre para la obtención de CII aseguró un alto número de UFC de HT (4 617) de los cuales el 22.5% (1 038) perteneció a colonias de *Fusarium* spp. Conclusivamente el método CIFUSAG asegura altos crecimientos de HT y UFC de Fsp, permitiendo realizar análisis para el manejo y control adecuado de éste u otros organismos patógenos presente en el cultivo.

**Comportamiento de unidades formadoras de colonias por región en tejido externo.** El análisis de parcelas subdivididas no mostró efectos en la interacción de parcela grande, mediana y chica (Tukey  $p>0.05$ ), por lo que se analizaron de forma independiente. En general el índice de *Fusarium* [(IF) =  $(\sum F_{sp}) / (\sum HT)$ ] presentó diferencia por región y año. A nivel regional en 2018-2019 Sur reporta nivel de inductividad más bajo con respecto a otras regiones, sin embargo, el IF fue estadísticamente mayor (0.5-0.7) respecto a Los Altos (0.3-0.4) y Valles (0.2) (Tukey  $p<0.05$ ) (Figura 3A).

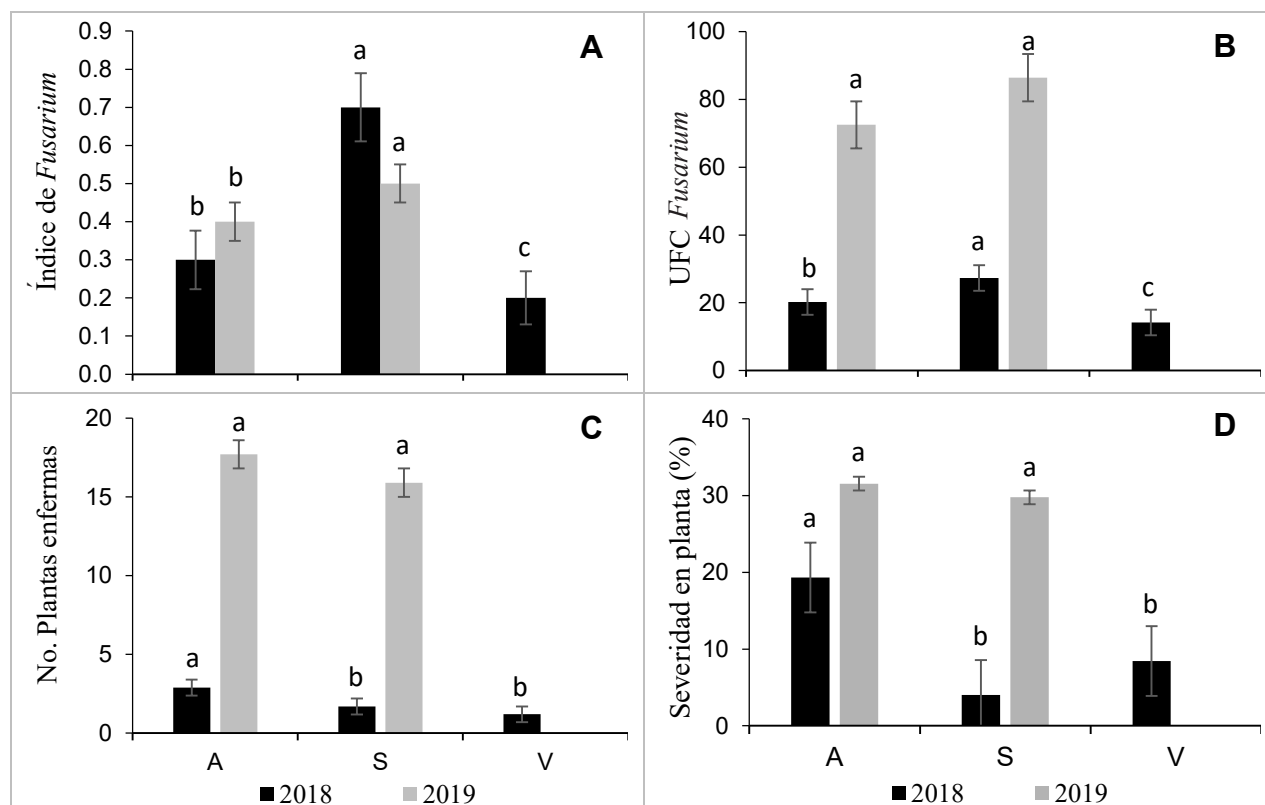
En tejido externo, UFC *Fusarium* fue estadísticamente diferente ( $p<0.05$ ) *inter*-regiones para 2018, pero no así en 2019 a pesar que contabilizó el doble de UFC para las dos regiones (Figura 3B). Las plantas enfermas en 2018 reportaron menos de cinco plantas enfermas promedio por parcela comercial y 2019 entre 15-20 plantas con marchitez (Figura 3C). Por su parte, el porcentaje de severidad en planta de 2018 fue de 4.0-19.32%

obtaind in the two regions (Figure 3B). The diseased plants in 2018 were less than five, in average, per assessed plot whereas in 2019, 15-20 plants showed SMAP with predominance of wilt symptoms (Figure 3C). The range percent of plant disease severity was 4.0-19.32% in 2018 being statistically different in Los Altos compared to that of the South and Valley regions ( $p<0.05$ ), while in 2019 the disease severity ranged 29-31% in Los Altos and South regions with not statistical difference (Figure 3D).

Overall, the analyses of variance did not show significant interaction effects of base-size offset with region in 2018 and 2019 for CFU and *Fusarium* index (FI) ( $p>0.05$ ) (Figure 4B, C and D), but there were differences in CFU of other fungi ( $p<0.05$ ), mainly in offset samples collected in 2019, where Grapefruit base-size had the greatest average of CFU (107.1) (Figure 4A).

These results suggest that there is a significant diversity in the amount of fungi per region and base-size offsets. Although the pathogenic capacity per regional epidemic inductivity was not known in *Fusarium*, through the analysis conducted it can be inferred that there is a higher risk when offsets are mobilized.

**Colony forming units per region in internal and macerated tissue.** Initial preliminary tests were done for macerated tissue. The results showed that the supernatant, from a homogeneous sample, had the greatest amount of CFU of total fungi and *Fusarium*, especially in selective culture medium, with 62% of total colonies. The CFUs were greater in plantation with moderate inductivity in Tepatitlán, with a total counting of 378 ( $min=0$ ,  $máx= 42$ ,  $std=59.5$  / plate), followed by Zapotlanejo with 206 ( $min=0$ ,  $máx= 32$ ,  $std=31.2$  / plate). The plantation with lower inductivity in the South region, corresponding to Tuxcacuesco, was



**Figura 3.** Carga de inóculo de *Fusarium* spp. en tejido externo (lavado) de hijuelos, número de plantas enfermas y severidad de planta madre con síndrome de marchitez y pudrición seca del cogollo en Los Altos (A), Sur (S) y Valles (V) de Jalisco en 2018 y 2019. A) índice de *Fusarium* spp., B) Unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp. C) Plantas enfermas, D) Porcentaje de severidad en planta. Al menos una letra en común por año son estadísticamente iguales (Tukey  $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** *Fusarium* spp. inoculum load in offsets external tissue (washing), number of infected plants and severity in mother plants with wilt and dry bud rot syndrome in Los Altos (A), South (S) and Vally regions (V) of Jalisco in 2018 and 2019. A) *Fusarium* spp. Index; B) *Fusarium* spp. colony forming units; C) Infected plants; D) Percent of disease severity in plants. At least one letter in common per year is statistically equal (Tukey  $p < 0.05$ ).

y estadísticamente diferente principalmente en Altos respecto a Sur y Valles ( $p < 0.05$ ); mientras que en 2019 con severidad de 29-31% Altos y Sur no fueron diferentes (Figura 3D).

En general los análisis varianza no mostraron efecto de interacción calibre+región en 2018 y 2019 para UFC e índice de *Fusarium* ( $p > 0.05$ ) (Figura 4B, C y D), pero si presentó diferencias en UFC de otros hongos ( $p < 0.05$ ) principalmente para muestras de hijuelo de 2019, siendo calibre Toronja el tamaño con promedio mayor UFC de otros hongos (107.1) (Figura 4A).

ranked third regarding *Fusarium* CFU with 188 total counting ( $min=0$ ,  $max=37$ ,  $std=61.8$  / plate). The samples of Cañadas de Obregón plantation, with lower inductivity, in did not produced *Fusarium* colonies, a fact that could be attributed to the seasonal climatic conditions, where frosts were registered during the experiment. The offset weight, which was of 158 g in average, the lowest of all the plantations in Los Altos region, could also support the effect of the cold stress.

The *Fusarium* inoculum load in internal tissue compared to the inoculum load in external tissue



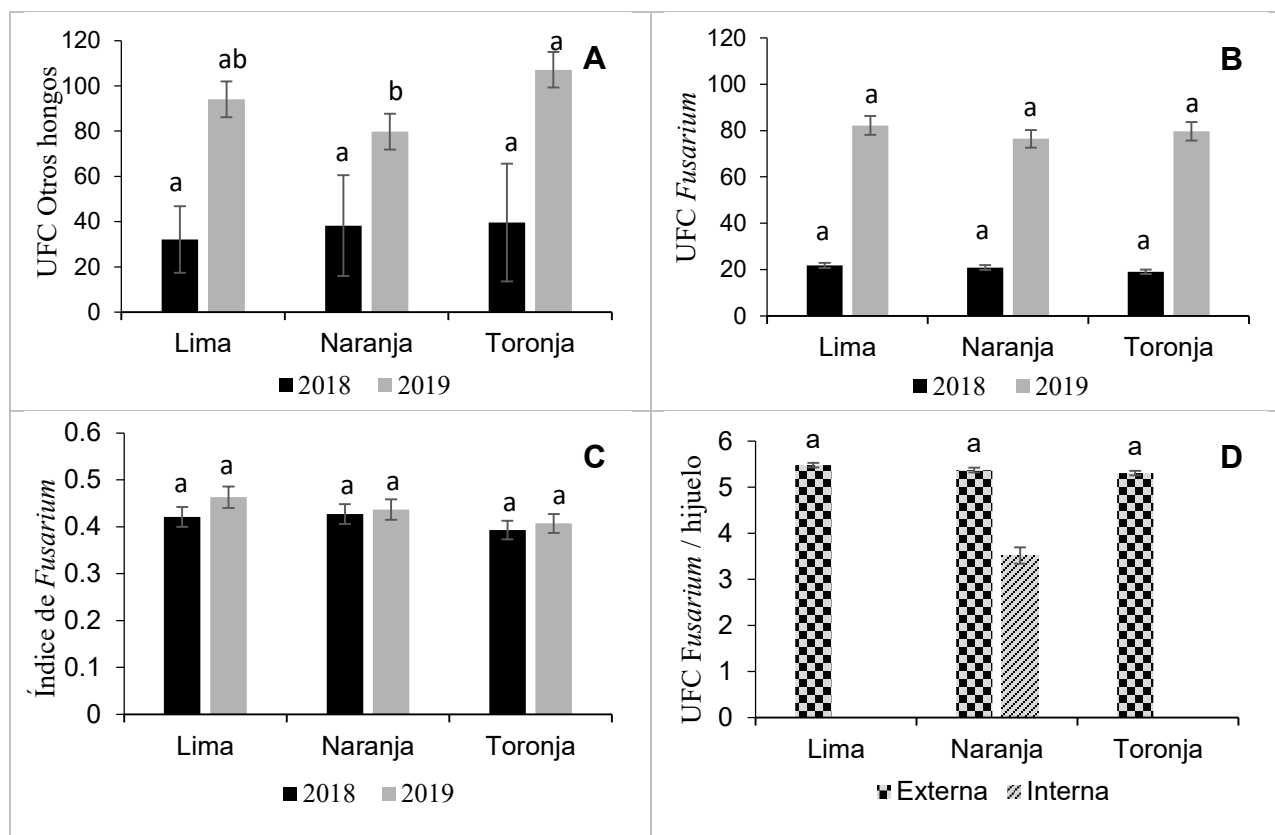


Figura 4. Carga de inóculo por calibre Lima, Naranja y Toronja de hijuelos de agave en experimentos 2018 y 2019. A) Unidades formadoras de colonia (UFC) de otros hongos, B) UFC *Fusarium* spp., C) Índice de *Fusarium* spp. y D) UFC de *Fusarium*/hijuelo por tipo de tejido externo o interno y calibre de hijuelos. Lima y Toronja sin datos. Al menos una letra en común por año (A-C) o entre tejido externo (D) son estadísticamente iguales (Tukey  $p<0.05$ ).

Figure 4. Inoculum load per Lime, Orange and Grapefruit base-size of agave offsets in experiments conducted in 2018 and 2019. A) Colony forming units (CFU) of other fungi; B) *Fusarium* spp. CFU; C) *Fusarium* spp. index; and D) *Fusarium*/offset per type of external or internal tissue and offsets base-size. Lime and Grapefruit base-size without data. At least one letter in common per year (A-C) or among external issue (D) are statistically equal (Tukey  $p<0.05$ ).

Esto sugiere diversidad significativa en la cantidad de hongos por región y calibre. En *Fusarium* a pesar de no conocer la capacidad patogénica por inductividad regional, a través de los análisis se infiere un riesgo mayor en la movilización de hijuelos.

**Unidades formadoras de colonias por región en tejido interno y macerado.** En tejido macerado se realizaron pruebas preliminares iniciales. Los resultados mostraron que el sobrenadante, a partir de una muestra homogénea, presentó la mayor canti-

per offset was lower (3.52 CFU) in Orange base-size. The inoculum load in external tissue was similar among base-size offsets. Orange base-size had a 5.37 CFU average. These results suggest a higher dispersion of *Fusarium* through external tissue. However, the CFU found internally are not to different so it may require both a systemic and contact product that help reduce the offset inoculum load (Figure 4D).

In internal tissue, *Fusarium* colonies had a significantly different behavior with 75% of total

dad de hongos totales y *Fusarium*, principalmente en el medio de cultivo selectivo, con un 62% de crecimientos totales. Las UFC fueron mayor en la parcela de moderada inductividad de Tepatitlán con valor total de 378 ( $min=0$ ,  $máx=42$ ,  $std=59.5$ ), seguido de Zapotlanejo con 206 ( $min=0$ ,  $máx=32$ ,  $std=31.2$ ). El predio de baja inductividad de la región sur, correspondiente a Tuxcacuesco, obtuvo el tercer lugar en UFC de *Fusarium* con 188 ( $min=0$ ,  $máx=37$ ,  $std=61.8$ ). El predio de baja inductividad de Cañadas de obregón no presentó crecimientos de *Fusarium*, esto podría atribuirse a las condiciones climáticas de la temporada invernal, donde reportaron heladas (comunicación personal). El peso del hijuelo también podría respaldar el efecto de éste estrés, encontrándose en un promedio de 158 g, el más bajo de todos los predios de la región altos.

La carga de inóculo en tejido interno respecto al externo, en calibre Naranja y a nivel de hijuelos independientes fue menor (3.52 UFC). La carga de inóculo en tejido externo fue similar entre calibres, siendo en Naranja el tamaño que obtuvo un crecimiento promedio de 5.37 UFC. Estos resultados sugieren un mayor riesgo de dispersión de *Fusarium* por tejido externo. Sin embargo, las UFC encontradas de manera interna no son tan distantes del anterior, por lo que se sugieren un control sistémico y de contacto que ayude a reducir las cargas de inóculo presentes en los hijuelos (Figura 4D).

En tejido interno los crecimientos de *Fusarium* se comportaron significativamente diferente. En la base de las hojas se encontró el 75% de las cepas totales, con una mínima, por parcela, de 18 y máxima de 51. Le siguió el tejido de la base del cogollo (15%), piña (8%), y finalmente cuello (2%). Esto sugiere una posible especialización en tejidos a nivel de hijuelo, como lo reportado por López-Bautista *et al.* (2020), donde se reportan cepas diferentes de *Fusarium* en tejido aéreo y raíces y suelo. Así mismo estos datos sugieren que no existe un

isolates found in the leaf base, with a minimum of 18, and a maximum of 51 per plantation, followed by bud base (15%), 'piña' (8%) and neck (2%). This suggests a possible *Fusarium* species tissue specialization at offset level, as reported by López-Bautista *et al.* (2020), where different *Fusarium* isolates were reported in aerial tissue, roots and soil. These data also suggest that there is not ascendant fungus movement from the neck to exposed aerial tissue as leaves but rather there are multiple entrance ways.

**Molecular identification and phylogeny.** From 30 offsets used to obtain *Fusarium* isolates in internal and external tissue, 16 and seven isolates were collected respectively. Basal leaves represented 56% of the total, followed by neck (19%), bud (12.5%) and 'piña' (12.5%). The phylogenetic analysis of the amplicon sequences with the EF-1a gene determined the presence of three *Fusarium* binomial species belonging to different complexes; *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides* (FFSC), *F. solani* (FSSC), two phylogenetic species previously associated with adult plants (FIESC 9, FIESC 12) and one that was not identified also associated with adult plants (*Fusarium* 2-Agave) (López-Bautista *et al.*, 2020) (Table 2).

The *Fusarium* FOSC and FFSC complexes were found in both tissues (internal and external), while FSSC was isolated only from internal tissue and FIESC# on external tissue. The leaf base had the greatest diversity and number of species: *F. verticillioides* (five), *F. oxysporum* (two) and *F. solani* (two). In bud, only *F. oxysporum* (one) and *F. solani* (one) were found, whereas in neck, *F. oxysporum* was consistent (three). However, in 'piña' tissue, the two sequences were aligned with a maximum of 97% identity with a *Fusarium* sp. species of the GenBank but had 99.7-100% identity with the non-identified species *Fusarium* 2-agave

movimiento ascendente de cuello a tejido aéreo expuesto como las hojas, sino que existen múltiples vías de entrada.

**Identificación molecular y filogenia.** De los 30 hijuelos utilizados para aislamientos de *Fusarium* en tejido interno y externo se obtuvieron 23 cepas, 16 y siete respectivamente. En *Ti* de la Base de hojas se obtuvo el 56% del total, seguido de tejido de cuello (19%), Cogollo (12.5%) y Piña (12.5%). El análisis filogenético de las secuencias con el gen EF-1a determinó la presencia de tres especies binomiales de *Fusarium* pertenecientes a complejos diferentes; *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides* (FFSC), *F. solani* (FSSC), dos especies filogenéticas asociadas a planta madre; FIESC 9, FIESC 12 y una sin identificar; *Fusarium* 2-Agave, reportado por López-Bautista *et al.*, 2020 (Cuadro 2).

Los complejos de *Fusarium* FOSC y FFSC se encontraron en ambos tejidos (interno y externo), mientras que FSSC sólo se aisló de tejido interno y FIESC de tejido externo. En *Ti*, *Bh* mostró la mayor diversidad y cantidad de especies; *F. verticillioides* (cinco), *F. oxysporum* (dos) y *F. solani* (dos). En Cogollo sólo se encontró a *F. oxysporum* (uno) y *F. solani* (uno), mientras que Cuello fue específico a *F. oxysporum* (tres). Sin embargo, en tejido de Piña las dos secuencias se alinearon con un máximo de 97% de identidad a especies de *Fusarium* sp. del GenBank, pero de 99.7-100% con la especie sin identificar *Fusarium* 2-agave, de planta adulta de *A. tequilana*. En tejido externo se encontró a *F. verticillioides* y *F. oxysporum*. El análisis filogenético con el gen EF-1a mostró la agrupación por complejo con un soporte estadístico mayor a 96% y por especie a 80%. También se observó la variabilidad entre clados, principalmente en los complejos FIESC y FSSC, donde se encuentran las especies filogenéticas y sin identificar de *Fusarium* spp. (Figura 5).

from *A. tequilana* adult plants. *F. verticillioides* and *F. oxysporum* were found in external tissue. The phylogenetic analysis using the EF-1a gene showed groups by complex with a statistical support higher than 96% and of 80% by species. Variability was also observed on clades, especially in the FIESC and FSSC complexes, where *Fusarium* spp. phylogenetic and non-identified species are placed (Figure 5).

## DISCUSSION

The wilt and dry rot bud syndrome (SMAP) in *A. tequilana* represents one of the greatest challenges in blue agave production in DOT areas. The investigative work with this disease, which is caused by a complex of *Fusarium* species, is limited and mainly focused on commercial plantations with adult plants exhibiting the syndrome due to productive stress predisposition (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). Usually, this type of plantations, between 3-4 years-old, can be used as a source of offsets to establish new plantations, a fact that rise key phytosanitary questions because of the close relation among mother plant-offset-soil. Under this rational framework, this study provides three lines of knowledge: **1).** Development and validation of a field and laboratory methodology, named as CIFUSAG (acronym of *Carga de Inóculo Fusarium en Agave*), to estimate the *Fusarium* spp. inoculum load, external and internalized in offsets; **2).** Demonstrates the existence of differential inoculum load with strong regional effect; **3).** Provides etiological basis by showing associative evidence of a complex of *Fusarium* species with offsets, both at external and internal tissue level.

The regional coverage of 14 municipalities in Jalisco with two years field data, a total of

**Cuadro 2. Identificación molecular PCR de 23 aislados de *Fusarium* obtenidos de 30 hijuelos en 2018 por fuente de aislamiento utilizando el gen EF-1a.**  
**Table 2. PCR molecular identification of 23 *Fusarium* isolates of 30 offsets in 2018 through source isolation using the EF-1a gene.**

| Fuente de aislamiento | Especie/Complejo                 | ID aislado                  | %Identidad | Secuencia Referencia |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------|----------------------|
| Base de la hoja       | <i>F. verticillioides</i> [FOSC] | NF2bh                       | 100        | MH582325             |
|                       |                                  | NF3bh                       | 99.70      | MH582331             |
|                       |                                  | NF4bh                       | 99.85      | MH582331             |
|                       |                                  | PF1bh                       | 99.41      | JF740737             |
|                       |                                  | PF8bh                       | 100        | MH582325             |
|                       | <i>F. oxysporum</i> [FOSC]       | LF6bh                       | 99.23      | AF008497             |
|                       |                                  | PF7bh                       | 99.39      | AF008497             |
|                       |                                  | LF5bh                       | 99.85      | JF740774             |
|                       | <i>F. solani</i> [FSSC]          | NF21bh                      | 99.86      | JF740846             |
|                       |                                  | LF9b                        | 99.23      | AF008497             |
| Cuello                | <i>F. oxysporum</i> [FOSC]       | NF10b                       | 100        | AF246837             |
|                       |                                  | PF11b                       | 99.85      | JF740855             |
|                       |                                  | NF12cb                      | 99.85      | AF008497             |
| Cogollo               | <i>F. solani</i> [FSSC]          | NF22ca                      | 99.86      | JF740846             |
|                       | <i>Fusarium</i> sp. [FSSC]       | PF23d                       | -          | -                    |
| Piña                  | <i>Fusarium</i> sp. [FSSC]       | PF24d                       | -          | -                    |
|                       | <i>F. verticillioides</i> [FOSC] | PF17s                       | 99.85      | MH582325             |
| PF19s                 |                                  | 100                         | MH582325   |                      |
| NF13s                 |                                  | 99.54                       | AF008497   |                      |
| PF20s                 |                                  | 99.85                       | AF008497   |                      |
| LF14s                 |                                  | 97.92                       | MH582434   |                      |
| Tejido externo        | <i>F. oxysporum</i> [FOSC]       | NF16s                       | -          | -                    |
|                       |                                  | NF18s                       | 97.73      | MH582433             |
|                       |                                  | <i>Fusarium</i> sp. [FIESC] |            |                      |

## DISCUSION

El síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP) en *A. tequilana* representa uno de los principales retos en la producción de agave azul en la DOT. Los trabajos de investigación con esta enfermedad, causada por un complejo de especies de *Fusarium*, son limitados y enfocados principalmente a plantaciones comerciales con plantas adultas que exhiben el síndrome por predisposición del estrés productivo (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). Comúnmente este tipo de plantaciones, entre

7055 offsets tested and 46 656 fungal colonies counted, support the inoculum load results and proof the CIFUSAG methodology applicability. Conversely, the molecular characterization was limited to *Fusarium* isolates obtained from 30 offsets collected at a high inductivity plantations in Los Altos. Interestingly, the composition and diversity of the species complex found was analogous to the one found by López-Bautista and associates (López-Bautista *et al.*, 2020). However, it is necessary to expand the studies of molecular characterization, with greater regional coverage, including other genes in addition to the elongation

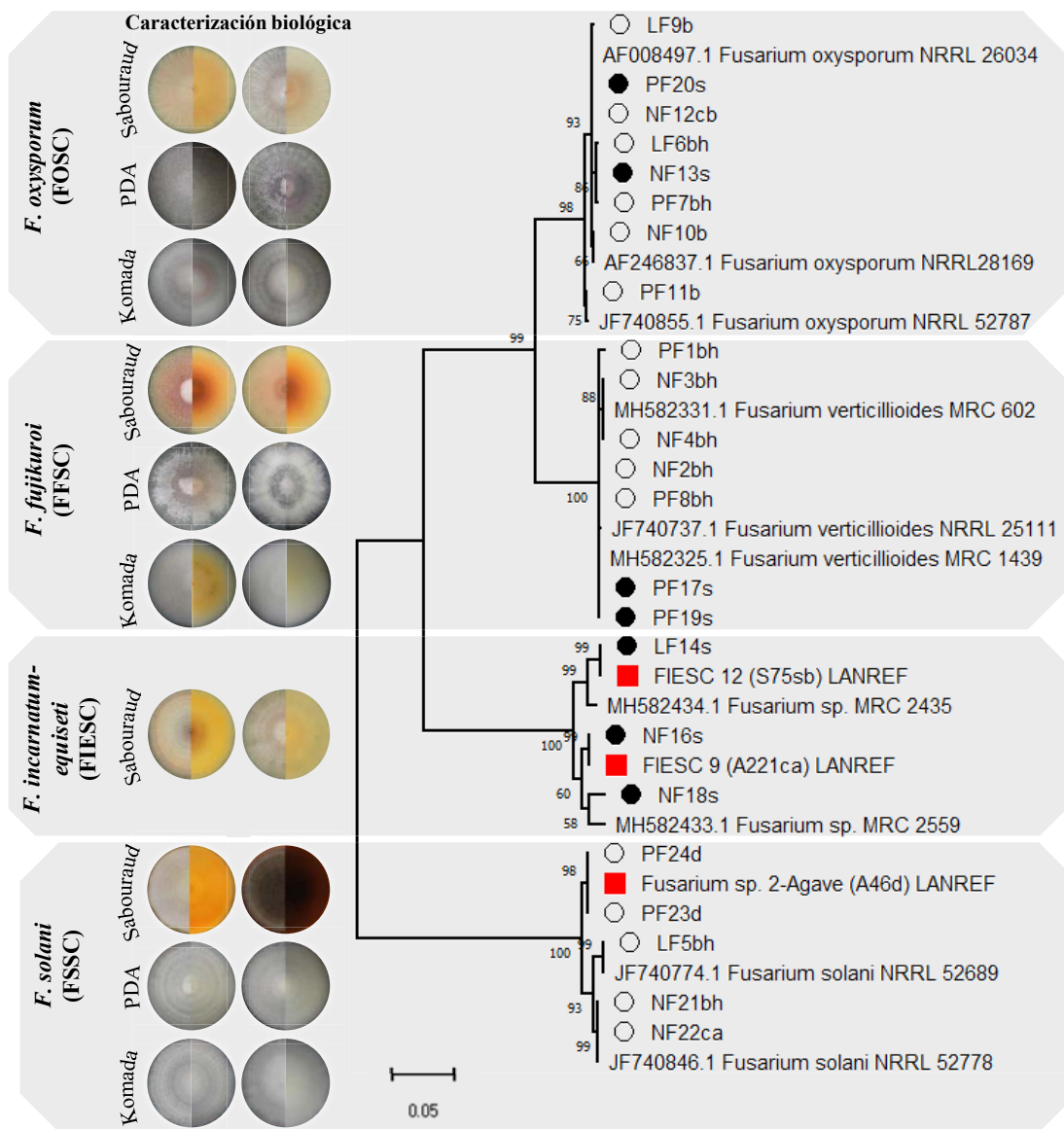


Figura 5. Filogenia de 23 cepas de *Fusarium* spp. asociadas a tejido externo (lavado) e interno de hijuelos de *Agave tequilana* basada en el gen EF-1a, máxima verosimilitud y *general time reversible model* (GTR) + *gama distributed with invariant* (G+I), con 1000 repeticiones *bootstrap*. Viñeta negra indica cepas de suelo, viñeta blanca cepas de tejido interno, en rojo especies filogenéticas y sin identificar de planta adulta de *A. tequilana* reportada por López-Bautista *et al.*, 2020. El resto, sin marcas, son secuencia de referencia del GenBank.

Figure 5. Phylogeny of 23 *Fusarium* spp. isolates associated with external (washing) and internal tissue of *Agave tequilana* offsets based on the EF-1a gene, maximum likelihood, and general time reversible model (GTR) + gamma distributed with invariant (G+I), with 1000 bootstrap replications. The black bullet indicates isolates from external tissue; the white indicates isolates from internal tissue; the red are the phylogenetic species and the non-identified species of *A. tequilana* adult plants (López-Bautista *et al.*, 2020). The rest, non-marked, are reference sequences from the GenBank.



3-4 años de edad, pueden ser empleadas como proveedoras de hijuelos para establecer nuevas plantaciones, lo cual impone interrogantes fitosanitarios por la estrecha relación planta madre-hijuelo-suelo. Con este marco racional, este trabajo aporta tres líneas de conocimiento: **1)** Desarrollo y validación de una metodología de campo y laboratorio, denominado CIFUSAG (acrónimo de *Carga de Inóculo Fusarium en Agave*), para estimar la carga de inóculo de *Fusarium* spp. externo e internalizado en hijuelos; **2)** Demuestra la existencia de carga de inóculo diferencial con fuerte efecto regional; y **3)** Aporta bases etiológicas presentando evidencias asociativas de un complejo de especies de *Fusarium* con hijuelos tanto a nivel externo como a nivel de tejido interno.

La cobertura regional de 14 municipios de Jalisco y dos años de investigación con un total 7055 hijuelos y 46 656 colonias fungosas proporcionan buen soporte a los resultados de carga de inóculo y prueban la aplicabilidad de la metodología CIFUSAG. En contraste, la caracterización molecular se limitó a la población de *Fusarium* obtenida de 30 hijuelos de un predio de alta inductividad de Los Altos. Interesantemente, la composición y diversidad del complejo de especies encontrado fue análogo al encontrado por López-Bautista y colaboradores (López-Bautista *et al.*, 2020). Sin embargo, es necesario ampliar los estudios de caracterización molecular con mayor cobertura regional y con otros genes adicionales al factor de elongación empleado en este trabajo. De particular interés son las especies de *Fusarium* con capacidad de internalización ya que pueden ser diseminadas con mayor eficiencia y representar un mayor reto de control. Sistemas productivos similares a agave, respecto al uso de material propagativo asociado con *Fusarium* spp. se ha reportado en cultivos como *Musa paradisiaca* (Bermúdez, 2014), *Tulipa* sp. (Bergman and Bekker, 1978) y *Aloe vera* (Avasthi *et al.*, 2018).

factor used in this study. Of particular interest are the *Fusarium* species with internalization capacity because they can be more efficiently disseminated and may represent a greater control challenge. Productive systems similar to agave, regarding the use of propagative material associated with *Fusarium* spp. have been reported in crops such as *Musa paradisiaca* (Bermúdez, 2014), *Tulipa* sp. (Bergman and Bekker, 1978) and *Aloe vera* (Avasthi *et al.*, 2018). However, in general, a qualitative association with *Fusarium* is reported without any estimation of inoculum loads to establish actionability criteria with preventive purposes. Similarly, the studies of taxonomic diversity are usually limited to identify the species or race of interest.

With more than 96 million *A. tequilana* offsets planted between 2018 and 2019, this is the main propagation approach and therefore represents a potential pathway for *Fusarium* spp mobilization, and possibly of other pests, due to operational, agronomic and/or phytosanitary restrictions of other multiplication strategies such as botanical seed or *in vitro* culture. In this context, the results of this research address the importance to improve our understanding of the offset role in the productive sustainability of a region with designation of origin and limited margin for land expansion. It has been widely documented that *Fusarium* exhibits several adaptation strategies to ensure its establishment and parasitic fitness once settled in a new agroecological niche. A recent example of this is *F. oxysporum* f. sp. *cubence* Race 4 Tropical (FOCR4T), with effective mobilization paths and adaptation to most soils where banana is cultivated in the world (Bermúdez, 2014). Similarly, it has been postulated based on phylogenetic and structural studies that *Fusarium* can go through divergent-convergent evolution processes in *A. tequilana* and other crops (Liew *et*

Sin embargo, en general se reporta la asociación cualitativa de *Fusarium* sin estimar cargas de inóculo que permitan establecer criterios de accionabilidad con propósitos preventivos. Similarmente, estudios de diversidad taxonómica están generalmente acotados a la identificación de la especie o raza de interés.

Con más de 96 millones de hijuelos de *A. tequilana* plantados entre 2018 y 2019, este es el principal medio de propagación y por tanto de movilización potencial de *Fusarium* spp. y posiblemente de otras plagas, debido a restricciones operativas, agronómicas y/o fitosanitarias del empleo de semilla botánica o del cultivo *in vitro*. En este contexto, los resultados de esta investigación obligan a profundizar en la comprensión del rol del hijuelo en la sostenibilidad productiva de una región con denominación de origen y limitado margen de expansión territorial. Está ampliamente documentado que *Fusarium* exhibe diversidad de estrategias adaptativas que garantizan su establecimiento y éxito parasítico una vez introducido en un nuevo nicho agroecológico. Un ejemplo reciente lo representa *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (FOCR4T) con efectiva movilización y adaptación a suelos bananeros del mundo (Bermúdez, 2014). Similarmente se ha postulado, con base en estudios poblacionales filogenéticos y estructurales que *Fusarium* puede presentar procesos evolutivos divergentes-convergentes en *A. tequilana* y otros cultivos (Liew *et al.*, 2016; López-Bautista *et al.*, 2020). El síndrome SMAP en planta adulta es justamente una evidencia de la capacidad parasítica adaptativa de *Fusarium* spp. en la cual el hijuelo puede tener una implicación importante al movilizar haplotipos de diferentes especies del hongo propiciando cambios dinámicos en la estructura de prevalencia regional.

La experiencia mundial en el manejo de *Fusarium* evidencia que la prevención es la estrategia

*al.*, 2016; López-Bautista *et al.*, 2020). The SMAP syndrome in adult plants is a clear evidence of the adaptive and parasitic capacity of *Fusarium* spp., where offsets may have an important implication by moving haplotypes of different species of this fungus, thus favoring dynamic changes of the prevailing prevalence structure at regional level.

Worldwide experience in *Fusarium* management shows that prevention is the most profitable and biologically viable alternative under an imposing regulatory or voluntary scheme yet general adopted among the productive sectors. Australia was able to contain a regional outbreak of FOCR4T for more than 20 years by taking severe preventive measures that included offsets movement restrictions for planting as their main strategy (M. Dita. 2017. Personal communication). However, since studies conducted in the DOT region of Jalisco suggest that haplotypes of different *Fusarium* species are widely distributed (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020), the concept of free area as the basis for establishment of mother plantations and restriction of commercial offset mobilization appear to be unreliable. The alternative would be to optimize the principle of low prevalence with the pathogenic knowledge at the haplotypes level and their regional prevalence levels. This also implies a thorough knowledge of the physico-chemical and biological mechanisms of suppressive soil to operate on the soil health as a mitigation strategy (Fang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2019). For example, neutral-alkaline pH and organic matter greater than 2.5 do not promote high *Fusarium* indexes (FI) in soils where agave is grown in Jalisco and are considered low inductive soils (López-Bautista *et al.*, 2020). Although the offset maintains its physiological connection with the mother plant until it is cut with commercial purposes, there also exists an interaction with the soil that must be fully understood. In this study,

más rentable y biológicamente viable bajo un esquema impositivo regulatorio o voluntario, pero de adopción generalizada entre sectores productivos. Australia logró confinar un brote regional de FO-CR4T por más de 20 años con fuertes medidas preventivas con restricción del movimiento de hijuelos para siembra como estrategia principal (M. Dita. 2017. Comunicación Personal). Sin embargo, estudios regionales en la región DOT de Jalisco sugiere la amplia distribución de haplotipos de diferentes especies de *Fusarium* por lo que el concepto de área libre como base de establecimiento de plantas madre y restricción en movilidad de hijuelos podría tener poca viabilidad (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). La alternativa sería optimizar el principio de baja prevalencia con el conocimiento patogénico a nivel de haplotipos y sus niveles de prevalencia regional. Así mismo, implica el profundo conocimiento de los mecanismos físico-químicos y biológicos de supresividad de suelos para operar sobre la salud de suelo como estrategia de mitigación (Fang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2019). Por ejemplo, pH neutros-alcalinos y materia orgánica superiores a 2.5 no favorece altos índices de *Fusarium* spp. (IF) en suelos agaveros de Jalisco siendo tipificados con inductividad baja (López-Bautista *et al.*, 2020). Si bien el hijuelo mantiene su conexión fisiológica con la planta madre hasta su corte con fines comerciales existe también una interacción con el suelo que debe ser entendida integralmente. En este trabajo, el calibre del hijuelo, definido por el tamaño de su base ‘bulbar’, pretendía demostrar que a más joven (Lima) menor exposición microbiológica del suelo y mayor vigor conferido por factores maternos, y por tanto menor presencia de *Fusarium* justificando su uso en nuevas plantaciones. Los resultados demostraron que calibre no tuvo efecto sobre carga de inóculo ni sobre la composición de especies. La condición infectiva o endofítica, sin embargo, aun

the offset base-size criterion, which is defined by the size of its “bulbar” base, was intended to demonstrate that the younger the shoot (Lima), the least the exposure to microbial soil and the highest the vigor conferred by maternal factors, and therefore the least presence of *Fusarium*, thereby justifying its use in new plantations. The results demonstrated that it has no effect on the inoculum load nor on the species composition. The infective or endophytic condition however still needs to be elucidated. On the contrary, the epidemic inductivity of SMAP had an effect on the offset inoculum load. Surprisingly, the region considered as moderate (South,  $6.83 \pm 4.22$ ) marginally surpassed the most inductive region (Los Altos,  $5.58 \pm 2.42$ ) in CFU/offset. The less inductive region (Valley,  $3.3 \pm 3$ ) had 59 and 48% less inoculum load. Nonetheless, Los Altos lowest level of CFU variability suggests that *Fusarium* spp. have higher prevalence and endemicity. In this region, the establishment of mother plantations from commercial plantations could pose a greater mitigation challenge and soil health recovery.

Considering the importance of the agave industry and the epidemic history of SMAP, official phytosanitary campaigns and regulatory initiatives have been carryout and proposed with preventive purposes (SENASICA-DGSV, 2017). In 2003 it was presented the Norma Oficial Mexicana project NOM-083-FITO-2003 focused on delimiting the phytosanitary requirements for production and mobilization of propagative material of *Agave tequilana* Weber Blue variety in the DOT region. This norm project has not been published and its approval is uncertain. The objective of NOM-083 is as follow: ‘Establish phytosanitary requirements for the production and mobilization of propagative material of *Agave tequilana* Weber Blue variety, to protect its phytosanitary condition and prevent the spread of economically important

requiere ser dilucidado. Por el contrario, la inductividad epidémica SMAP si tuvo un efecto en la carga de inóculo de hijuelos. Sorpresivamente, la región considerada como moderada (Sur,  $6.83 \pm 4.22$ ) superó marginalmente a la más inductiva (Los Altos,  $5.58 \pm 2.42$ ) en la cantidad de UFC/hijuelo. La región menos inductiva (Valles,  $3.3 \pm 3$ ) tuvo 59 y 48% menos carga de inóculo. No obstante, la menor variabilidad de UFC en Los Altos sugiere mayor prevalencia y endemicidad de *Fusarium* spp. En esta región, la selección de plantaciones madre a partir de plantaciones comerciales podría representar un mayor reto de mitigación y restitución de la salud de suelo.

Considerando la importancia de la industria del agave y los antecedentes epidémicos de SMAP se han implementado campañas fitosanitarias oficiales y se han propuesto iniciativas regulatorias con fines preventivos (SENASICA-DGSV, 2017). En 2003 se propuso la NOM-083-FITO-2003, un proyecto de la Norma Oficial Mexicana que tiene como fin delimitar los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad azul en la región DOT. Éste proyecto de norma no se ha publicado y su aprobación es incierta. La NOM-083 tiene como objetivo: ‘Establecer los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, con la finalidad de proteger su condición fitosanitaria y evitar la dispersión de plagas de importancia económica que lo afectan’. En este contexto plaga tiene una acepción amplia e implica principalmente a *Cercospora agavicola*, *Fusarium* spp. y *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). La propuesta normativa tiene como eje rector la certificación de plantaciones madre, la cual se define como: ‘Condición temporal de un sitio de producción cultivado con *Agave tequilana* variedad azul, ubicada dentro de la zona con Deno-

*pests affecting it*’. In this context, pest has a wide meaning and mainly refers to *Cercospora agavicola*, *Fusarium* spp. and *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). The guiding principle of the normative proposal is the certification of mother plantations, which is defined as ‘The temporary condition of a site where *Agave tequilana* Blue variety is cultivated within an area with Designation of Origin of Tequila from where offsets can be extracted, or tissue be donated for agave *in vitro* culture’. This regulatory framework may be a fundamental option for a sustainable phytosanitary management of the DOT, provided that comprehensive understanding of the offset pests risk and the integration of mother plantations into an epidemiological surveillance program to optimize monitoring, prevalence thresholds and phytosanitary actionability criteria are fully incorporated. This study, as well as previous research conducted as part of the regional surveillance network SIVEA (SENASICA-DGSV, 2017), which is currently operated only by the state of Guanajuato, provides biological and epidemiological criteria for identification of risk zones and low prevalence as baseline for establishment of mother plantations (Coria-Contreras *et al.*, 2019; López-Bautista *et al.*, 2020). The emerging global parasitic behavior of *Fusarium* spp., its taxonomic complexity and adaptive plasticity requires effective exclusion and mitigation strategies based on sound etiological, epidemiological and agroecological criteria, as well as a holistic and systemic vision in the DOT region to ensure its sustainability and resilience.

## CONCLUSIONS

This is the first study that demonstrates the association of four *Fusarium* spp. species complexes with *Agave tequilana* commercial offsets. The



minación de Origen Tequila de la cual se pueden extraer hijuelos o donación de tejido para la producción in vitro de agave'. Este marco regulatorio podría ser una opción fundamental para la gestión fitosanitaria sustentable de la DOT si se incorpora la comprensión científica del riesgo que representa el hijuelo y la integración de plantaciones madre en un programa de vigilancia epidemiológica para optimizar el monitoreo, umbrales de prevalencia y criterios de accionabilidad fitosanitaria. Este trabajo e investigaciones previas desarrolladas en la red regional de vigilancia SIVEA (SENASICA-DGSV, 2017), la cual actualmente es operada únicamente por el estado de Guanajuato, proporcionan criterios biológicos y epidemiológicos para la identificación de zonas de riesgo y baja prevalencia como línea base para el establecimiento de plantaciones madre (Coria-Contreras *et al.*, 2019; López-Bautista *et al.*, 2020). El carácter mundial emergente de *Fusarium* spp., su complejidad taxonómica y plasticidad adaptativa obliga a buscar estrategias efectivas de exclusión y mitigación con base en sólidos criterios etiológicos, epidemiológicos y agroecológicos. Un visión holística y sistémica es obligada en la región DOT para garantizar su sustentabilidad y resiliencia.

## CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que demuestra la asociación de cuatro complejos de especies de *Fusarium* spp. con hijuelos comerciales de *Agave tequilana*. Se desarrolló y validó el método CIFUSAG para estimar la carga de inóculo en hijuelo el cual puede ser aplicable a estudios de prevalencia microbiológica, manejo de riesgos, control y certificación con énfasis en *Fusarium* spp. La inductividad epidémica al síndrome de marchitez y pudrición seca del agave (SMAP) tuvo una tendencia

CIFUSAG method was developed and validated to estimate the inoculum load in offsets; this method can be applied to studies on microbiological prevalence, risk management, control, and certification with emphasis on *Fusarium* spp. The epidemic inductivity to the wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) showed a proportional tendency with *Fusarium* spp. inoculum load, while the offset base-size did not have any differential effect. It is necessary to integrate the study of soil physico-chemical and biological factors to understand the risks associated with the inoculum load in offsets. Selective pathogenicity tests are required to determine the *Fusarium* specie(s) that represent the highest level of survival, infectivity, and colonization in commercial offsets. This research justifies the scientific, technical, and regulatory analysis of commercial mother plantations and the offsets movement for propagative purposes to effectively manage the dispersion risk, establishment and/or intensity of potential damage to at least four *Fusarium* species associated with *A. tequilana* offsets. It is important to implement biological and chemical preventive management strategies that allow effective sanitary management of the Designation of Origin of Tequila (DOT) region.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNRF-DGSV for the financial support provided through the SENASICA-COLPOS agreement for conducting this project. To COLPOS and CONACYT for granting the scholarship that allowed the first author to obtain her M.Sc. degree. To Casa Sauza and CESAVERJAL for the logistics and/or infrastructure support. To the CP-LANREF team for their dedicated support during the development of this research.

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



proporcional con carga de inóculo de *Fusarium* spp., mientras que el calibre de hijuelo no tuvo un efecto diferencial. El estudio de factores físico-químicos y biológicos del suelo requieren integrarse para comprender los riesgos asociados a la carga de inóculo en hijuelo. Se recomiendan pruebas de patogenicidad selectivas para establecer la especie(s) de *Fusarium* que representan mayor sobrevivencia, infectividad y colonización en hijuelos comerciales. Esta investigación justifica el análisis profundo a nivel científico, técnico y regulatorio de plantaciones madre con propósito comercial y el movimiento de hijuelos con fines propagativos que permita en forma efectiva manejar el riesgo de dispersión, establecimiento y/o intensidad de daño potencial de al menos cuatro especies de *Fusarium* asociadas a hijuelos de *A. tequilana*. Es importante establecer estrategias biológicas y químicas de manejo de hijuelos con fines preventivos que permitan una efectiva gestión sanitaria de la región Denominación de Origen del Tequila (DOT).

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNRF-DGSV por el apoyo financiero a través de convenio SENASICA-COLPOS para ejecución del proyecto. Al COLPOS y CONACYT por la beca de maestría del primer autor. A Casa Sauza y CESAVEJAL por el apoyo logístico y/o infraestructura. Al equipo CP-LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Avasthi S, Gautam AK and Bhaduar R. 2018. Isolation and characterization of *Fusarium* species causing leaf spot and root rot diseases on *Aloe vera*. *Journal on New Biological Reports* 7(1): 1-9. <https://www.researchgate.net/publication/323320545>
- Bergman BHH and Bekker-Van Der Voort, AMM. 1978. Latent infection in tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 85: 187-195. <https://doi.org/10.1007/BF01976820>
- Bermúdez CI. 2014. Herramientas biotecnológicas para el combate de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en *Musa* spp. *Biotecnología vegetal* 14(4): 195-202. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/82>
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 71-94. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2020. Geografía de la DOT. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/> (consulta, enero 2019).
- Fang X, You MP and Barbetti MJ. 2012. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. *European Journal of Plant Pathology* 134: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0042-1>
- Green MR and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1881p. [www.cshprotocols.org](http://www.cshprotocols.org)
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, López-Javier MA y González-Gómez R. 2017. Apps como herramientas de soporte epidemiológico aplicado a sistemas regionales de vigilancia epidemiológica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 178.
- Halfeld-Vieria BA y Nechet KL. 2005. Morte de plântulas de *Acácia mangium* por *Fusarium solani* no Brasil e estudo da sua associação com sementes. *Summa Phytopathologica* 31: 383-385. <https://www.researchgate.net/publication/233391880>
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. *European Journal of Plant Pathology* 154: 585-596. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01683-5>
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñaloza B, Coria-Contreras JJ, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35(S): 177.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 388p. [https://www.researchgate.net/publication/321385629\\_The\\_Fusarium\\_Laboratory\\_Manual](https://www.researchgate.net/publication/321385629_The_Fusarium_Laboratory_Manual)
- Liew ECY, Laurence MH, Pearce CA, Shivas RG, Johnson GI, Tan YP, Edwards J, Perry S, Cooke AW and Summerell BA. 2016. Review of *Fusarium* species in association with mango malformation in Australia. *Australasian Plant*

- Pathology 45: 547-559. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0454-z>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. Mexican Journal of Phytopathology 38: 79-106. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-4
- NOM-083-FITO-2003. 2003. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-083-FITO-2003, Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad azul. <http://187.191.71.192/expedientes/1901>
- O'Donnell K, Ward T, Robert V, Crous P, Geiser D and Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. Phytoparasitica 43: 583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Peña D and Ávila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protection Science 53: 144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- SENASICA-DGSV. 2017. Manual operativo de la campaña contra plagas reglamentadas del agave. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. 28p. [http://www.sivea.org.mx/web/files/vista\\_principal/ManualOperativoPlagasReglamentadasdelAgave2016septiembreFINAL.pdf](http://www.sivea.org.mx/web/files/vista_principal/ManualOperativoPlagasReglamentadasdelAgave2016septiembreFINAL.pdf)
- SIAP. 2020. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap> (Consultado marzo 2020).
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. Biochemical Genetics 51: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>

# Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana

## Mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano

**Rómulo García-Velasco**, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Tenancingo, Estado de México, CP 52400, México; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Armando Rodríguez-García**, **Barbarita Companioni-González\***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México. \*Autor para correspondencia: bcompanioni2007@gmail.com

**Recibido:** 06 de Agosto, 2020.

**Aceptado:** 13 de Diciembre, 2020.

García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Rodríguez-García A and Companioni-González B. 2021. Genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt in banana. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 122-146.

**DOI:** <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-2>

Primera publicación en línea: 28 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 28, 2020.

**Resumen.** Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) representan uno de los productos más importantes para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos. Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como la marchitez por *Fusarium*. El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por ello, se considera al mejoramiento genético de la resistencia como la única forma de control efectivo y sostenible para esta enfermedad. Se han desarrollado estrategias basadas en la

**Abstract.** Bananas and plantains (*Musa* spp.) represent one of the most important products for food security and income generation. However, the production of these crops is threatened by the attack of diseases such as Panama disease or *Fusarium* wilt. In recent years there is a general consensus that the only form of effective and sustainable control, both economic and for this disease, is genetic improvement for resistance. Several biotechnology based strategies have been developed for the genetic improvement of the crop in obtaining individuals resistant or tolerant to fusariosis. The present work was carried out with the objective of providing a review of scientific literature related to the use of biotechnological tools in genetic improvement for resistance to fusarial wilt in bananas, with emphasis on *in vitro*, *ex vitro* and field selection for pathogen resistance. The results presented in this review demonstrate the potential of biotechnology in the field of genetic improvement in crops. Which allow to accelerate the genetic improvement programs of resistance to this disease.

biotecnología para el mejoramiento genético del cultivo en la obtención de individuos resistentes o tolerantes a este patógeno. El presente trabajo se realizó con el objetivo de ofrecer una revisión de literatura científica relacionada con la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a marchitez por *Fusarium* en banano, con énfasis en la selección *in vitro*, *ex vitro* y en campo para la resistencia al patógeno. Los resultados presentados en esta revisión evidencian el potencial de la biotecnología y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales permiten acelerar los programas de mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad.

**Palabras clave:** biotecnología, enfermedad, *Musa* spp., selección temprana.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) están entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropico. Constituyen una fuente importante de ingresos en casi 135 países productores (FAO, 2017). Lo anterior indica que los bananos y plátanos, representan uno de los productos más importantes para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos. Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como el Mal de Panamá o marchitez. Esta enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa* (Ploetz, 2015). Durante los primeros 50 años del siglo XX esta enfermedad causó el reemplazo en las plantaciones del cultivar Gros Michel susceptible a la raza 1, por cultivares Cavendish con importantes transformaciones en la exportación de la industria bananera (Bubici *et al.*, 2019). La introducción de la raza tropical 4 de FOC

**Key words:** biotechnology, disease, *Musa* spp., early selection.

Bananas and plantains (*Musa* spp.) are among the most important crops in the countries of the tropics and subtropics. They are an important source of income in nearly 135 countries that produce this crop (FAO, 2017). This indicates that bananas and plantains are one of the most important products for food security and income. However, the production of these crops is under threat of diseases such as the Panama disease or wilting. This disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) is one of the most destructive and economically important in the *Musa* genus (Ploetz, 2015). During the first half of the 20th century, this disease led to the replacement of the Gros Michel cultivar, susceptible to race 1, with Cavendish cultivars, with important transformations in the exports of the banana industry (Bubici *et al.*, 2019). The introduction of tropical race 4 of FOC (RT4) in the plantations of Cavendish cultivars had a great economic and social impact on the banana industry in Latin America and the Caribbean (Ploetz, 2015). There is currently no sustainable chemical control for this disease. Therefore, in recent years there has been a general consensus over the fact that the only way of controlling this disease effectively and safely was via genetic breeding for resistance (Dita *et al.*, 2011). Strategies have been developed based on plant biotechnology for the genetic improvement of banana trees to obtain resistant plants, or tolerant to wilt by *Fusarium* (Saraswathi *et al.*, 2016). However, the search for new Cavendish cultivars, resistant or tolerant to this disease, is still a priority. On the other hand, most field studies lack long-term results that may contribute to evaluate the efficiency of the genes *in situ* (Ploetz *et al.*, 2015). In this sense, the development of methods for the early

(RT4) en las plantaciones de cultivares Cavendish representa un gran impacto económico y social en la industria bananera, en América Latina y el Caribe (Ploetz, 2015). En la actualidad no existe control químico sostenible para esta enfermedad. Por ello, en los últimos años existe un consenso general de que la única forma de control efectivo y segura para esta enfermedad lo constituye el mejoramiento genético para la resistencia (Dita *et al.*, 2011). Se han desarrollado estrategias basadas en la biotecnología vegetal para el mejoramiento genético del banano en la obtención de individuos resistentes o tolerantes a la marchitez por *Fusarium* (Saraswathi *et al.*, 2016). Pero, la búsqueda de nuevos cultivares Cavendish resistentes o tolerantes a la enfermedad continúa siendo una prioridad. Por otra parte, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ* (Ploetz *et al.*, 2015). En este sentido, el desarrollo de métodos para la selección temprana de individuos resistentes a las enfermedades, con el empleo de la biotecnología constituye un valioso utilitario para los programas de mejoramiento genético de los cultivos. Lo cual se ha convertido en las últimas décadas en un tema necesario y atractivo para los fitomejoradores (Saraswathi *et al.*, 2016). El presente trabajo se realizó con el objetivo de ofrecer una revisión de literatura científica relacionada con la utilización de técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético para la resistencia a la marchitez por *Fusarium* en banano, con énfasis en la selección *in vitro*, *ex vitro* y en campo para la resistencia al patógeno.

#### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: mecanismo de infección y síntomas de la enfermedad**

El género *Fusarium* constituye el más amplio e importante de la familia *Tuberculareacea*; y desde el punto de vista taxonómico es uno de los

selection of disease resistant individuals, along with the use of biotechnology, is a valuable asset for the genetic breeding programs of crops. In past decades, this has become a necessary and attractive topic for plant breeders (Saraswathi *et al.*, 2016). The present work was carried out in order to offer a revision of scientific literature related to the use of biotechnological techniques to support genetic breeding for resistance to wilting by *Fusarium* in banana trees, emphasizing selection *in vitro*, *ex vitro* and in the field for resistance to the pathogen.

#### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: infection mechanism and symptoms of the disease**

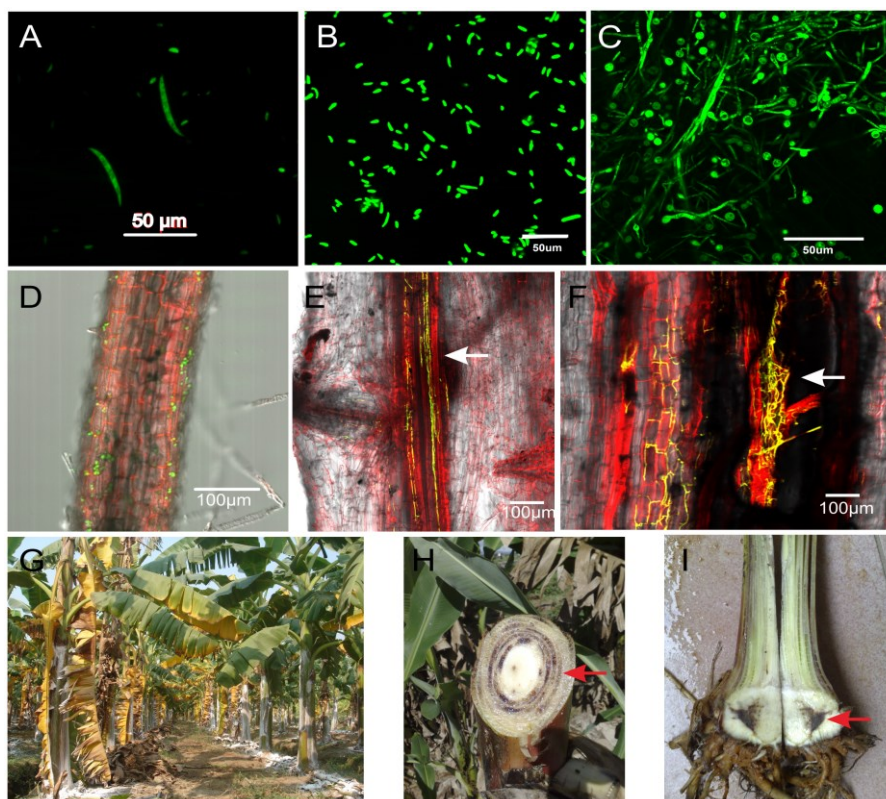
The genus *Fusarium* is the broadest and most important in the *Tuberculareacea* family, and from a taxonomical standpoint, it is one of the most difficult to handle out of all the fungus groups. This fungus covers numerous species and diverse special forms (f. sp.) within each species. On the other hand, it presents great variability and its identification in different species is imprecise (Dean *et al.*, 2012). The perfect phase of *F. oxysporum* (FOX) is still unknown. However, the survival and proliferation of this species and its special forms depend on its asexual spores. FOC produces three types of asexual spores, including macroconidia, microconidia and chlamydoconidia in its life cycle (Figure 1 A-C), which help it spread and survive. In addition, it shares a similar infection cycle with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (FOL), the causal agent of wilt in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Guo *et al.*, 2014). Chlamydoconidia have thick walls, formed inside the hypha or the macroconidia, and can survive in the absence of the host for several years in a latent state, or they can germinate and grow as saprophytes in the remains of non-host plants to produce new chlamydoconidia (Nelson *et al.*, 1983). FOC conidia germinate and



más difíciles de todos los grupos de hongos. Este hongo comprende numerosas especies y diversas formas especiales (f. sp.) dentro de cada especie. Por otra parte, presenta una gran variabilidad y se hace imprecisa su identificación en las distintas especies (Dean *et al.*, 2012). La fase perfecta de *F. oxysporum* (FOX) no se conoce aún. Pero, la supervivencia y proliferación de esta especie y sus formas especiales existentes dependen de sus esporas asexuales. FOC produce tres tipos de esporas asexuales que incluyen macroconidios, microconidios y clamidosporas en su ciclo de vida (Figura 1 A-C), lo que le permite dispersarse y sobrevivir; además, comparte un ciclo de infección similar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (FOL), agente causal de la enfermedad del marchitamiento del jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Guo *et al.*, 2014). Las clamidosporas son de paredes gruesas, formadas dentro de la hifa o del macroconidio y pueden sobrevivir en ausencia del hospedante por varios años en estado latente o consiguen germinar y crecer como saprófito en restos de plantas no hospedantes para producir nuevas clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983). Los conidios de FOC germinan y forman hifas fúngicas bajo diversas condiciones nutricionales y ambientales; las hifas se desarrollan alrededor de las raíces y colonizan su superficie. Posteriormente, penetran la epidermis e invaden; y colonizan los vasos del xilema de la raíz (Figura 1 D-F). Después del proceso de infección en las raíces de las plantas de banano, el hongo crece hacia el rizoma y pseudotallo y causa la muerte del tejido o de toda la planta. Entre la infección inicial por el hongo y los síntomas externos transcurre un tiempo en que el limbo de las hojas se torna amarillo brillante, y se marchita o colapsa alrededor del pseudotallo (Figura 1 G). Mientras que los haces vasculares del pseudotallo y del rizoma de la planta enferma se tornan de color rojizo a marrón (Figura 1 H-I) (Guo *et al.*, 2014).

form fungal hyphae under diverse nutritional and environmental conditions; the hyphae develop around the roots and colonize their surface. They then penetrate the epidermis, invade and colonize the xylem vessels of the root (Figure 1 D-F). After the process of infection in the banana plant roots, the fungus grows towards the rhizome and the pseudostem and causes the death of the tissue or of the entire plant. Between the initial infection by the fungus and the external symptoms, there is a moment in which the limbo of the leaves turns a bright yellow and it wilts or collapses around the pseudostem (Figure 1 G), whereas the vascular bundles of the pseudostem and of the rhizoma of the diseased plant turn reddish or maroon (Figure 1 H-I) (Guo *et al.*, 2014).

The fungus may survive in the absence of the host for extended periods in a latent state or it may germinate and grow as a saprophyte in the remains of non-host plants to produce new chlamydo spores. Estas a su vez le permiten al patógeno adaptarse a condiciones extremas (Ploetz *et al.*, 2015). Consequently, the susceptible genotypes cannot be grown in an infected field for up to 30 years (Buddenhagen, 2009). However, the infection process may end and not progress when the plant is not susceptible or is not predisposed by environmental stress. Dong *et al.* (2012) found that the resistant host responds to a signal in the vessels infested with the formation of callose, vascular gels and tylose that immobilize the spores around the storage site. The development of these structures was examined in detail under an electron microscope and it was determined that the synthesis and release of the phenolic substances produced and lignified by these structures are the same which stop the invasion of the pathogen during the host-pathogen interaction.



**Figura 1.** Ciclo de infección de la marchitez vascular en banana causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A) macroconidios; B) microconidios; C) clamidospora producida por el aislado FOC marcado con proteína fluorescentes verde; D) acoplamiento de la hifa de FOC a las raíces de banana; E) colonización de los haces vasculares de las raíces de banana, por la hifa de FOC (indicado por la flecha); F) una sección longitudinal de las raíces de banana muestra las hifas del hongo creciendo en los haces vasculares; G) las plantas de banana enfermas con los síntomas dominantes de hojas amarillentas; H–I) los haces vasculares del pseudotallo, y el rizoma de la planta de banana enfermas que se tornan de color rojizo a marrón (indicado por la flecha). Fuente: Guo *et al.* (2014).

**Figure 1.** Figure 1. Vascular wilt infection cycle in banana plants, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A) macroconidia; B) microconidia; C) chlamydospore caused by the isolation FOC, marked with fluorescent green protein; D) connection of the FOC hypha to the roots of the banana plant; E) colonization of the vascular bundles of the roots of the banana plant via the hypha of the FOC (indicated with the arrow); F) longitudinal section of the roots of the banana plant showing the fungal hyphae growing in the vascular bundles; G) diseased banana plants with the predominant symptoms of yellow leaves; H–I) diseased vascular bundles of the pseudostems and the banana plant rhizomes turning reddish or maroon (indicated by the arrow). Source: *et al.* (2014).

El hongo puede sobrevivir en ausencia del hospedante por largos períodos de tiempo; en estado latente o pueden germinar o crecer como saprófito en restos de plantas no hospedantes para producir nuevas clamidosporas. Estas a su vez le permiten al patógeno adaptarse a condiciones extremas (Ploetz *et al.*, 2015). Como consecuencia, los genotipos

### Pathogenic complexity of FOC

The variability of FOC populations has been differentiated based on its pathogenicity, in which three races have been identified that affect *Musa* spp.: race 1, responsible of the epiphytotic disease in plantations of Manzano (AAB) and Gros

susceptibles no pueden cultivarse en un campo infectado por un período de hasta 30 años (Buddenhagen, 2009). Sin embargo, el proceso de infección puede terminar y no progresar cuando la planta no es susceptible o no está predispuesta por un estrés ambiental. Dong *et al.* (2012) encontraron que el hospedante resistente responde a una señal en los vasos infestados por la formación de calosa, geles vasculares y tilosas que inmovilizan las esporas alrededor del sitio de almacenamiento; el desarrollo de estas estructuras fue examinado en detalle por microscopía electrónica, finalmente determinaron que la síntesis y liberación de las sustancias fenólicas que producen y lignifican estas estructuras son las que detienen la invasión del patógeno durante la interacción hospedante-patógeno.

### Complejidad patogénica de FOC

La variabilidad de las poblaciones de FOC ha sido diferenciada en base a su patogenicidad donde se han identificado tres razas que afectan a *Musa* spp.: la raza 1 responsable de la epifitía en las plantaciones de los cultivares Manzano (AAB) y Gros Michel (AAA); la raza 2 patogénica al cultivar Bluggoe (ABB), y a algunos tetraploides (AAAA); y la raza 4 que ataca a los cultivares del subgrupo Cavendish (AAA) y a todos los susceptibles a las razas 1 y 2 (Ploetz, 2006). Esta última fue descubierta por primera vez en 1990 en Taiwán; y fue posteriormente dividida en las cepas tropical y subtropical (Ploetz, 2006). En la actualidad, la raza 4 de FOC se encuentra presente en veinte países de 135 productores de bananos (Martínez *et al.*, 2020). Sin embargo, la designación de razas de FOC era engorrosa y por ello se desarrollaron otros métodos que revelaron su diversidad genética. El análisis de compatibilidad vegetativa constituye una técnica rápida y confiable que la prueba de patogenicidad. Su utilización ha permitido determinar la diversidad de razas de FOC dentro de una región.

Michel (AAA) cultivars; race 2, pathogenic to the Bluggoe (ABB) cultivar and some tetraploids (AAAA); and race 4, which attacks the cultivars of the Cavendish subgroup (AAA) and all those susceptible to races 1 and 2 (Ploetz, 2006). The latter was discovered in 1990 in Taiwan, and later divided into the tropical and subtropical strains (Ploetz, 2006). Nowadays, race 4 of FOC is found in twenty out of 135 banana-producing countries (Martínez *et al.*, 2020). However, designating FOC races was cumbersome, and other methods were developed which revealed its genetic diversity. The vegetative compatibility analysis is a faster and more reliable technique than the pathogenicity test. Its use has helped determine the diversity of FOC races within a region. The analyses of vegetative compatibility groups (GCV) divided the FOC isolations into 24 GCVs (GCV0120 to GCV0126 and GCV0128 to GCV01224) (Ploetz, 2006). Later deoxyribonucleic acid (DNA) markers revealed the polyphyletic origin of FOC, since some GCV are taxonomically closer to other special forms of FOX than to other FOC GCVs (Fourie *et al.*, 2009). Additionally, the strains belonging to diverse GCVs infest particular banana cultivars and were therefore grouped in the same race. This suggests that the pathogenicity to a specific cultivar has evolved convergently or is a result of the horizontal transfer of genes between the members of the FOX complex (Ploetz, 2006). In general, FOC lineages show a notable dichotomy referred to as types or clades (Groenewald *et al.*, 2006). High resolution genotyping by sequencing analysis using DArTseq generates readings of short sequences after reducing the complexity of a genome by digestion with restriction enzymes. In this sense, markers of entire genomes using DArTseq divided the 24 FOC strains (which represent all the GCVs known to date) into two groups (Cruz *et al.*, 2013). On the other hand, the analysis of the genome revealed that the genomic structures of the

Los análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) dividieron los aislados de FOC en 24 GCV (GCV0120 a GCV0126, y GCV0128 a GCV01224) (Ploetz, 2006). Después, marcadores de ácido desoxirribonucleico (ADN) revelaron el origen polifilético de FOC ya que algunos GCV están taxonómicamente más cerca de otras formas especiales de FOX que a otros GCVs de FOC (Fourie *et al.*, 2009). Además, las cepas pertenecientes a diversos GCVs infestan cultivares particulares de banano y, por lo tanto, se agruparon en la misma raza. Lo que sugiere que la patogenicidad hacia un cultivar específico ha evolucionado convergentemente o ha resultado de la transferencia horizontal de genes entre los miembros del complejo de FOX (Ploetz, 2006). En general, los linajes de FOC muestran una notable dicotomía referida como tipos o clados (Groenewald *et al.*, 2006). La genotipificación de alta resolución por análisis de secuenciación usando DArTseq genera lecturas de secuencias cortas después de reducir la complejidad de un genoma por digestión con enzimas de restricción. En este sentido, marcadores de genomas enteros por DArTseq dividieron las 24 cepas de FOC (que representan todos los GCV hasta ahora conocidos) en dos grupos (Cruz *et al.*, 2013). Por otro lado, el análisis del genoma reveló que las estructuras genómicas de los aislados de la raza 1 y la raza 4 eran altamente sinténicas (que ocurren en el mismo cromosoma) con las de FOL cepa Fol4287. Guo *et al.* (2014) lograron la identificación de genes ortólogos SIX primariamente descritos para el genoma de aislados de FOL mediante el análisis del genoma de aislados de la raza 1 y la RT4 de FOC. En este aspecto, se han diseñado varios protocolos para la detección molecular de aislados de FOC, los cuales han sido revisados de forma exhaustiva por Lin y Lin (2016) y Ying y Yi (2016). De este modo FOC se compone de tres razas, ocho linajes y 24 GCVs. La mayor parte del daño es causado por la RT4 de FOC que se encontraba sólo en Asia. Sin

isolations of races 1 and 4 were highly synthetic (occurring in the same chromosome) with those of FOL strain Fol4287. Guo *et al.* (2014) managed to identify SIX orthologous genes, primarily described for the genome of FOL isolations via the analysis of the genomes of isolations from race 1 and the RT4 of FOC. In this regard, many protocols have been designed to detect FOC isolation molecules, which have been thoroughly revised by Lin and Lin (2016) and Ying and Yi (2016). Thus, FOC is composed of three races, eight lineages and 24 GCVs. Most of the damage is caused by the RT4 in FOC, found only in Asia. However, García-Bastidas *et al.* (2019) reported the first case of FOC-related RT4 outside of Southeast Asia in the Colombian Guajira region, classified as *Fusarium odoratissimum* (Figure 2). This represents a high risk for all the other countries in the Americas. Therefore, strategies must be developed to fight this disease and minimize the hazards of the effects caused by the entry of this new race of the pathogen into exporting Latin American and Caribbean countries.

### Controlling wilt by *Fusarium* in banana

The perennial production of the banana crop and the polycyclic nature of wilt by *Fusarium* hinder the development of efficient management strategies. In spite of this, using the available knowledge and technologies, it is now easier to implement quarantine policies and therefore avoid pathogens from spreading. In relation to this, in Mexico, the SADER (Secretariat of Agriculture and Rural Development) via the SENASICA (National Agrifood Health, Safety and Quality Service) are taking important measures to prevent the entry and spreading of the RT4 of FOC into the country. These measures include phytosanitary surveillance actions for the timely detection of RT4, training technicians and farmers in order to raise awareness regarding

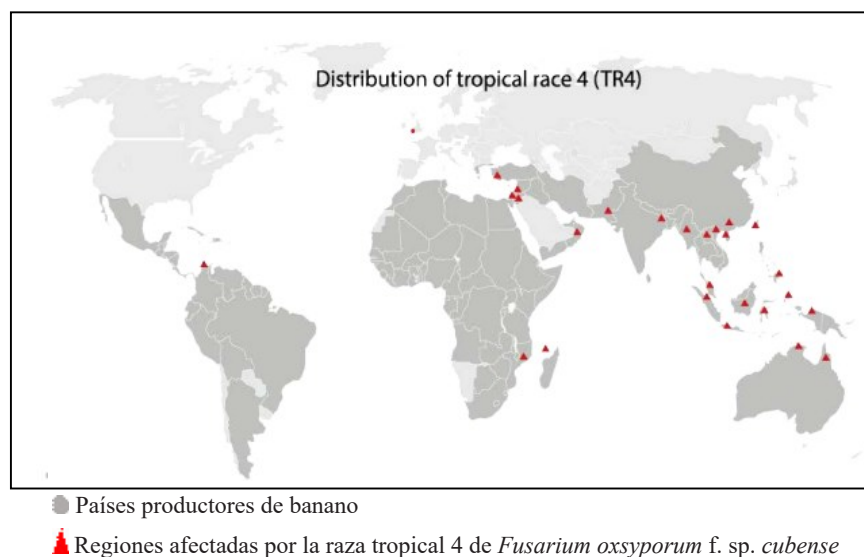


embargo, García-Bastidas *et al.* (2019) informaron el primer reporte de la RT4 de FOC asociado con la enfermedad fuera del sudeste asiático, en la zona de la Guajira colombiana clasificado como *Fusarium odoratissimum* (Figura 2). Lo cual representa un alto riesgo para el resto de los países del continente americano. Por lo que se requiere el desarrollo de estrategias para el combate de esta enfermedad; y reducir los riesgos de las afectaciones que puede causar la entrada de esta nueva raza del patógeno en el resto de los países exportadores de América Latina y el Caribe.

### Control de la marchitez por *Fusarium* en banano

La producción perenne del cultivo de banano y la naturaleza policíclica de la enfermedad marchitez por *Fusarium* impiden el desarrollo de estrategias de manejo eficientes. A pesar de ello, con el conocimiento y las tecnologías disponibles, hoy es más fácil y efectivo implementar políticas cuarentenarias e impedir así la diseminación de patógenos.

the risk of moving vegetative material, and finally, exploring and monitoring the banana-producing regions (Manzo *et al.*, 2014). Other measures for management also included are planting annually in phases, the use of tissue culture plants, crop rotation, having an adequate drainage system in the plantation, the incorporation of organic matter and applying biocontrol agents via *Trichoderma harzianum*. However, these control methods only allow for planting these cultivars for short periods, since the fungus destroys the plantations soon after (Fu *et al.*, 2017). Due to this, the only efficient control method has been considered to be planting disease-resistant hosts (Dita *et al.*, 2011). In this sense, since the appearance of wilt by *Fusarium* in different banana-producing countries, a wide genetic breeding program has been developed for the resistance to the three races of FOC, using conventional and biotechnological techniques, with a recent emphasis on the RT4 of FOC.



**Figura 2.** Distribución de la raza tropical 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en banano. Mapa producido por Biodiversidad Internacional para ProMusa (imagen cortesía: ProMusa.com).

**Figure 2.** Distribution of tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana plants. Map produced by International Biodiversity for ProMusa (image courtesy of ProMusa.com).



En relación con ello, en México la SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) a través de SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) realizan un conjunto de medidas importantes para prevenir la entrada y diseminación de la RT4 de FOC en el país. Dentro de estas medidas encontramos acciones de vigilancia epidemiológica fitosanitaria para la detección oportuna de la RT4; la capacitación de técnicos y productores, con el interés de lograr conciencia en los productores del riesgo de trasladar material vegetativo; y por último, la exploración y monitoreo de las regiones bananeras (Manzo *et al.*, 2014). Otras de las medidas de manejo utilizadas tenemos las siembras anuales escalonadas; la utilización de plantas de cultivo de tejidos; la rotación de cultivo; contar en el terreno de siembra con un buen sistema de drenaje; la incorporación de materia orgánica; y la aplicación del biocontrol mediante *Trichoderma harzianum*. No obstante, estos métodos de control sólo permiten sembrar estos cultivares por períodos cortos, dado a que el hongo vuelve a devastar las plantaciones (Fu *et al.*, 2017). Por ello, se ha considerado que el único método eficaz de control es sembrar o plantar hospedantes resistentes a la enfermedad (Dita *et al.*, 2011). En este sentido, desde la aparición de la marchitez por *Fusarium* en los diferentes países productores de banano, se desarrolla un amplio programa de mejoramiento genético para la resistencia a las tres razas de FOC, mediante técnicas convencionales y biotecnológicas con énfasis en los últimos años en la RT4 de FOC.

### **Técnicas biotecnológicas en apoyo al mejoramiento genético de *Musa* spp. para la resistencia a FOC**

Las mayores posibilidades que brindan las técnicas biotecnológicas están dadas en la mejora de

### **Biotechnological techniques to support the genetic breeding of *Musa* spp. for the resistance to FOC**

The greatest possibilities provided by biotechnological techniques are found in the improvement of the resistance to pathogens, which offer several advantages over conventional methods, due to the possibility of selecting individuals from large populations of plants in a short timeframe. This increases the possibility of finding the desired traits. On the other hand, they help control inoculants and the environmental conditions that may interfere with the results obtained. In turn, they help access plants that are free of diseases and offer the efficiency of the genetic breeding programs for crops (Ortiz and Swennen, 2014). For these reasons, the results of the breeding of banana and plantain plants have been introduced faster than with the conventional genetic breeding methods (Li *et al.*, 2015); micropropagation has played an important role, and particularly, it has improved the management of healthy germplasm on a global scale. Somaclonal variation, *in vitro* mutagenesis, genetic transformation and early selection in the *Musa* genus have been used successfully in several genetic breeding programs.

### **Utilization of the somaclonal variation**

Somaclonal variation, which comprises genetic or epigenetic changes induced during the callus phase of the plant cells grown *in vitro* has been used for genetic breeding in several agronomic traits. Molina *et al.* (2011) determined the response to susceptibility or resistance to the RT4 in FOC in two somaclonal variants of Cavendish (AAA) from Taiwan, two commercial cultivars of the Cavendish subgroup, three local cultivars, and an improved hybrid from Honduras, in a field previously

la resistencia a patógenos. Las cuales ofrecen varias ventajas sobre los métodos convencionales por la posibilidad de seleccionar individuos a partir de grandes poblaciones de plantas en un espacio reducido de tiempo. Lo cual aumenta de esta forma la posibilidad de encontrar los caracteres deseados. Por otra parte, permiten un control de la concentración de inóculo, y de las condiciones ambientales que pudieran interferir en los resultados obtenidos. A su vez, permiten el acceso a las plantas libres de la enfermedad; y por último mejoran la eficiencia de los programas de mejoramiento genético de los cultivos (Ortiz y Swennen, 2014). Por estas razones, los resultados de la mejora de bananos y plátanos mediante la biotecnología vegetal se han introducido con mayor rapidez en comparación con los métodos del mejoramiento genético convencional (Li *et al.*, 2015); en donde la micropropagación ha jugado un papel importante, en particular ha mejorado el manejo del germoplasma sano a escala mundial. La variación somaclonal, la mutagénesis *in vitro*, la transformación genética y la selección temprana en el género *Musa* se han empleado con éxito en varios programas de mejoramiento genético.

#### Utilización de la variación somaclonal

La variación somaclonal que comprende los cambios genéticos o epigenéticos inducidos durante la fase de callo de las células vegetales cultivadas *in vitro* ha sido usada para el mejoramiento genético de varios caracteres agronómicos. Molina *et al.* (2011) determinaron la respuesta a la susceptibilidad o resistencia a la RT4 de FOC en dos variantes somaclonales de Cavendish (AAA) de Taiwán, dos cultivares comerciales del subgrupo Cavendish, tres cultivares locales, y un híbrido mejorado de Honduras, en un campo previamente infestado con el patógeno en Filipinas. En dicha investigación observaron los mayores valores de incidencia de la

infested with the pathogen from the Philippines. The investigation observed the highest values of incidence of the disease (100%) in two commercial Cavendish cultivars (Gran Enano and Williams), as well as in the local cultivar 'Lakatan'. However, no plants infected with the FOC RT4 were found in the somaclonal variants from Taiwan ('GCTCV119' and 'Formosana'). In other studies, Molina *et al.* (2016) compared four selections of somaclonal variations ('GCTCV-105', 'GCTCV-119', 'GCTCV-218' and 'GCTCV-219') of Cavendish (AAA) from Taiwan and three important local cultivars from the Philippines: 'Latundan' (AAB, subgroup Seda), 'Lakatan' (AAA, subgroup Lakatan) and 'Saba' (ABB, subgroup Saba) with the commercial Cavendish Gran Enano (AAA, subgroup Cavendish) in a soil severely infested with FOC RT4 in southern Philippines. Results displayed susceptibility with an incidence of the disease of 64 and 76% respectively in the commercial cultivars of Gran Enano and 'Lakatan' in the first cycle of evaluation of resistance, and 79 and 92% respectively in the second cycle. However, 'GCTCV' somaclonal variants expressed an incidence of the disease of 0 to 6% in the first cycle and 0 to 8% in the second cycle of the tests to evaluate the symptoms of the disease. The cultivar 'Saba' displayed an incidence of the disease of 0% in both the first and second cycles of evaluation of resistance to the fungus. These results confirmed the stability in the resistance to FOC RT4 in the 'GCTCV' somaclonal variants. On the other hand, they show that the selection of somaclonal variants are a feasible tool in genetic breeding for the search for resistance to FOC in banana plants.

#### Utilization of induced *in vitro* mutagenesis

Mutagenic techniques that induce inheritable changes in the genetic composition of a cell by altering its deoxyribonucleic acid (DNA) have

enfermedad (100%) en los dos cultivares comerciales Cavendish (Gran Enano y Williams) y en el cultivar local 'Lakatan'. Sin embargo, no encontraron plantas infectadas a la RT4 de FOC en las variantes somaclonales de Taiwán ('GCTCV119' y 'Formosana'). En otros estudios Molina *et al.* (2016) compararon cuatro selecciones de variantes somaclonales ('GCTCV-105', 'GCTCV-119', 'GCTCV-218' y 'GCTCV-219') de Cavendish (AAA) de Taiwán; y tres cultivares locales importantes de Filipinas: 'Latundan' (AAB, subgrupo de Seda), 'Lakatan' (AAA, subgrupo Lakatan) y 'Saba' (ABB, subgrupo Saba) con el Cavendish comercial Gran Enano (AAA, subgrupo Cavendish) en un suelo severamente infestado con la RT4 de FOC en el sur de Filipinas. Los resultados mostraron susceptibilidad con una incidencia de la enfermedad de 64 y 76% respectivamente en los cultivares comerciales de Gran Enano y 'Lakatan' en el primer ciclo de evaluación de la resistencia; y de 79 y 92% respectivamente, en el segundo ciclo. Sin embargo, las variantes somaclonales 'GCTCV' manifestaron una incidencia de la enfermedad de 0 a 6% en el primer ciclo; y de 0 a 8% en el segundo ciclo de las pruebas de evaluación de los síntomas de la enfermedad. El cultivar 'Saba' mostró una incidencia de la enfermedad del 0% tanto en el primero como en el segundo ciclo de evaluación de la resistencia al hongo. Estos resultados confirmaron la estabilidad de la resistencia a la RT4 de FOC en las variantes somaclonales 'GCTCV'. Por otra parte, muestran que la selección de variantes somaclonales constituye una herramienta factible en el mejoramiento genético para la búsqueda de resistencia a FOC en banano.

#### Utilización de la mutagénesis *in vitro* inducida

Las técnicas mutagénicas que inducen cambios heredables en la constitución genética de una célula

been used as a very efficient tool in the genetic breeding of plants. In this sense, Chen *et al.* (2013) used *in vitro* mutagenesis, induced by ethyl methanesulfonate to evaluate the obtaining of lines of Brazilian banana (*Musa* spp., AAA) resistant to FOC RT4. The plants regenerated from the five Brazilian banana lines resistant to the RT4 of the pathogen then underwent an *in vitro* selection method, in which they displayed a reduction in the incidence of the disease in relation to plants used as a control. Meanwhile, Saraswathi *et al.* (2016) obtained banana mutants from the cultivar Rasthali (Silk, AAB), resistant to race 1 of FOC, vegetative compatibility group (GCV) [0124/5]. These results show that it is possible to adopt different biotechnological techniques for the genetic breeding of banana and obtain resistance to FOC.

#### Utilization of genetic transformation

The genetic transformation methods used to introduce into the cells the exogenous DNA to be expressed in the plant is another biotechnological technique for the development of resistance to fungi in economically important crops such as banana. Several genes have been used to fight this pathogen. In this sense, Paul *et al.* (2011) tested genes *Bcl-xl*, *Ced-9* and *Bcl-2 3' UTR* in the banana cultivar 'Lady Finger' (AA). The results showed the overexpression of gene *Bcl-2 3' UTR* in the lines that displayed resistance to FOC. On the other hand, they noticed apoptosis to be characteristic in host plants against necrotrophic pathogens, in which the pathogen caused the death of tissue and increased its growth potential faster. In another study, Ghag *et al.* (2012) inserted petunia (*Petunia hybrida*) genes that codify defensins *PhDef1* and *PhDef2* in banana plants, using embryogenic suspensions as explants and *Agrobacterium tumefaciens* as a transformation system, and found high levels of

mediante la alteración de su ácido desoxirribonucleico (ADN) han sido utilizadas como una herramienta muy eficiente en el mejoramiento genético de plantas. En este sentido, Chen *et al.* (2013) emplearon la mutagénesis *in vitro* inducida por el metanosulfonato de etilo para evaluar la obtención de líneas de banano brasileño (*Musa* spp., AAA) resistentes a la RT4 de FOC. Las plantas regeneradas a partir de las cinco líneas de banano brasileño resistentes a la RT4 del patógeno fueron sometidas a un método de selección *in vitro* posterior; donde mostraron una reducción en la incidencia de la enfermedad con relación a las plantas utilizadas como control. Mientras que Saraswathi *et al.* (2016) obtuvieron mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) resistentes a la raza 1 de FOC, grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [0124/5]. Estos resultados evidencian que es posible adoptar diferentes técnicas biotecnológicas para el mejoramiento genético del banano y obtener resistencia a FOC.

### Utilización de la transformación genética

Los métodos de transformación genética que se utilizan para introducir al interior de las células vegetales, el ADN exógeno que se quiere expresar en la planta constituye otra estrategia biotecnológica para el desarrollo de la resistencia a hongos en cultivos económicamente importantes como el banano. Varios genes han sido utilizados para combatir este patógeno. En este sentido Paul *et al.* (2011) ensayaron los genes *Bcl-xl*, *Ced-9* y *Bcl-2 3' UTR* en el cultivar de banano 'Lady Finger' (AA). Los resultados demostraron la sobreexpresión del gen *Bcl-2 3' UTR* en las líneas que manifestaron resistencia a FOC. Por otra parte, observaron como característico la apoptosis en plantas hospederas contra patógenos necrotróficos, donde el patógeno provocó la muerte del tejido e incrementó su potencial

constitutive expressions of these defensins in elite banana plants in the cultivar Rasthali (*Musa* AAB), which, in turn, displayed resistance to the infection with race 1 of FOC, in both *in vitro* and *in vivo* studies.

On the other hand, Mahdavi *et al.* (2012) showed the expression of genes of thaumatin in rice (*Oriza sativa*) in transgenic banana plants resistant to FOC TR4. Later, genes obtained from onions (*Allium cepa*) which are codifying for an antimicrobial protein (Ace-AMP1) were introduced and expressed in transgenic bananas (Mohandas *et al.*, 2013). Likewise, Ghag *et al.* (2014) developed a procedure for transformation in bananas mediated by *Agrobacterium* for the expression of *siRNAs* aimed at vital FOC genes. After eight months of evaluations, they obtained five transgenic lines with levels of resistance to FOC. In turn, Zhuang *et al.* (2016) demonstrated the antagonistic effect of multifunctional protein B4 from the virus *Banana bunchy top virus* (BBTV) against *F. oxysporum* in bananas. This offers new insights for the breeding of transgenic resistance to *Fusarium*, taking the virus-fungus interaction into consideration. Likewise, Dale *et al.* (2017) obtained two transgenic Cavendish lines, the first of which was transformed using gene *RGA2*, isolated from a diploid banana plant resistant to FOC RT4. The second line was transformed, using gene *Ced9* from nematodes. After three years of field tests, they displayed resistance to FOC RT4.

As these examples show, genetic transformation has been, in recent years, the biotechnological technique with the highest expectation for genetic breeding in the crop. However, most studies show no long-term field results to help evaluate the efficiency of the genes *in situ* (Ploetz, 2015). Hence the comprehension of the host-pathogen interaction in terms of defense, and the paths related to virulence mechanisms help identify the

de crecimiento más rápido. En otro estudio, Ghag *et al.* (2012) insertaron genes de petunia (*Petunia hybrida*) que codifican las defensinas *PhDef1* y *PhDef2* en plantas de banano usando como explantes suspensiones celulares embriogénicas; y como sistema de transformación el empleo de *Agrobacterium tumefaciens*, se encontraron altos niveles de expresión constitutiva de estas defensinas en plantas élites de banano en el cultivar Rasthali (*Musa AAB*); que a su vez mostraron resistencia contra la infección de la raza 1 de FOC en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otro lado, Mahdavi *et al.* (2012) demostraron la expresión de genes de taumatina de arroz (*Oriza sativa*) en plantas transgénicas de banano con resistencia a la TR4 de FOC. Posteriormente, genes obtenidos de cebolla (*Allium cepa*) codificantes para una proteína antimicrobiana (Ace-AMP1) fueron introducidos y expresados en bananos transgénicos (Mohandas *et al.*, 2013). Por otra parte, Ghag *et al.* (2014) desarrollaron un procedimiento de transformación en banano mediada por *Agrobacterium* para la expresión de *siRNAs* dirigidos contra genes vitales de FOC. Después de ocho meses de evaluación obtuvieron cinco líneas transgénicas con niveles de resistencia a FOC. Mientras que Zhuang *et al.* (2016) demostraron el efecto antagónico de la proteína multifuncional B4 del virus *Banana bunchy top virus* (BBTV) contra *F. oxysporum* en banano. Lo cual ofrece nuevos conocimientos para el mejoramiento de la resistencia transgénica a *Fusarium* teniendo en cuenta la interacción virus-hongo. Por otro lado, Dale *et al.* (2017) obtuvieron dos líneas de Cavendish transgénico: la primera línea fue transformada con el gen *RG2* aislado de un banano diploide resistente a la RT4 de FOC; y la segunda fue transformada con el gen *Ced9* derivado de nemátodos. Después de tres años de pruebas en campo demostraron resistencia a la RT4 de FOC.

critical steps to develop resistant cultivars using genetic approaches.

### Early resistance selection

The early selection of the resistance in plants to different special forms (f. sp.) of *F. oxysporum* has been an essential goal in conventional and biotechnological genetic breeding. This type of selection has increased due to the advances on studies on plant processes, on the biology of pathogens and on the understanding of the plant-pathogen interaction. The use of fungus culture filtrates (FCH) and toxins, and even dual cultures are promising for this process. The first and most crucial step when evaluating a new banana clone is selecting the resistance to the difference races of wilt by FOC (Buddenhagen, 2009). Therefore, the development of efficient methods to help select susceptible and resistant to this pathogen is a priority in the genetic breeding of this crop. To date, different groups of researchers have developed two selection systems for the resistance of banana plants to FOC: 1) selection *ex vitro* and *in vivo* by planting banana propagules in pots, or in the field with the inoculant of the natural or artificial fungus; 2) selection *in vitro*, using propagules or FCH and toxins as selection agents. Below are some of the experiences of the selection of the resistance of banana plants to FOC with the use of the selection systems mentioned.

### Ex vitro and in vivo evaluations of the resistance to the RT4 of FOC in banana propagules

The *ex vitro* and *in vivo* selections to evaluate the resistance to diseases have been the main selection methods for many years. They consist of the natural infection with spores from the fungus and are currently still being used. Below are the



Como se puede apreciar, en los últimos años la transformación genética constituye la técnica biotecnológica de mayor expectativa para el mejoramiento genético en el cultivo. Sin embargo, los resultados de campo a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ* no están presentes en la mayoría de los estudios (Ploetz, 2015). Por ello, la comprensión de la interacción hospedero-patógeno en términos de defensa; y las rutas relacionadas con los mecanismos de virulencia permite identificar pasos críticos para desarrollar cultivares resistentes empleando enfoques genéticos.

### Selección temprana de resistencia

La selección temprana de la resistencia en plantas frente a diferentes formas especiales (f. sp.) de *F. oxysporum* ha sido un objetivo primordial en el mejoramiento genético convencional y biotecnológico. La misma se ha incrementado por el avance en los estudios tanto de los procesos de la planta, y la biología de los patógenos como del entendimiento de la interacción planta-patógeno. El empleo de filtrados del cultivo de hongos (FCH) y toxinas e incluso cultivos duales para este proceso son prometedores. El primero y más crucial de todos los pasos al evaluar un nuevo clon de banano es la selección de la resistencia a las diferentes razas de marchitez por FOC (Buddenhagen, 2009). Por lo tanto, constituye una prioridad el desarrollo de métodos eficientes que permitan seleccionar cultivares susceptibles y resistentes a este patógeno, en el mejoramiento genético en el cultivo. Hasta el momento, diferentes grupos de investigadores han desarrollado dos sistemas de selección para la resistencia del banano a FOC: 1) selección *ex vitro* e *in vivo* mediante plantación de propágulos de banano en macetas, y en campo con inóculo del hongo natural o artificial; 2) selección *in vitro* utilizando como

results of the evaluation for resistance to FOC RT4 of banana cultivars, plantains and Cavendish somaclonal variants with those selection systems, provided by the Taiwan Banana Research Institute (Huang *et al.*, 2005).

Dita *et al.* (2011) obtained a quick and reliable bioassay for the evaluation of resistance to FOC RT4 under greenhouse conditions. They used a double pot system, following Mohamed *et al.* (2000). The roots of seedlings from the *in vitro* culture of the cultivar Gran Enano (grupo AAA) were cut at a length of approximately 40 cm. They then carried out the inoculation process individually with three isolations of the RT4 of the fungus (NRRL36114, FOC-115 and BPS3.4) of the GCV [01213] and one isolation of race 1, CNPMFO8-R1. The inoculation was carried out by submerging the root for 30 minutes in a suspension of  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> of the fungus. The inoculated seedlings were planted in 8 L pots containing sterile river sand as a substrate and supplemented with 20 g of maize grains pre-colonized with FOC. The evaluation of the resistance was carried out between days 7 and 40 after the inoculation of the seedlings by evaluating the internal symptoms and the decoloring of the rhizome. The results showed that the bioassay described under controlled greenhouse conditions was reliable to obtain a response of resistance on the reaction of the host to FOC. In addition, the bioassay presented a useful tool to carry out accurate studies in the plant-pathogen interaction. In this sense, Li *et al.* (2015) studied the resistance to FOC RT4 in eight genotypes of wild banana plants (*Musa acuminata* subsp. *burmannica*, *M. balbisiana*, *M. basjoo*, *M. itinerans*, *M. nagensium*, *M. ruiliensis*, *M. velutina* and *M. yunnanensis*) under greenhouse and field conditions. For the greenhouse tests, the banana seedlings from the *in vitro* culture were inoculated by punching holes at the bottom of the pseudostem,

agente de selección propágulos o FCH y toxinas. A continuación, se recogen algunas experiencias de la selección de la resistencia del banano a FOC con el uso de los sistemas de selección mencionados.

### Evaluación *ex vitro* e *in vivo* de la resistencia a la RT4 de FOC en propágulos de banano

La selección *ex vitro* e *in vivo* para evaluar la resistencia a enfermedades constituyen los principales métodos de selección desde hace muchos años. Consisten en la infección natural con esporas provenientes del hongo y en la actualidad continúan siendo utilizados. Seguidamente, se muestran resultados en la evaluación para resistencia a la RT4 de FOC de cultivares de bananos, plátanos y variantes somaclonales de Cavendish mediante estos sistemas de selección proporcionados por el Instituto de Investigaciones del Plátano de Taiwán (Cuadro 1) (Huang *et al.*, 2005).

Dita *et al.* (2011) obtuvieron un bioensayo rápido y confiable para la evaluación de la resistencia a la RT4 de FOC en condiciones de invernadero.

along with a suspension of  $5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus. After this process, the resistance was selected every day for 65 days by evaluating the expression of internal and external symptoms of the disease in the seedlings. For external symptoms, it was carried out using a grading scale with four categories: 0 = no symptoms; 1 = initial yellowing, mainly on the lower leaves; 2 = yellowing of all the lower leaves with a certain decoloring of the youngest leaves; 3 = all leaves with intense yellowing or dead plant. Meanwhile, the internal symptoms were evaluated using a scale based on the decoloring of the rhizome: 0 = no symptoms, 1 = 1 - 20%, 2 = 21 - 40% and 3 = > 40% of decolored rhizomes. The field selection test was carried out on an experimental field naturally infested with FOC RT4. The evaluation of the expression of external symptoms of the disease was carried out every two weeks for 12 months after planting and internal symptoms were evaluated at the end of the experiment (12 months) according to the scale. The results showed that there are different sources of resistance to FOC RT4, which is an important

**Cuadro 1. Resultados en la evaluación para resistencia a la RT4 de FOC de cultivares de bananos, plátanos y variantes somaclonales de Cavendish.**  
**Table 1. Results in the evaluation for resistance to RT4 of FOC in banana, plantains and somaclonal variants of Cavendish cultivars.**

| Cultivar    | Lugar  | Respuesta a RT4 de FOC | Referencia  |
|-------------|--|------------------------|---|
| 'FHIA 01'   | FAO, Malasia   | Resistente             | Huang <i>et al.</i> (2005)                                |
| 'FHIA 02'   | International <i>Musa</i> Testing Programme, Phase III (IMTP III) China  | Resistente             | Huang <i>et al.</i> (2005)                                |
| 'FHIA 03'   | Journal of Tropical Crops China  | Resistente             | Zisi <i>et al.</i> (2009)                                 |
| 'FHIA 17'   | Papua New Guinea   | Resistente             | Molina <i>et al.</i> (2011)                               |
| 'FHIA 18'   | Journal of Tropical Crops China  | Altamente Resistente   | Zisi <i>et al.</i> (2009)                                 |
| 'FHIA 21'   | International <i>Musa</i> Testing Programme, Phase III (IMTP III), China | Resistente             | Molina <i>et al.</i> (2011)<br>Huang <i>et al.</i> (2005) |
| 'FHIA 23'   | FHIA: Bananas Database   | Susceptible            | Houbin <i>et al.</i> (2004)                               |
| 'FHIA 25'   | Journal of Tropical Crops China  | Altamente Resistente   | Zisi <i>et al.</i> (2009)                                 |
|             | Papua New Guinea   | Resistente             | Molina <i>et al.</i> (2011)                               |
| 'FORMOSANA' | Taiwan   | Resistente             | Hwang y Ko (2007)   |

Para ello utilizaron un sistema de doble maceta según Mohamed *et al.* (2000). Las plántulas provenientes del cultivo *in vitro* del cultivar Gran Enano (grupo AAA) les realizaron cortes a las raíces a una longitud aproximadamente de 40 cm. Después, realizaron el proceso de inoculación de forma individual con tres aislados de la RT4 del hongo (NRRL36114, FOC-115 y BPS3.4) del GCV [01213]; y un aislado de la raza 1, CNPMFO8-R1. La inoculación se realizó mediante la inmersión de la raíz durante 30 minutos en una suspensión de  $10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Las plántulas inoculadas fueron sembradas en macetas de 8 L que contenían como sustrato arena de río estéril; y suplementada con 20 g de granos de maíz pre-colonizados con FOC. La evaluación de la resistencia se realizó a los siete hasta los 40 días después de la inoculación de las plántulas, mediante la evaluación de los síntomas internos y la decoloración del rizoma. Los resultados mostraron que el bioensayo descrito en condiciones controladas de invernadero fue confiable para obtener una respuesta de resistencia en la reacción del huésped a FOC. Además, el bioensayo mostró una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno. En este mismo sentido, Li *et al.* (2015) estudiaron la resistencia a la RT4 de FOC en ocho genotipos silvestres de banano (*Musa acuminata* subsp. *burmannica*, *M. balbisiana*, *M. basjoo*, *M. itinerans*, *M. nagen-sium*, *M. ruiliensis*, *M. velutina* y *M. yunnanensis*) en condiciones de invernadero y en campo. Para las pruebas en invernadero procedieron a la inoculación de las plántulas de banano provenientes del cultivo *in vitro* mediante la punción de orificios en la base del pseudotallo; con una suspensión de  $5 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Después de este proceso, realizaron la selección de la resistencia cada dos días hasta los 65 días mediante la evaluación de la expresión de los síntomas internos y externos de la enfermedad en las plántulas. Para los síntomas

genetic resource for banana genetic breeding programs that intend to obtain cultivars resistant to wilt by FOC RT4. However, studies related to the resistance to FOC RT4 continue, as indicated with examples in Table 1.

### ***In vitro* selection using propagules or filtrates of the fungal culture and toxins**

Wu *et al.* (2010) developed an *in vitro* bioassay methodology for the early detection of resistance or susceptibility to FOC RT4 in six cultivars of *Musa* (Brazil Xiangjiao subgroup AAA, Guangfen Num.1 subgroup ABB, Formosana subgroup AAA, Nongke No.1 subgroup AAA, GCTCV-119 subgroup AAA and Dongguan Dajiao subgroup AAA). The rooted *in vitro* banana seedlings were inoculated in their culture medium via a suspension of  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of FOC. After 24 days of inoculation, the selection of the resistance to the pathogen was carried out on the banana seedlings using a scale of 0 to 6 degrees of severity, suggested by the same authors. The results showed that the two susceptible cultivars (Brazil Xiangjiao and Guangfen No.1) presented the highest degrees of severity of the disease in comparison with the four resistant cultivars tested (Formosana, Nongke No.1, GCTCV-119 and Dongguan Dajiao). This shows that the promising resistant clones obtained with traditional genetic breeding techniques can be directly analyzed using the *in vitro* bioassay described. This method is more time-efficient, since it requires no acclimatization stage for the plants. Meanwhile, Saraswathi *et al.* (2016) carried out the selection of mutants of banana plants of the Rasthali cultivar (Silk, AAB) with resistance to race 1 of the FOC GCV [0124/5] by *in vitro* selection, using FCH and the toxin (fusaric acid) as selection agents. The individual buds of the banana mutants obtained after the third or fourth subculture were

externos, fue mediante una escala de calificación de cuatro clases: 0 = sin síntomas; 1 = amarillamiento inicial, principalmente en las hojas inferiores; 2 = amarillamiento de todas las hojas inferiores con cierta decoloración de las hojas más jóvenes; 3 = todas las hojas con intenso amarilleamiento o planta muerta. Mientras que los síntomas internos fueron evaluados por medio de una escala basada en la decoloración del rizoma: 0 = sin síntomas, 1 = 1 - 20%, 2 = 21 - 40% y 3 = > 40% de rizoma descolorido. La prueba de selección en campo se realizó en una parcela experimental infestada de forma natural con la RT4 de FOC. La evaluación de expresión de los síntomas externos de la enfermedad se realizó cada dos semanas hasta los 12 meses después de la siembra; y, los síntomas internos se evaluaron al final del experimento (12 meses) de acuerdo a la escala. Los resultados mostraron que existen diferentes fuentes de resistencia a la RT4 de FOC, lo cual constituyen un importante recurso genético para los programas de mejoramiento genético del banano con el interés de obtener cultivares resistentes al marchitamiento para la RT4 de FOC. Sin embargo, se continúan los estudios relacionados a la resistencia a RT4 de FOC como se indican solo algunos.

### **Selección *in vitro* con uso de propágulos o filtrados del cultivo del hongo y toxinas**

Wu *et al.* (2010) desarrollaron una metodología de bioensayo *in vitro* para la temprana detección de la resistencia o susceptibilidad a la RT4 de FOC en seis cultivares de *Musa* (Brazil Xiangjiao subgrupo AAA, Guangfen No.1 subgrupo ABB, Formosana subgrupo AAA, Nongke No.1 subgrupo AAA, GCTCV-119 subgrupo AAA y Dongguan Dajiao subgrupo AAA). Las plántulas enraizadas *in vitro* de banano fueron inoculadas en su medio de cultivo mediante una suspensión de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$

transferred to the multiplication culture medium and supplemented with different concentrations of the toxin (commercial fusaric acid) (Sigma Aldrich, U.S.A.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 and 0.0625 mM) and with concentrations of 3, 4, 5, 6, 7 and 8% of the FCH; in addition, they added growth regulator. After three weeks, they observed a survival rate of 50% for the explants in the concentration of 0.050 mM of the toxin and 7% with the filtrate of the fungal culture. In higher concentrations, they observed a rapid reduction in the growth of the banana mutant buds. After three months, the selected mutants were transferred in order to carry out the tests in pots under conditions controlled by the inoculation into the substrate with a suspension of spores of  $12 \times 10^9$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus. After six months of the process of evaluation of the resistance, three putative mutants were obtained with resistance to FOC race 1, which were massively multiplied *in vitro* to continue other studies on the interaction.

It is worth pointing out that in order to establish resistance selection systems, determining a correct concentration of the filtrate of the pathogen culture or toxin is necessary for the expression of the differential phytotoxic activity between varieties. This increases the possibilities of obtaining stable lines for disease-resistant plants (Švábová and Lebeda, 2005). As indicated, even when *in vitro* selections are carried out, allegedly resistant plants must undergo field studies. The disease caused by FOC has relatively long incubation periods under these conditions. In other words, many months can go by between the infection of the roots and the yellowing and collapse of the limbo of the leaves (external symptoms). Therefore, a large number of plants must be followed up for a prolonged time.

The above statements indicate the need to develop alternative, quick and non-destructive methods for the selection of resistance of banana

de FOC. Después de 24 días de la inoculación se realizó la selección de la resistencia al patógeno sobre las plántulas de banano mediante una escala de 0 a 6 grados de severidad, propuesta por los mismos autores. Los resultados mostraron que los dos cultivares susceptibles (Brazil Xiangjiao y Guangfen No.1) presentaron los mayores grados de severidad de la enfermedad, en comparación con los cuatro cultivares resistentes probados (Formosana, Nongke No.1, GCTCV-119 y Dongguan Dajiao). Lo cual evidencia que los prometedores clones resistentes obtenidos mediante técnicas de mejoramiento genético tradicionales pueden ser analizados de forma directa mediante el bioensayo *in vitro* descrito; este método eficientiza los tiempos dado a que no necesita una etapa de aclimatización para las plántulas. Mientras, Saraswathi *et al.* (2016) realizaron la selección de los mutantes de banano del cultivar Rasthali (Silk, AAB) con resistencia a la raza 1 del GCV [0124/5] de FOC mediante la selección *in vitro*. Para ello, utilizaron como agentes de selección el FCH y la toxina (ácido fusárico). Los brotes individuales de los mutantes de banano obtenidos después del tercer o cuarto subcultivo fueron transferidos al medio de cultivo de multiplicación, suplementado con diferentes concentraciones de la toxina (ácido fusárico comercial) (Sigma Aldrich, EE. UU.) (0.0125; 0.025; 0.0375; 0.05 y 0.0625 mM); y a las concentraciones de 3, 4, 5, 6, 7 y 8% del FCH. Además, añadieron el regulador de crecimiento. Después de tres semanas observaron el 50% de supervivencia de los explantes en la concentración de 0.050 mM de la toxina y 7% con el filtrado del cultivo del hongo. En concentraciones superiores observaron una rápida disminución en el crecimiento de los brotes de los mutantes de banano. A los tres meses siguientes, los mutantes seleccionados fueron transferidos para realizar las pruebas en macetas, en condiciones controladas mediante la inoculación al sustrato con una suspensión

to FOC in the resistance selection test under field conditions. In this sense, Companioni *et al.* (2003) developed a procedure for the foliar differentiation of resistance and susceptibility of banana cultivars to FOC race 1, GCV [01210] by means of leaves-boring bioassay (bioassay on banana detached leaves) in and the application of FCH. The evaluation bioassay consisted in collecting middle-aged banana cultivar leaves in the field: Gros Michel (group AAA, susceptible) and FHIA-01 (group AAAB, resistant), on which FCH was applied. The application was made on three different positions of the adaxial side of the leaf limbo: distal, middle and proximal. After 48 hours, the phytotoxic activity of the fungal culture filtrates was evaluated with the symptomatological expression of necrosis formed around the point of application of FCH, expressed as the area of the elliptic lesion (mm<sup>2</sup>) (Figure 3). Forty-eight hours after the FCH was applied on banana leaves, the greatest statistical differences between cultivars were observed.

Other studies (Companiononi *et al.*, 2005; 2012) included evaluations of other indicators, such as biochemical components (Figure 4). The discriminant analysis for the differentiation of resistance and susceptibility of banana cultivars, used in the genetic breeding program, is a novel aspect in this investigation.

This estimation was carried out using a data matrix that included the effect of the FCH (area of the lesion and levels of phenols, both free and linked to the cell walls, aldehydes except malondialdehyde, and proteins) on the leaves of 18 cultivars. After the discriminant analysis, two functions were obtained; one for resistant cultivars and the other for susceptible ones. Each plant of the matrix was evaluated according to discriminant functions and classified as resistant or susceptible for 94.4% of all cases (68 plants out of 72). The



de esporas de  $12 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo. Posterior a los seis meses del proceso de evaluación de la resistencia obtuvieron tres mutantes putativos resistentes a la raza 1 de FOC. Los cuales fueron multiplicados *in vitro* de forma masiva para continuar otros estudios en la interacción.

Es importante señalar que, para el establecimiento de sistemas de selección de la resistencia es necesaria la determinación de una concentración correcta del filtrado del cultivo patógeno o toxina, para la expresión de la actividad fitotóxica diferencial entre variedades. Lo cual incrementa las posibilidades de obtener líneas estables de plantas con resistencia a las enfermedades (Švábová y Lebeda, 2005). Como se puede mostrar, aunque se realicen selecciones *in vitro* las plantas supuestamente resistentes deben someterse a estudios en campo. La enfermedad causada por FOC tiene períodos relativamente largos de incubación bajo estas condiciones. En otras palabras, desde la infección de las raíces hasta el amarillamiento y colapso del limbo de las hojas (síntomas externos) pueden transcurrir varios meses. Por lo tanto, se debe realizar un seguimiento a un gran número de plantas durante un prolongado tiempo.

Los planteamientos anteriores indican la necesidad del desarrollo de métodos alternativos, rápidos y no destructivos para la selección de la resistencia del banano a FOC en las pruebas de selección de resistencia en condiciones de campo. En este aspecto, Companioni et al. (2003) desarrollaron un procedimiento para la diferenciación foliar de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano a la raza 1 de FOC, GCV [01210] mediante el bioensayo de punteadura en hojas (bioensayo en hojas de banano desprendidas); y la aplicación de FCH. El bioensayo de evaluación consistió en la colecta en campo de hojas de mediana edad de dos cultivares de banano: Gros Michel (grupo AAA, susceptible) y FHIA-01 (grupo AAAB, resistente); a los

described method is a useful tool to increase the efficiency of the selection under *ex vitro* and *in vivo* conditions, regardless of environmental conditions or the favorable season for the development of the disease. It also helps evaluate an important number of samples in the laboratory and to speed up the genetic breeding programs for this disease. For this reason, García *et al.* (2020) proved that the method to differentiate the susceptibility or resistance to *Fusarium* described earlier can be carried out quickly and in a non-destructive way with the use of treated FCH on the leaves for different populations of the pathogens. This could be applicable to the genetic breeding programs for musaceae, both conventional and biotechnological. On the other hand, they lay the foundations for future projects related to the identification of the specificity of alleged avirulence genes of the causal agent. In this regard, Portal *et al.* (2018) studied the toxic components of FCH of race 1 of FOC GCV [01210] using the bioassay described by Companioni *et al.* (2003) and they isolated the extracellular microbial metabolites implied in the response of the plant. In the latter, they obtained a culture filtrate of the specific host and they characterized the phytotoxic compounds such as fusaric acid, bovericin and fumonisin B1. These results are the basis for the direct isolation of avirulence genes of the pathogen and genes for the resistance in banana plants via advanced genetics for use in genetic breeding programs for the crop.

The results presented in this revision show the potential of plant biotechnology and other tools in the field of genetic breeding for the crop, in which biotechnological techniques constitute feasible tools in the search for resistance to FOC. In this regard, genetic transformation is the biotechnological technique with the highest expectations in recent years. However, most field studies lack long-term results that contribute to the evaluation of

que se les aplicó el FCH. La aplicación se realizó en tres posiciones diferentes en el lado adaxial del limbo de la hoja: distal, media y proximal. Transcurridas 48 horas se evaluó la actividad fitotóxica de los filtrados del cultivo del hongo, a través de la expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del FCH, expresada como área de la lesión elíptica ( $\text{mm}^2$ ) (Figura 3). A las 48 horas de la aplicación del FCH en las hojas de banano se observaron las mayores diferencias estadísticas entre los cultivares.

En otros estudios (Companioni *et al.*, 2005; 2012) incluyeron evaluaciones de otros indicadores, tales como componentes bioquímicos (Figura 4). El análisis de la discriminante para la diferenciación de la resistencia y susceptibilidad de cultivares de banano, utilizado en el programa de mejoramiento genético constituye un aspecto novedoso en esta investigación. Tal estimación se realizó a partir de una matriz de datos que incluyó el efecto del FCH (área de la lesión y niveles de fenoles libres y ligados a las paredes celulares, aldehídos, excepto malondialdehído, y proteínas) en hojas de dieciocho cultivares. Tras el análisis discriminante, se obtuvieron dos funciones, una para los cultivares resistentes, y otra para los susceptibles. Se evaluó cada planta de la matriz, según las funciones discriminantes; y estas se clasificaron en resistentes o susceptibles al 94.4% de los casos (68 de 72 plantas). El método descrito constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia de la selección en condiciones *ex vitro* e *in vivo*, sin tener en cuenta las condiciones ambientales, y la época del año favorable para el desarrollo de la enfermedad. También permite evaluar un número importante de muestras en condiciones de laboratorio, y acelerar los programas de mejoramiento genético a esta enfermedad. Lo cual evidencia el potencial de la biotecnología en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Por tal motivo, García *et al.*

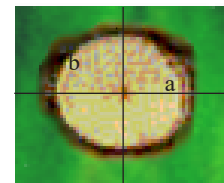
$$A = \pi/4 ab$$

A – área de la elipse ( $\text{mm}^2$ ).

a – semi-eje mayor (mm).

b – semi-eje menor (mm).

$$\pi - 3.14$$



**Figura 3.** Expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del filtrado del cultivo del hongo, expresada como área de la lesión elíptica ( $\text{mm}^2$ ).

**Figure 3.** Symptomatologic expression of necrosis formed around the point of application of the fungal culture filtrate, expressed as the area of the elliptical lesion ( $\text{mm}^2$ ).

genes *in situ*. Therefore, understanding the host-pathogen interaction in terms of defense and the paths related to the virulence mechanisms help identify critical steps towards the development of resistant cultivars using genetic approaches. However, the selection systems for resistance to this disease under field conditions are laborious, destructive and time-consuming. For these reasons, the development of efficient methods for the early selection of resistance to FOC are a useful tool for accurately studying the plant-pathogen interaction and increasing the efficiency of genetic breeding for the crop.

## Perspectives

Scientific studies reported globally, related to the host-pathogen interaction of the binome *Musa* spp. and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, indicate that the current and future tendency is the search for materials resistant to the pathogen via diverse biotechnology techniques, such as somaclonal variation, induced *in vitro* mutagenesis and genetic transformation itself, which are supported by methodologies for the early detection

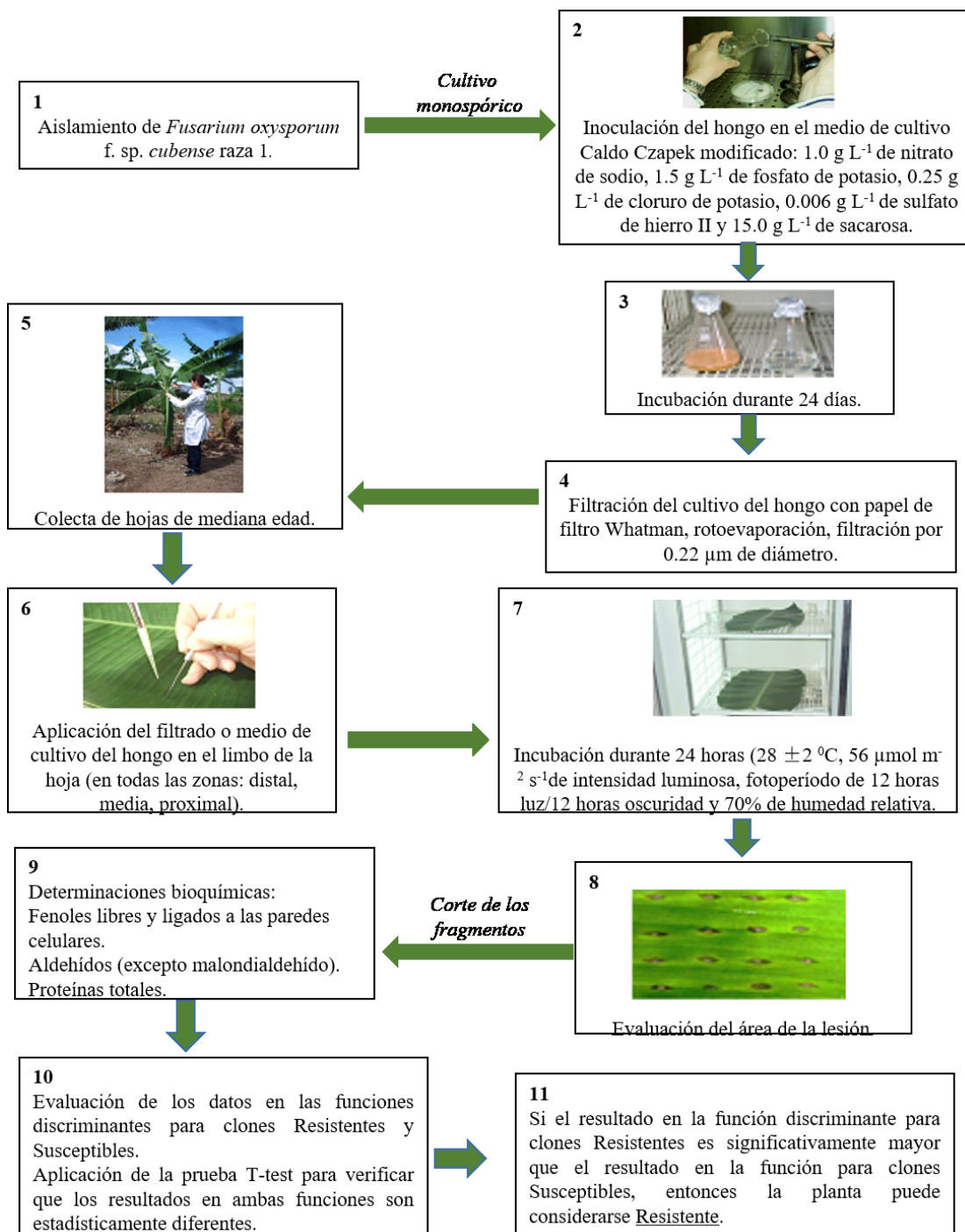


Figura 4. Método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en banana según Companioni *et al.* (2012).

Figure 4. Method to differentiate the resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 in banana plants at a foliar level, according to Companioni *et al.* (2012).

(2020) demostraron que el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia a marchitez por *Fusarium* descrito con anterioridad puede realizarse de forma rápida, y no destructiva con el uso del FCH tratados en las hojas para diferentes poblaciones del patógeno. Lo cual podría ser aplicable para los programas de mejoramiento genético de musáceas tanto convencional como biotecnológicas. Por otro lado, propician las bases para futuros proyectos relacionados con la identificación de los metabolitos fitotóxicos, y de la especificidad de presuntos genes de avirulencia del agente causal. En este aspecto, Portal *et al.* (2018) estudiaron mediante el bioensayo descrito por Companioni *et al.* (2003) los componentes tóxicos de los FCH de la raza 1 de FOC GCV [01210]; y aislaron los metabolitos microbianos extracelulares implicados en la respuesta de la planta. Donde obtuvieron un filtrado de cultivo del hospedero específico, y caracterizaron los compuestos fitotóxicos como ácido fusárico, bovericina y fumonisina B1. Estos resultados constituyen la base para el aislamiento directo de genes de avirulencia del patógeno, y genes de resistencia en banano mediante la genética avanzada para su uso en programas de mejoramiento genético en el cultivo.

Los resultados presentados en esta revisión evidencian el potencial de la biotecnología vegetal y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Donde las técnicas biotecnológicas constituyen herramientas factibles en la búsqueda de la resistencia a FOC. En este sentido, la transformación genética representa la técnica biotecnológica de mayor expectativa en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ*. Por ello, la comprensión de la interacción hospedero-patógeno en términos de defensa; y las rutas relacionadas con los mecanismos de virulencia

of resistance, with partially successful results thus far. Diverse work groups have been formed to face this phytopathological problem; those in Southeast Asia are particularly important, since it is where FOC RT4 was first detected, in 1990. In June of 2019, plants with FOC symptoms were observed in Colombia, only 19 years later. This was a warning for OIRSA member countries, including Mexico, and by July 25, 2019, the SADER-SENASICA (2019) claimed to be ready to prevent the entry of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* RT4 into the country, and reinforced security and prevention measures to mitigate the risk of its entry. It also made a priority out of training technicians and farmers, in which epidemiological surveillance was crucial. Regarding scientific research to face the problem that draws near, little progress has been made in Mexico. It is therefore crucial for research-focused institutions to address this problem.

## CONCLUSIONS

The results presented in this revision show the potential of plant biotechnology and other tools in the field of genetic breeding in the crop. They help speed up the genetic breeding programs for resistance to this disease. The genetic transformation is the biotechnological technique that has provided the greatest expectations in recent years. However, most field studies lack long-term results that help evaluate the efficiency of the genes *in situ*. Due to this, the development of efficient methods for the early selection of resistance to FOC is a useful tool to carry out accurate studies in the plant-pathogen interaction and to increase the efficiency of the genetic breeding programs for resistance to FOC in the crop.

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

permite identificar pasos críticos para desarrollar cultivares resistentes empleando enfoques genéticos. Pero, los sistemas de selección para la resistencia a esta enfermedad en condiciones de campo resultan trabajosos, destructivos y consumen mucho tiempo. Por estas razones, el desarrollo de métodos eficientes para la selección temprana de la resistencia a FOC constituye una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno; y aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético en el cultivo.

### Perspectivas

Estudios científicos reportados en todo el mundo relacionados a la interacción hospedante-patógeno del binomio *Musa* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* indican que la tendencia en el presente y futuro es la búsqueda de materiales resistentes al patógeno mediante el uso de las diversas técnicas de la biotecnología como lo son la variación somaclonal, mutagenesis *in vitro* inducida y la transformación genética mismas que son apoyadas con metodologías para la detección temprana de la resistencia; con resultados parcialmente exitosos hasta ahora. Grupos diversos de trabajo se han formado para afrontar este problema fitopatológico, destacan los del continente asiático donde se detectó por primera vez e FOC RT4 en 1990. En junio de 2019 se observaron plantas con síntomas de FOC en Colombia, tan solo 19 años después. Esto alertó a los países miembros del OIRSA del cual México forma parte; para el 25 de julio de 2019, a través de la SA-DER-SENASICA (2019) señaló estar preparado para prevenir la entrada al país del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* RT4. Reforzar las medidas de vigilancia y prevención sanitarias para mitigar el riesgo de entrada; así como la capacitación de técnicos y productores son prioridad, donde el programa de vigilancia epidemiológica forma parte

fundamental. En relación a investigación científica para enfrentar este problema que se avecina poco se ha avanzado en México. Por lo que, es una necesidad inminente que instituciones enfocadas a la investigación aborden este problema.

### CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta revisión muestran el potencial de la biotecnología vegetal y otras herramientas en el campo del mejoramiento genético en el cultivo. Los cuales permiten acelerar los programas de mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad. La transformación genética representa la técnica biotecnológica de mayor expectativa en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios de campo carecen de resultados a largo plazo que contribuyan a evaluar la eficacia de los genes *in situ*. Por ello, el desarrollo de métodos eficientes para la selección temprana de la resistencia a FOC constituye una herramienta útil para realizar estudios precisos en la interacción planta-patógeno; y aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético para la resistencia a FOC en el cultivo.

### LITERATURA CITADA

- Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gómez C and Mercado J. 2019. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiological* 10: 616. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Buddenhagen IW. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828(828): 193-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.828.19>
- Chen YF, Chen W, Huang X, Hu X, Zhao JT, Gong Q, Li XJ and Huang XL. 2013. *Fusarium* wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-cross-section cultural system. *Plant Pathology* 62(1): 112-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02620.x>



- Companiononi B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez MC, Borrás O, Lorenzo JC and Santos R. 2003. Use of *in vitro* culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 filtrates for rapid and non-destructive differentiation of field-grown banana resistant from susceptible clones. *Euphytica* 130: 341-347. <https://doi.org/10.1023/A:1023027604627>
- Companiononi B, Lorenzo JC y Santos R. 2012. Nuevo método para la diferenciación al Mal de Panamá en banano. Editorial Académica Española. <http://www.eae-publishing.com>
- Companiononi B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arzola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2005. Identification of discriminant factors alter treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. *Plant Breeding* 124: 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00997.x>
- Cruz VM, Kilian A and Dierig DA. 2013. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop lesquerella and related species. *PLoS One* 8: 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064062>
- Dale JL, James A, Paul JY, Khanna H, Smith M, Peraza-Echeverria S, Garcia-Bastidas F, Kema G, Waterhouse P, Mengersen K and Harding R. 2017. Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications (United Kingdom)* 8 (1):1496. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond K, Di Prieto A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster G. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dita MA, Waalwijk C, Paiva LV, Souza MT and Kema GHJ. 2011. A greenhouse bioassay for the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* x 'Grand Naine' (*Musa*, AAA, Cavendish subgroup) interaction. *Acta Horticulturae* 897: 377-380. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.897.51>
- Dong X, Ling N, Wang M, Shen Q and Guo S. 2012. Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology Biochemistry* 60: 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.004>
- FAO. 2017. Global programme on banana *Fusarium* wilt disease: Protecting banana production from the disease with focus on tropical race 4 (TR4). FAO, Rome, ITA. <http://www.fao.org/3/a-i7921e.pdf>
- Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR and Viljoen A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied Environmental Microbiology* 75: 4770-4781. <https://doi.org/10.1128/AEM.00370-09>
- Fu L, Penton CR, Ruan Y, Shen Z, Xue C, Li R and Shen Q. 2017. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry* 104: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008>
- García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Yanes-Paz E, Lorenzo-Feijoo JC. y Companiononi-González B. 2020. Método rápido aplicado en la evaluación previa de la resistencia del banano al *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(2): 389-397. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-1>
- García-Bastidas F, Quintero J, Ayala M, Schermer T, Seidl M, Santos M, Noguera AM, Aguilera C, Wittenberg A, Sørensen A, Hofstede R and Kema GHJ. 2019. First report of *Fusarium* wilt tropical race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Disease notes*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
- Ghag SB, Shekhawat UK and Ganapathi TR. 2012. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS One* 7: 39557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039557>
- Ghag SB, Shekhawat UK and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12: 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Groenewald S, van der Berg N, Marasas WFO and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Australasian Plant Pathology* 35: 401-409. <https://link.springer.com/article/10.1071/AP06041>
- Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, Zhu Y, Feng Y, Wang G, Peng C, Jiang X, Zhou D, Ni P, Liang C, Liu L, Wang J, Mao C, Fang X, Peng M and Huang J. 2014. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS ONE* 9(4): e95543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543>
- Houbin C, Chunxiang X, Qirui F, Guibing H, Jianguo L, Zehuai W and Molina AB Jr. 2004. Screening of banana clones for resistance to fusarium wilt in China. In: Molina AB, Xu LB, Roa VN, Van den Bergh I. and Borromeo KH (eds.). *Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific*, Vol.13. Proceedings of the 3rd BAPNET Steering Committee meeting held in Guangzhou, China, 23-26 November, 2004. 165-174 p.
- Howang SC and Ko WH. 2007. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease* 88(6): 580-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.580>
- Huang BZ, Xu LB and Molina AB. 2005. Preliminary evaluation of IMTP-III varieties and local cultivars against *Fusarium* wilt disease in southern China. In: Molina AB, Xu LB, Roa VN, Van den Bergh I. and Borromeo KH (eds.). *Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific*, Vol.13. Proceedings of the 3rd BAPNET Steering Committee meeting held in Guangzhou, China, 23-26 November, 2004. 187-192 p.
- Li WM, Dita M, Wub W, Hua GB, Xie JH and Geb XJ. 2015. Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in banana wild relatives. *Plant Pathology* 64: 1061-1067. <https://doi.org/10.1111/ppa.12340>
- Lin YH and Lin YL. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Nature and Science* 2(10): e239. Disponible en línea: <http://www.jnsoci.org/files/article/2016/e239.pdf>

- Mahdavi F, Sariah M and Maziah M. 2012. Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium* wilt. *Applied Biochemistry Biotechnology* 166 (4): 1008-1019. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9489-3>
- Manzo G, Orozco M, Martínez L, Garrido E y Canto B. 2014. Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(2): 89-107. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_02.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_02.pdf)
- Martínez GE, Rey JC, Pargas RE y Manzanilla EE. 2020. Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana* 31(1): 259-276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Mohamed AA, Mak C, Liew KW and Ho YW. 2000. Early evaluation of banana plants at nursery stage for *Fusarium* wilt tolerance. In: Molina AB, Masdek NK and Liew KW (eds.). *Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation*, proc. int. workshop on the Banana *Fusarium* wilt disease, Genting Highlands Resort, Malaysia, 18-20 October 1999. 174-185 p.
- Mohandas S, Sowmya HD, Saxena AK, Meenakshia S, Thilaka RR and Mohmood Riaz. 2013. Transgenic banana cv. 'Rasthali' (AAB, Silk gp) harbouring Ace-AMP1 gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Scientia Horticulturae* 164: 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.018>
- Molina AB, Sinohin VG, Fabregar E, Ramillete EB, Loayan MM and Chao CP. 2016. Field resistance of Cavendish somaclonal variants and local banana cultivars to tropical race 4 of *Fusarium* wilt in the Philippines. *Acta Horticulturae* 1114: 227-230. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1114.31>
- Molina AB, Fabregar EG, Ramillete EG, Sinohin VO and Viljoen A. 2011. Field resistance of selected banana cultivars against tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Philippines. *Phytopathology* 101: S122-S122. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16107.23844>
- Molina AB, Fabregar EG, Soquita RO and Sinohin VGO. 2011. Comparison of host reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 and agronomic performance of somaclonal variant 'GCTCV-119' (AAA, Cavendish) and 'Grand Naine' (AAA, Cavendish) in commercial farms in the Philippines. *Acta Horticulturae* 897(897): 399-402. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.897.55
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. University Park of London.
- Ortiz R and Swennen R. 2014. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotechnology Advances* 32(1): 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.010>
- Paul JY, Becker DK, Dickman MB, Harding RM, Khanna HK and Dale JL. 2011. Apoptosis-related genes confer resistance to *Fusarium* wilt in transgenic 'Lady Finger' bananas. *Plant Biotechnology Journal* 9(9): 1141-1148. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00639.x>
- Ploetz RC. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105: 1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Ploetz RC. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96(6): 653-656. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>
- Portal N, Soler A, Alphonsine PAM, Borrás-Hidalgo O, Portielles R, Peña-Rodríguez LM, Yanes E, Herrera L, Solano J, Ribadeneira C, Walton JD and Santos R. 2018. Nonespecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Plant Pathology* 67(2): 467-476. <https://doi.org/10.1111/ppa.12736>
- SADER-SENASICA. 2019. Acuerda SENASICA y productores de plátano acciones conjuntas para prevenir entrada de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/articulos/acuerda-senasica-y-productores-de-platano-acciones-conjuntas-para-prevenir-entrada-de-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-raza-4-tropical-210454?idiom=es>.
- Saraswathi M, Kannan G, Uma S, Thangavelu R and Backiyarani S. 2016. Improvement of banana cv. Rasthali (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD50 specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54: 345-353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Švábová L and Lebeda A. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Journal of Phytopathology* 153(1): 52-64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x>
- Wu YL, Yi GJ and Peng XX. 2010. Rapid screening of *Musa* species for resistance to *Fusarium* wilt in an *in vitro* bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 128(3): 409-415. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9669-y>
- Ying L and Yi L. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Nature and Science* 2(10): e239. <https://www.jnsoci.org/content/239>
- Zhuang J, Coates CJ, Mao Q, Wu Z, and Xie L. 2016. The antagonistic effect of Banana bunchy top virus multifunctional protein B4 against *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* (5): 669-679. <https://doi.org/10.1111/mpp.12319>
- Zisi X, Xin Z, Yeyuan C, Shirong L, Shouxing W. 2009. Assessment of banana germplasm for resistance to fusarium wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops* 3: 362-364. [http://caod.oriprobe.com/articles/15644270/Assessment\\_of\\_Banana\\_Germplasm\\_for\\_Resistance\\_to\\_Fusarium\\_Wilt.htm](http://caod.oriprobe.com/articles/15644270/Assessment_of_Banana_Germplasm_for_Resistance_to_Fusarium_Wilt.htm)

# Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology

## Potencial de las ciencias ómicas en la bioprospección de agentes microbianos de control biológico: el caso de la agro-biotecnología mexicana

**Liliana Carolina Córdova-Albores**, Escuela de Agronomía, Universidad De La Salle Bajío, Avenida Universidad 602. Colonia Lomas del Campestre C.P. 37150, León, Guanajuato; **Lily Xochilt Zelaya-Molina**, <sup>1</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP. Boulevard de la Biodiversidad # 400. Rancho Las Cruces. C.P. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco; **Norma Ávila-Alistac**, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, CDMX, México; **Valeria Valenzuela-Ruíz**, <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000. Ciudad Obregón, Sonora; **Nelly Ethel Cortés-Martínez**, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara. Avenida Rafael Casillas Aceves No. 1200, Tepatitlán de Morelos, Jalisco; **Fannie Isela Parra-Cota**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP, Norman E. Borlaug Km. 12, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora; **Yamily Yazmin Burgos-Canul**, INECOL, Carretera antigua a Coatepec 351, Colonia El Haya. C.P. 91073, Xalapa-Enríquez, Veracruz; **Ismael Fernando Chávez-Díaz**; **Marja Liza Fajardo-Franco**, Posgrado en Manejo Sustentable de Recursos Naturales, Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Calle Principal a Lipuntahuaca S/N, Lipuntahuaca, CP 73475, Huehuetla, Puebla; **Sergio de los Santos-Villalobos\***.

\*Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

**Recibido:** 20 de Septiembre, 2020.

**Aceptado:** 21 de Diciembre, 2020.

Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruíz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI, Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML and de los Santos-Villalobos S. 2021. Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 147-184.  
**DOI:** <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-3>

Primera publicación en línea: 29 de Diciembre, 2020.  
First published on line: December 29, 2020.

**Abstract.** At present, studies of biological control agents of microbial origin (BCA-M) have mainly focused on their taxonomic characterization, through the use of conventional molecular markers, and the *in vitro* evaluation of modes of action, or under greenhouse conditions, but limitedly under field conditions. Furthermore, recent bioprospecting studies of BCA of microbial origin mainly focus on *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*. Even when the research developed in Mexico on this topic has

**Resumen.** Actualmente, los estudios sobre agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) generalmente están enfocados en la caracterización taxonómica mediante el uso de marcadores moleculares convencionales y en evaluar la capacidad antagonista/mecanismos de acción *in vitro*, en invernadero y eventualmente bajo condiciones de campo. Los ACB-M se centran principalmente en cepas de *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Aunque la investigación en México en este campo ha sido muy activa en los últimos años, el desarrollo e innovación de una mayor diversidad de bioplaguicidas registrados y comercializados puede ser potenciada. En este contexto, el uso de técnicas vanguardistas en la era de las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, y metabolómica) enfocadas a la correcta afiliación taxonómica de los ACB-M y en el estudio de mecanismos de acción y comportamiento agroecológico es determinante para la bioprospección y uso extensivo de estos ACB-M de manera eficaz, biosegura y costo-efectiva. En el marco de la celebración internacional de la sanidad vegetal, la presente revisión analiza críticamente el estado del conocimiento y de aquellos aspectos que limitan la bioprospección y el uso extensivo de ACB-M con énfasis en México, desde la aplicación de las ciencias ómicas para la identificación, selección y estudio de los mecanismos de acción de dichos agentes hasta la difusión y socialización del conocimiento científico generado. Se pretende promover la reflexión sobre este campo del conocimiento e incentivar la nueva generación ACB-M con una visión holística y sistémica en beneficio de una agricultura sustentable y resiliente.

**Palabras clave:** Bioplaguicidas, taxonomía, genómica, transcriptómica, metabolómica.

been active during the last years, the development and innovation of greater variety of registered and currently commercialized biopesticides need to be improved. In this context, the use of cut-edge techniques in the era of omics sciences (genomics, transcriptomics, and metabolomics) focused on the correct taxonomic affiliation of BCA-M, as well as their modes of action and ecology in agroecosystems, will expand the bioprospecting and extensive use of these BCA in a more efficient, biosafety, and cost-effective manner. In the framework of the international celebration of plant health, this review critically analyzes the knowledge status of the aspects that limit the bioprospecting and extensive use of BCA-M, mainly in Mexico, from the application of omics sciences for the identification, selection, and study of action mechanisms of those agents until the dissemination and socialization of the generated scientific knowledge. The foregoing is intended to promote reflection on this field of knowledge and encourage the new generation BCA-M with a holistic and systemic vision for the benefit of sustainable and resilient agriculture.

**Key words:** Bioplaguicidas, taxonomy, genomic, transcriptomic, metabolomic.

Crops are exposed to abiotic and biotic factors that can negatively impact their productivity, *i.e.*, floods, droughts, degraded soils, and phytopathogens. Phytopathogens are responsible for up to 40 % of crop yield reductions (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). Along with this, the growing demand for food fueled by population increases has led to the modification of agricultural practices to mitigate the losses caused by phytopathogens,



Los cultivos agrícolas están expuestos a factores abióticos y bióticos que pueden incidir negativamente en su productividad, *i.e.* inundaciones, sequías, suelos degradados y fitopatógenos. Estos últimos causan una disminución del rendimiento agrícola hasta del 40% (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). Aunado a esto, el aumento poblacional y -en consecuencia- la creciente demanda de alimentos condujeron a la modificación de las prácticas agrícolas para mitigar las pérdidas ocasionadas por la incidencia de fitopatógenos, sin disminuir la calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos producidos (FAO, 2018). La estrategia ampliamente utilizada para atender estos aspectos ha sido la aplicación de plaguicidas sintéticos, la cual aumentó mundialmente un 97.7% de 1992 (1.30 kg ha<sup>-1</sup>) a 2016 (2.57 kg ha<sup>-1</sup>) (FAO, 2018); mientras que en México el incremento de fungicidas sintéticos fue 76.9% (de 1.08 a 1.91 kg ha<sup>-1</sup>) en el mismo periodo (Roser, 2019). Se ha reportado que sólo el 0.1% de los plaguicidas sintéticos aplicados llega al cultivo agrícola de interés (Gill y Garg, 2014), lo cual genera graves afectaciones económicas y ambientales, como la contaminación de suelos y mantos acuíferos con residuos recalcitrantes, la degradación química y microbiana del suelo y la pérdida de su biodiversidad (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

En este contexto, el manejo de fitopatógenos en los sistemas de producción agrícola debe ser atendido amplia e integralmente en congruencia con el objetivo dos, poner fin al hambre, de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible para América Latina y el Caribe. En éste se establece la necesidad de centrar esfuerzos para lograr la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición y promover una agricultura sostenible (ONU, 2018). México ha coadyuvado a estos objetivos colateralmente ya que desde 1940 se iniciaron los primeros estudios y aplicaciones del control biológico y se crearon

without lowering the nutritional quality and safety of the products grown (FAO, 2018). A widely used strategy to address these aspects has been the use of synthetic pesticides, which increased 97.7% worldwide from 1992 (1.30 kg ha<sup>-1</sup>) to 2016 (2.57 kg ha<sup>-1</sup>) (FAO, 2018); in Mexico, the use of synthetic fungicides increased 76.9% (from 1.08 to 1.91 kg ha<sup>-1</sup>) in the same period (Roser, 2019). Reports show that only 0.1% of the applied synthetic pesticides reach the crop of interest (Gill and Garg, 2014), a fact that creates serious economic and environmental impacts, such as soil and aquifer contamination with recalcitrant wastes, soil, chemical, and microbial degradation, and biodiversity loss (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

In this context, phytopathogen management in cropping systems must be extensively and comprehensively addressed to be consistent with Goal 2, end hunger, of the 2030 Agenda for the Sustainable Development for Latin America and the Caribbean. Goal 2 establishes the need to concentrate efforts to achieve food security, improve nutrition, and promote sustainable agriculture (ONU, 2018). Mexico has collaterally contributed to these goals since 1940 when the first studies and applications of biological control began and academic programs were established to promote an integrated plant health management (Gutiérrez-Samperio, J. Personal communication. 2019). Biological management of phytopathogens is defined as “the use of beneficial organisms to reduce the negative effects caused by phytopathogens, through their antagonistic actions, either by direct actions of gene recognition or indirectly through metabolites or products derived from them” (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). In a broader sense, biological management was initially promoted through campaigns implemented by government agencies, where predator insects, parasitoids or



programas académicos con el fin de promover el manejo integrado fitosanitario (Gutiérrez-Sampeiro, J. Comunicación Personal. 2019). El manejo biológico de fitopatógenos es definido como “el uso de organismos benéficos para reducir los efectos negativos de patógenos de las plantas, a través de sus acciones antagónicas, ya sea por acción directa de reconocimiento génico, o indirectamente mediante metabolitos o productos derivados de éstos” (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). En una concepción amplia, el manejo biológico se incentivó inicialmente con campañas implementadas por instancias gubernamentales, mediante el uso de insectos depredadores, parasitoides o insectos estériles; y posteriormente, con la inclusión de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium*), hongos filamentosos y bacterias, para el control de plagas de importancia nacional (Arredondo-Bernal y Rodríguez-del Bosque, 2015).

El uso de agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) en México es una alternativa que ha sido utilizada para complementar el control convencional de fitopatógenos, mediante plaguicidas sintéticos (Arredondo-Bernal y Rodríguez-del Bosque, 2015). Por ejemplo, en 2017 en México, el área de siembra fue aproximadamente de 32.4 millones de hectáreas, cuyos principales cultivos fueron: maíz, sorgo, frijol, café, caña de azúcar y trigo (INEGI, 2017); en dichos cultivos los principales géneros de fitopatógenos reportados fueron *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Pseudomonas*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Leifsonia* y *Xanthomonas*, y los ACB-M más utilizados para controlar a estos fitopatógenos fueron las especies fúngicas *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*, y las especies bacterianas *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* (García-Juárez *et al.*, 2016; Villarreal-Delgado *et*

sterile insects were used, followed by the inclusion of entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium*), filamentous fungi and bacteria, to control important pests nationally (Arredondo-Bernal and Rodríguez-del Bosque, 2015).

The use of biological control agents of microbial origin (BCA-M) in Mexico is an alternative to complement the conventional control of phytopathogens using synthetic pesticides (Arredondo-Bernal and Rodríguez-del Bosque, 2015). For example, in Mexico, the area sown in 2017 was approximately 32.4 million hectares, where the main crops were maize, sorghum, bean, coffee, sugarcane, and wheat (INEGI, 2017); the main phytopathogen genera reported in those crops were *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Pseudomonas*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Leifsonia*, and *Xanthomonas*, and the BCA-M that were most used for controlling these pathogens were the fungal species *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*, and the bacterial species *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* and *B. thuringiensis* (García-Juárez *et al.*, 2016; Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Delgado-Ortiz *et al.*, 2019). Although researches on BCA are significant (Tables 1 and 2), sometimes, no detailed information on the results of their application to nationally important crops in the field are published or are included in technical reports with restricted access and limited to describing crop yield increases and/or phytopathogen inhibition.

Identifying new agents and/or understanding the plant-pathogen-BCA of microbial origin interaction (under field conditions), as well as conducting robust studies of the polyphasic taxonomic affiliation (consensus classification based on the integration of all available phenotypic and genotypic data), action and ecology mechanisms of those BCA in

*al.*, 2017; Delgado-Ortiz *et al.*, 2019). Aunque la investigación en ACB es significativa (Cuadro 1 y 2), en ocasiones, la información detallada sobre los resultados obtenidos por la aplicación en campo de estos ACB a cultivos agrícolas de importancia nacional no es publicada o se registra en informes técnicos con acceso restringido, y se limita a describir aumentos de rendimientos agrícolas y/o inhibición de fitopatógenos.

El descubrimiento de nuevos agentes y/o el entendimiento de las interacciones planta-patógeno-ACB de origen microbiano (bajo condiciones de campo), así como estudios robustos sobre la afiliación taxonómica polifacética (clasificación consenso basada en la integración de todos los datos fenotípicos y genotípicos disponibles), los mecanismos de acción y ecología de dichos ACB en los agroecosistemas, mediante el empleo de los avances recientes de las ciencias ómicas, es determinante para el registro, comercialización, innovación y éxito de bioplaguicidas formulados. Por lo anterior, el objetivo de la presente revisión es describir el estado del conocimiento y analizar, en el marco de la celebración internacional de la Sanidad Vegetal, aspectos que limitan la bioprospección y uso extensivo de ACB-M en México, así como estrategias genómicas de vanguardia inherentes a las ciencias ómicas enfocadas a la identificación, selección y estudio de los mecanismos de acción de dichos agentes, así como la difusión y socialización del conocimiento científico generado para potenciar la innovación agro-biotecnológica y el éxito de bioplaguicidas.

**Agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) y bioplaguicidas en México.** La búsqueda e introducción de enemigos naturales a fitopatógenos de importancia económica en México tomó relevancia a partir de la década de 1940, debido a la necesidad de generar estrategias de

the agroecosystems, using the recent advances in omics sciences, are essential for registration, marketing, innovation and success of formulated biopesticides. For this reason, in the framework of the international celebration of Plant Health, the objective of this review is to describe the knowledge status and analyze the aspects which limit the bioprospection and extensive use of BCA-M in Mexico, cutting-edge genomic strategies inherent to the omics sciences focused on the identification, selection and study of the mechanisms of action of those agents, and the dissemination and socialization of the scientific knowledge gained to enhance agro-biotechnological innovation and biopesticides success.

**Biological control agents of microbial origin (BCA-M) and biopesticides in Mexico.** The identification and introduction of natural enemies in economically important phytopathogens in Mexico became relevant in the 1940s due to the need to develop efficient and sustainable management strategies. In the more than 80 years of using BCA-M in our country (Bernal and Quezada, 1999), 230 bioproducts from 40 companies registered by COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>) are available in the national market. However, some of these products have a limited number of active ingredients at the taxonomic group level (fungi, bacteria y/o viruses), or microbial genus/species for controlling the causal agents of diseases in plants that are cultivated in Mexico (Table 1). This reflects a limited availability of bioproducts to be used in the Mexican fields despite the efforts made and the research conducted in our country. This fact could be associated with the limited support to the scientific sector to conduct systemic research, bioprospecting new BCA-M, and obtaining patent registration of biotechnological products, as well as with the limited organizational structure at

**Cuadro 1. Productos de control biológico de origen microbiano en México con registro ante COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>).**

**Table 1. Biological control products of microbial origin in Mexico, registered by COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>).**

| Ingrediente Activo                                                                                                                                                                         | Producto comercial                                                                                                                                                           | Uso agrícola    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Bacterias</b>                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                 |
| <i>Acetobacter lovaniensis</i>                                                                                                                                                             | Q-Bacter                                                                                                                                                                     | Bio-bactericida |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>                                                                                                                                                          | Serifel/Serenade Optimum / Stargus                                                                                                                                           | Bio-fungicida   |
| <i>B. subtilis</i>                                                                                                                                                                         | Fungifree-Ab/ Agrobacilo/ Serenade As/ Serenade Max/ Bacillios G / Baktillis / Serenade/ Rador/ Vici Active/ Fungi-Q/ Fungisei/ Protec-Root/ Cx-9030                         | Bio-fungicida   |
| <i>B. stearothermophilus</i>                                                                                                                                                               | Bacillus 1537 / Labsa Bst / Bacillus Thermo                                                                                                                                  | Bio-fungicida   |
| <i>B. thuringiensis</i>                                                                                                                                                                    | Dipel 2x /Xentari Grd/ Delta Bt/ Bt-K/ Dipel-2x/ Phc Beretta/ Larvix/ Thuricide Ph/ Newbt-2x Wp/ Myp/ Xentari/ Lepinox 15 Wdg/ Crymax Gda/ Phc Condor Wp/ Dipel 2x/ Turinsil | Bio-insecticida |
| <i>B. pumilus</i>                                                                                                                                                                          | Sonata As                                                                                                                                                                    | Bio-fungicida   |
| <i>Chromobacterium subsugae</i>                                                                                                                                                            | Grandevo                                                                                                                                                                     | Bio-insecticida |
| <i>Streptomyces</i> spp.                                                                                                                                                                   | Blite Free                                                                                                                                                                   | Bio-fungicida   |
| <b>Hongos</b>                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                              |                 |
| <i>Beauveria bassiana</i>                                                                                                                                                                  | Bea-Sin/ Atento/ Bioin Dalife/Cercon Es/ Naturalis L                                                                                                                         | Bio-insecticida |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>                                                                                                                                                              | Meta-Sin/ Biomett/ Meta-Noc/ Spectrum Meta                                                                                                                                   | Bio-insecticida |
| <i>Myrothecium verrucaria</i>                                                                                                                                                              | Ditera Es/ Ditera Df                                                                                                                                                         | Bio-nematicida  |
| <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>                                                                                                                                                           | Pae-Sin/ Bioamin-Insect-1/ Pfr-97 20% Wdg/ Nofly Wp                                                                                                                          | Bio-insecticida |
| <i>P. lilacinus</i>                                                                                                                                                                        | Lila-Sin / Chimal/ Bioact Wg/ Biostat/ NemaFin/ Spectrum Pae                                                                                                                 | Bio-nematicida  |
| <i>P. variotii</i>                                                                                                                                                                         | Nemaquim / NemaKill / Pha.Da / Nem P.B. / Sinnemakill / Nemphada / O.B Golf                                                                                                  | Bio-nematicida  |
| <i>Pochonia chlamydosporia</i>                                                                                                                                                             | Genexis Ph                                                                                                                                                                   | Bio-nematicida  |
| <i>Trichoderma harzianum</i>                                                                                                                                                               | Tricho-Sin/ Labrador/ Trianum P/ Phc T22/ Spectrum Trico-Bio/ Bioamin-Fung-2/ Rootshield Plus Wp                                                                             | Bio-fungicida   |
| <i>T. lignorum</i>                                                                                                                                                                         | Mycobac                                                                                                                                                                      | Bio-fungicida   |
| <i>T. viride</i>                                                                                                                                                                           | Funqui                                                                                                                                                                       | Bio-fungicida   |
| <i>Verticillium lecanii</i>                                                                                                                                                                | Verti-Sin/ Eday                                                                                                                                                              | Bio-insecticida |
| <b>Mezclas</b>                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                              |                 |
| <i>Bacillus subtilis, Rhodotorula minuta</i>                                                                                                                                               | Fungifree-Ab Plus                                                                                                                                                            | Bio-fungicida   |
| <i>B. subtilis, Bacillus</i> spp. <i>Torulopsis inconspicua</i>                                                                                                                            | Obiettivo                                                                                                                                                                    | Bio-fungicida   |
| <i>B. licheniformis, T. harzianum</i>                                                                                                                                                      | Biowall                                                                                                                                                                      | Bio-fungicida   |
| <i>Bacillus</i> spp., aceite de clavo y neem                                                                                                                                               | Roya Out                                                                                                                                                                     | Bio-fungicida   |
| <i>B. subtilis, Trichoderma</i> spp., <i>P. lilacinus</i> , quitosano, bicarbonato de potasio                                                                                              | Nemaxxion Biol                                                                                                                                                               | Bio-fungicida   |
| <i>B. bassiana, Nomurea rileyi</i> , aceite de neem, <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> y var. <i>Israelensis</i>                                                                | Larbiol 2X                                                                                                                                                                   | Bio-insecticida |
| <i>B. bassiana, Nomurea rileyi, Metarhizium anisopliae, Verticillium lecanii, P. fumosoroseus</i> , concentrado oleico                                                                     | Biomaxx Duo                                                                                                                                                                  | Bio-insecticida |
| <i>T. harzianum, T. viride, T. fasciculatum</i>                                                                                                                                            | Juq                                                                                                                                                                          | Bio-fungicida   |
| <i>P. fumosoroseus, M. anisopliae, B. bassiana</i>                                                                                                                                         | Tri-Sin                                                                                                                                                                      | Bio-insecticida |
| <i>M. anisopliae, B. bassiana</i>                                                                                                                                                          | Biomabb/ QUIM                                                                                                                                                                | Bio-insecticida |
| <i>P. lilacinus, B. firmus</i>                                                                                                                                                             | Arrecife                                                                                                                                                                     | Bio-nematicida  |
| <i>P. lilacinus, B. subtilis, Pseudomonas fluorescens</i> , extracto de ruezno de nuez, <i>Yucca schidigera</i> , guiche de lechuguilla, cáscara de nuez, higuera, gel de nopal, quitosano | Nemmax                                                                                                                                                                       | Bio-nematicida  |

manejo eficientes y sostenibles. En más de 80 años del empleo de ACB-M en nuestro país (Bernal y Quezada, 1999), en el mercado nacional se encuentran disponibles 230 bioproductos de 40 empresas con registro ante COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>). Sin embargo, entre estos productos existe un número limitado de ingredientes activos a nivel de grupo taxonómico (hongos, bacterias y/o virus), género o especie microbiana para el control de agentes causales de enfermedades de plantas cultivadas en México (Cuadro 1). Lo anterior refleja una limitada disponibilidad de bioproductos para su uso en el campo mexicano a pesar de los esfuerzos e investigaciones realizadas en nuestro país. Esto podría estar asociado al limitado apoyo otorgado al sector científico para la investigación sistémica y bioprospección de nuevos ACB-M; para el registro de patentes en el área biotecnológica, así como a la escasa estructura organizacional a nivel institucional para establecer departamentos especializados en el proceso de patentes y licenciamiento. Los escasos recursos financieros muchas veces han implicado el desarrollo de investigaciones parciales, principalmente *in vitro*, a partir de colecciones con limitada representatividad biológica y regional. Por otra parte, no se cuenta con acceso a la información documental que soporte científicamente su efectividad, y se tiene una deficiencia de datos estadísticos relativos a su producción, consumo y éxito a nivel nacional (De León y Mier, 2010); a excepción de productos como Fungifree®, el cual es un biofungicida efectivo para el manejo de enfermedades foliares como la antracnosis (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*), cenicilla polvorienta (*L. taurica*, *E. chichoracearum* y *S. humili*) y moho gris (*B. cinerea*) (Galindo *et al.*, 2015), y los trabajos realizados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico SAGARPA-DGSV para el manejo de *Diaphorina citri* y langosta con hongos entomopatógenos (Ayala-Zermeño *et al.*, 2015; Gallou *et al.*, 2016).

the institutional level to establish departments specialized in patent and licensing processes. The lack of financial resources has often impacted the development of partial research, mainly *in vitro*, from collections with limited biological and regional representation. On the other hand, there is no access to documentary information to scientifically support their effectiveness, nor statistical data of their production, consumption and success at the national level (De León and Mier, 2010), with the exception of products such as Fungifree®, which is an effective biofungicide for managing foliar diseases such as anthracnose (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *C. fragariae*), powdery mildew (*L. taurica*, *E. chichoracearum* and *S. humili*) and gray mold (*B. cinerea*) (Galindo *et al.*, 2015), and the studies conducted by Centro Nacional de Referencia de Control Biológico SAGARPA-DGSV for controlling *Diaphorina citri* and lobster with entomopathogenic fungi (Ayala-Zermeño *et al.*, 2015; Gallou *et al.*, 2016).

Furthermore, one of the main constraints for technology transfer and extensive use of bioproducts based on BCA-M is the insufficient publication and dissemination of scientific research conducted by different universities and research centers in the country, even after the product's patent has been obtained (Bernal and Quezada, 1999). In this regard, the important role of the Mexican Journal of Phytopathology or RMF, for its acronym in Spanish (<https://www.rmf.smf.org.mx/>), must be recognized, because during the past eight years, different researchers have published about 50 scientific papers (23.7% of the total number of the published articles) reporting aspects related to the use of BCA-M, *i.e.*, scientific articles, review articles, phytopathological notes and phytopathological reports (Table 2). Likewise, records provided by Scielo Analytics (<https://analytics.scielo.org/>) show that of the 100 articles of the JMP that are most consulted online, 24%

Además, una de las principales limitantes para la transferencia de tecnología y uso extensivo de bioproductos a base de ACB-M es la insuficiente publicación y difusión de las investigaciones científicas desarrolladas por diversas universidades y centros de investigación del país, aún posterior al registro de la patente en cuestión (Bernal y Quezada, 1999). Al respecto, es de reconocer el importante papel de la Revista Mexicana de Fitopatología (<https://www.rmfm.smf.org.mx/>), ya que en los últimos ocho años diversos investigadores han publicado alrededor de 50 contribuciones (23.7% de su publicación total) sobre aspectos relacionados al uso de ACB-M, *i.e.* artículos científicos, artículos de revisión, notas fitopatológicas y reportes fitopatológicos (Cuadro 2). Así mismo, se ha registrado por Scielo Analytics (<https://analytics.scielo.org/>) que de los 100 artículos de la RMF con más consultas en línea, el 24% corresponden a temas relacionados con ACB-M, entre los que destacan: El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017), el modo de acción de *Candida oleophila* para el manejo de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Guerrero *et al.*, 2011), y el biocontrol de la “escoba de bruja” con *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo en mango (Michel-Aceves *et al.*, 2013), por mencionar algunos ejemplos.

En este sentido, con la finalidad de potenciar la investigación científica y enriquecer el espectro funcional de bioproductos registrados y comercializados en México, es determinante la incorporación de herramientas de vanguardia y robustas en estudios científicos sobre ACB-M, especialmente su afiliación taxonómica polifacética, fisiología, modo de acción *in vitro*, invernadero y campo, e interacciones con los factores bióticos y abióticos. Lo anterior conduciría al desarrollo de sistemas de producción, formulación, escalamiento e

correspond to subjects related to BCA-M, of which the following stand out: the *Bacillus* genus as a biological control agent and its implications in agricultural biosafety (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017), the action mode of *Candida oleophila* for managing *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* (Guerrero *et al.*, 2011), and “witch broom” biocontrol with *Trichoderma* spp. in mango crops under field conditions (Michel-Aceves *et al.*, 2013), just to name a few examples.

In this regard, to strengthen the scientific research and enrich the functional range of bioproducts registered and sold in Mexico, it is essential to incorporate new cutting-edge and robust tools into scientific studies of BCA-M, especially about their polyphasic taxonomic affiliation, action mode *in vitro*, and under greenhouse and field conditions, as well as their interaction with biotic and abiotic factors. This would lead to the establishment of cost-effective production, formulation, scaling and innovation systems (Galindo *et al.*, 2013; Serrano-Carreón *et al.*, 2010), which, in turn, would help governmental agencies and professionals involved in agricultural production make an efficient, safe, and rigorous technology transfer of these bioproducts to farmers.

**Taxonomic affiliation of BCA-M.** The molecular taxonomic study of BCA-M has been conventionally undertaken using the 16S rRNA gen for prokaryote taxonomic affiliation, because i) it is present in that group of organisms and often exists as a multigenic family; ii) its function has not changed over time, thereby suggesting that slow changes occur in its sequence during the evolutionary course; and iii) its length (1500 bp) is great enough for technical and bioinformatic purposes but it is difficult to identify bacterial species because of its limited genetic diversity (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). Likewise, the ITS



Cuadro 2. Investigaciones publicadas en la Revista Mexicana de Fitopatología (<https://www.rmfmf.org.mx/>) enfocadas al control biológico. Periodo: 2012 al 2020.Table 2. Scientific articles focused on biological control that have been published in the Mexican Journal of Phytopathology (<https://www.rmfmf.org.mx/>) Period: 2012 al 2020.

| Agente de control biológico                                                    | Análisis empleado para identificación                       | Cultivo                                | Agente fitopatógeno                                                                                                                            | Condiciones de evaluación     | Mecanismo de acción propuesto                                                  | Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción                                                                                    | Referencias                           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Bacillus</i> y <i>Burkholderia</i>                                          | Secuenciación del gen 16S ARNr                              | -                                      | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>                                                                                                          | <i>In vitro</i>               | Se propone la excreción de metabolitos secundarios                             | Confrontación dual, estimación cualitativa con escala de 4 niveles de antagonismo y cuantitativo mediante análisis de imagen                  | Macedo-Castillo <i>et al.</i> , 2012  |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i>                                                  | Claves taxonómicas                                          | <i>Solanum tuberosum</i>               | Nematodos de vida libre                                                                                                                        | <i>In vitro</i>               | Parasitismo                                                                    | Potencial parasítico                                                                                                                          | Carrión y Desgarenes, 2012            |
| <i>Pochonia hlamydosporea</i>                                                  | Claves taxonómicas                                          | <i>Phaseolus vulgaris</i>              | <i>Nacobbus aberrans</i>                                                                                                                       | <i>In vitro</i> e invernadero | Parasitismo                                                                    | Potencial parasitismo, colonización de raíces y prueba de efectividad                                                                         | Franco-Navarro <i>et al.</i> , 2013   |
| <i>Trichoderma</i>                                                             | Claves taxonómicas                                          | <i>Mangifera indica</i>                | <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. subglutinans</i>                                                                                             | Campo                         | Parasitismo                                                                    | Severidad de la enfermedad                                                                                                                    | Michel-Aceves <i>et al.</i> , 2013    |
| <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Trichoderma</i> y <i>Penicillium</i> | Claves taxonómicas, medios selectivos y pruebas bioquímicas | -                                      | <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>F. oxysporum</i> f sp. <i>lycopersi</i>                                                                         | <i>In vitro</i>               | Antibiosis, parasitismo                                                        | Confrontación en placa y suelo estéril                                                                                                        | Rodríguez-Millán <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>                                           | Claves taxonómicas                                          | <i>Agave tequilana</i> weber var. Azul | <i>Fusarium</i>                                                                                                                                | Vivero                        | Parasitismo, resistencia sistémica, competencia, producción de enzimas líticas | Potencial parasitismo, colonización de raíces y supresión del agente causal de la enfermedad                                                  | Tlapal-Bolaños <i>et al.</i> , 2014   |
| <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i>                                       | Uso de microorganismos de productos comerciales             | <i>Capsicum annuum</i>                 | <i>Phytophthora capsici</i>                                                                                                                    | Invernadero                   | Supresión de la enfermedad                                                     | Antagonismo, colonización y supresión del agente causal de la enfermedad                                                                      | Lozano-Alejo <i>et al.</i> , 2015     |
| <i>C. musae</i> , <i>C. loeosporioides</i> e <i>Idriella lunata</i>            | Claves taxonómicas                                          | -                                      | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                             | Antibiosis de metabolitos secundarios                                          | Evaluación mediante sensibilización con los extractos fúngicos (halos de inhibición)                                                          | Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015   |
| Actinomicetos                                                                  | Claves taxonómicas                                          | <i>Solanum tuberosum</i>               | <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Fusarium</i> y <i>R. solani</i>                   | <i>In vitro</i>               | Antibiosis, enzimas líticas,                                                   | Evaluación de extractos de actinomicetos mediante difusión en agar, halos de inhibición, confrontación dual, concentración mínima inhibitoria | Pérez-Rojas <i>et al.</i> , 2015      |
| <i>T. viride</i> y <i>B. subtilis</i>                                          | Uso de microorganismos de productos comerciales             | -                                      | <i>Sclerotinia minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , y <i>S. cepivorum</i>                                                                      | <i>In vitro</i>               | Competencia, micoparasitismo y antibiosis                                      | Confrontación dual                                                                                                                            | Pérez-Moreno <i>et al.</i> , 2015     |

Cuadro 2. Continúa

**Cuadro 2. Continuación.**

**Table 2. Continuation.**

| Agente de control biológico                                                            | Análisis empleado para identificación                          | Cultivo                  | Agente fitopatígeno                                                                                                                      | Condiciones de evaluación     | Mecanismo de acción propuesto                                                                                                                         | Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción                                                            | Referencias                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i>                                                   | Claves taxonómicas y secuenciación del gen 18S ARNr y 16S ARNr | -                        | <i>F. oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Alternaria alternata</i> | <i>In vitro</i>               | Parasitismo, antibiosis, producción de enzimas líticas                                                                                                | Confrontación dual                                                                                                    | Rios-Velasco <i>et al.</i> , 2016     |
| <i>Bacillus</i> spp.                                                                   | Claves taxonómicas                                             | <i>Capsicum chinense</i> | <i>F. equiseti</i> y <i>F. solani</i>                                                                                                    | <i>In vitro</i> e invernadero | Competencia, producción de metabolitos y enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal, inducción de resistencia sistémica                       | Confrontación dual, inducción de resistencia, severidad de la enfermedad                                              | Mejía-Bautista <i>et al.</i> , 2016   |
| <i>Trichoderma</i>                                                                     | Claves taxonómicas y secuenciación del gen ITS1, ITS4 y tef1a  | -                        | <i>P. infestans</i>                                                                                                                      | <i>In vitro</i>               | Parasitismo                                                                                                                                           | Confrontación dual                                                                                                    | García-Núñez <i>et al.</i> , 2017     |
| Hongos micorrízicos arbusculares                                                       | Uso de microorganismos de productos comerciales                | <i>Agave cupreata</i>    | <i>F. oxysporum</i>                                                                                                                      | Invernadero                   | Competencia por sitio de colonización, cambios en la composición de exudados radiculares, inducción de resistencia, promoción del crecimiento vegetal | Colonización de raíces y severidad de la enfermedad                                                                   | Trinidad-Cruz <i>et al.</i> , 2017    |
| <i>Saccharicola</i>                                                                    | Microorganismos provenientes de trabajos previos               | <i>Capsicum annuum</i>   | <i>P. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>                                                                               | <i>In vitro</i> e invernadero | Parasitismo, competencia, producción de enzimas, antibiosis                                                                                           | Confrontación dual, prueba de parasitismo de Riddell, microscopía de barrido, incidencia y severidad de la enfermedad | Uc-Arguelles <i>et al.</i> , 2017     |
| <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>                                                   | Microorganismos provenientes de trabajos previos               | <i>M. domestica</i>      | <i>P. cactorum</i>                                                                                                                       | Invernadero                   | Promoción del crecimiento vegetal, producción de fitohormonas, inducción de resistencia                                                               | Confrontación, severidad de la enfermedad                                                                             | Ruiz-Cisneros <i>et al.</i> , 2017    |
| <i>Lecanicillium</i> , <i>alcarisporium</i> , <i>Sporothrix</i> y <i>Simplicillium</i> | Claves taxonómicas                                             | -                        | <i>Hemileia vastatrix</i>                                                                                                                | <i>In vitro</i>               | Micoparasitismo                                                                                                                                       | Confrontación dual, parasitismo                                                                                       | Gómez-De la Cruz <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>B. amyloliquifaciens</i> y <i>B. thuringiensis</i>                                  | Claves taxonómicas y secuenciación del gen 16S ARNr            | -                        | <i>P. capsici</i>                                                                                                                        | <i>In vitro</i> e invernadero | Antibiosis, producción de lipopéptidos, promoción del crecimiento vegetal                                                                             | Inhibición germinativa de zoosporas con inóculo bacteriano y filtrados, eficacia de biocontrol                        | Ley-López <i>et al.</i> , 2018        |

Cuadro 2. Continúa

**Cuadro 2. Continuación.**  
**Table 2. Continuation.**

| Agente de control biológico                      | Análisis empleado para identificación                                                                           | Cultivo                  | Agente fitopatígeno                                                                                  | Condiciones de evaluación     | Mecanismo de acción propuesto                                                                                                                  | Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción                                                                      | Referencias                             |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>B. subtilis</i>                               | AFLP (EcoR y MseI)                                                                                              | -                        | <i>R. solani</i>                                                                                     | <i>In vitro</i>               | Antibiosis, producción de enzimas líticas,                                                                                                     | Sobrenadante difusión en placa (metabolitos antagonistas), placas microtituladoras BIOLOG (diversidad metabólica)               | Jiménez-Delgadillo <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>             | Claves taxonómicas y secuenciación del gen 18S ARNr, ITS1 e ITS4). <i>Bacillus</i> proviene de trabajos previos | <i>S. lycopersicum</i>   | <i>A. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>P. infestans</i>                                         | <i>In vitro</i>               | Producción de enzimas líticas, metabolitos promotores de crecimiento vegetal, antibiosis, inducción de resistencia, producción de lipopéptidos | Confrontación dual, tipo de antagonismo (escala de Bell)                                                                        | Ruiz-Cisneros <i>et al.</i> , 2018      |
| <i>P. fluorescens</i>                            | Claves taxonómicas y secuenciación del gen 16S ARNr                                                             | <i>S. lycopersicum</i>   | <i>A. alternata</i>                                                                                  | <i>In vitro</i> e invernadero | Producción de compuestos extracelulares inhibidores enzimáticos, antibiosis                                                                    | Difusión en agar de extractos, germinación de conidios y crecimiento micelial, incidencia y severidad de la enfermedad          | Rodríguez-Romero <i>et al.</i> , 2019   |
| <i>Simplicillium</i> y <i>Lecanicillium</i>      | Secuenciación del gen 18S ARNr, ITS1 e ITS4                                                                     | -                        | <i>Hemileia vastatrix</i>                                                                            | <i>In vitro</i>               | Parasitismo                                                                                                                                    | Confrontación dual, parasitismo                                                                                                 | García-Nevárez e Hidalgo-Jaminson, 2019 |
| <i>T. harzianum</i>                              | No se menciona                                                                                                  | <i>Carya illinoensis</i> | <i>Phymatotrichopsis omnivora</i>                                                                    | vivero                        | Antagonismo                                                                                                                                    | Desinfestación reductiva                                                                                                        | Samaniego-Gaxiola <i>et al.</i> , 2019  |
| <i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i>         | Microorganismos provenientes de trabajos previos                                                                | <i>Arachis hypogaea</i>  | <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Thecaphora frezzi</i> | <i>In vitro</i> y campo       | Producción de enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal                                                                               | Inoculación de sustrato estéril, incidencia de enfermedad, crecimiento de plantas, peso seco.                                   | Illa <i>et al.</i> , 2020               |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. subtilis</i> | Claves taxonómicas, pruebas bioquímicas, y metabolismo (tarjeta VITEX 2)                                        | -                        | <i>S. cepivorum</i>                                                                                  | <i>In vitro</i>               | Producción de metabolitos, sideróforos, enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal, tolerancia a estrés, antibiosis                    | Confrontación dual, actividad del ACC desaminasa, tolerancia a NaCl y prueba colorimétrica para producción de sideróforos y AIA | Ocegueda-Reyes <i>et al.</i> , 2020     |

innovación costo-efectivos (Galindo *et al.*, 2013; Serrano-Carreón *et al.*, 2010). Esto permitiría a dependencias gubernamentales y profesionistas involucrados en la producción agrícola una transferencia tecnológica eficiente, segura y rigurosa de estos bioproductos a los agricultores.

**Afiliación taxonómica de ACB-M.** El estudio taxonómico molecular de ACB-M se ha realizado convencionalmente con el gen 16S ARNr para la afiliación taxonómica de procariontes debido a que: i) está presente en dicho grupo de organismos y a menudo existe como una familia multigénica; ii) su función a lo largo del tiempo no ha cambiado, sugiriendo que su secuencia cambia lentamente en el curso evolutivo, y iii) su longitud (1500 pb) es lo suficientemente grande para propósitos técnicos y bioinformáticos, aunque limita la identificación de especies bacterianas debido a su restringida diversidad genética (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). De forma similar, en los eucariotas, la región ITS (internal transcribed spacer, por sus siglas en inglés), conformada por ITS1, el gen 5.8S ARNr e ITS2, es muy conservada a nivel de género, cuya longitud (650-1,100 pb) y limitada diversidad genética entre especies dificulta su uso para la diferenciación y afiliación taxonómica correcta. Además, la afiliación taxonómica de los ACB-M también se basa en el empleo de técnicas moleculares (RAPDs, ISSR, RFLP, AFLP) y/o técnicas de PCR de detección rápida mediante el uso de genes marcadores, tales como: 16S ARNr, 28S ARNr, ITS,  $\beta$ -tubulina, RPB2, factor de elongación y SCAR (Mazrou *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2019). La resolución taxonómica a nivel de especie o subespecie (*i.e.* haplotipos) dependerá de la técnica molecular seleccionada, enzimas de restricción y genes o regiones seleccionadas.

La afiliación taxonómica correcta es determinante para la bioprospección de ACB-M bioseguros,

region (internal transcribed spacer) in eukaryotes, which is made up of the ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, is highly conserved at the genus level, whose length (650-1,100 bp) and limited genetic diversity among species hampers their correct differentiation and taxonomic affiliation. The BCA-M taxonomic affiliation is based on the use of molecular techniques (RAPDs, ISSR, RFLP, AFLP) and/or PCR for rapid detection using marker genes, such as 16S rRNA, 28S rRNA, ITS,  $\beta$ -tubulin, RPB2, elongation factor, SCAR (Mazrou *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2019). The taxonomic resolution at the species or subspecies level (*i.e.*, haplotypes) will depend on the preferred molecular technique, restriction enzymes, and selected genes or regions.

The correct taxonomic affiliation is decisive for bioprospecting biosafe BCA-M, considering that several genera have species with antagonistic activity against phytopathogens but may also have other species that cause diseases in plants, animals and/or humans. For example, *Bacillus* is one of the bacterial genera that has been most reported and studied worldwide because of its biological control capacity. The *B. cereus* group has been extensively studied and is made up of, at least, eight species that are closely related: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* and *B. toyonensis*. However, the members of this group have a significant impact on human health, agriculture, and the food industry, *i.e.*, *B. anthracis* is the etiological agent of anthrax, an obligate pathogen that poses a threat to human and herbivores health, while *B. thuringiensis* is a biological management agent which is extensively used and recognized as a safe biopesticide in the world (Liu *et al.*, 2015). On the other hand, *B. cereus* is an opportunistic pathogen that often causes food poisoning and has recently been reported as an emerging phytopathogen. At the

ya que diversos géneros tienen especies con actividad antagónica contra fitopatógenos, pero pueden poseer otras especies causantes de enfermedades en plantas, animales y/o humanos. Por ejemplo, *Bacillus* es uno de los géneros bacterianos más reportados y estudiados a nivel mundial por su capacidad de control biológico. El grupo de *B. cereus* ha sido ampliamente estudiado y comprende, al menos, ocho especies estrechamente relacionadas: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis*. Sin embargo, los miembros de este grupo tienen un impacto significativo en la salud humana, la agricultura y la industria alimentaria; *i.e.* *B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax, un patógeno obligado que representa una amenaza para la salud humana y de los herbívoros, mientras que *B. thuringiensis* es un agente de manejo biológico ampliamente utilizado y reconocido como un bioplaguicida seguro a nivel mundial (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, *B. cereus* es un patógeno oportunista que a menudo causa intoxicación alimentaria y ha sido recientemente reportado como un fitopatógeno emergente. A nivel intraespecífico, miembros del grupo de *B. cereus* poseen secuencias del gen 16S ARNr muy similares y genomas altamente conservados (Ehling-Schulz *et al.*, 2019), lo que dificulta su correcta afiliación taxonómica. Otro grupo que evidencia la importancia taxonómica con un enfoque molecular debido a restricciones de caracterización bioquímica, biológica y morfológica es el género *Burkholderia* (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020; Serret-López *et al.*, 2021; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

En los últimos años, la introducción de diversas estrategias y plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés), herramientas genómicas, filogenómicas y bioinformáticas ha contribuido significativamente a una mejor comprensión de la evolución e interacción

intraspecific level, members of the *B. cereus* group have sequences of the 16S rRNA gene that are very similar and highly conserved genomes (Ehling-Schulz *et al.*, 2019), a fact that makes their correct taxonomic affiliation difficult. Another group of taxonomic importance with a molecular approach is the *Burkholderia* genus, due to biochemical, biological, and morphological characterization restrictions (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020; Serret-López *et al.*, 2021; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018). In recent years, the introduction of various next-generation sequencing strategies and platforms (NGS), as well as genomic, phylogenomic, and bioinformatic tools, have significantly contributed to a better understanding of the microorganism's evolution and interaction with their environment (Jagadeesan *et al.*, 2019). These tools have also made it possible to study microbial strains at the genomic level, which has strengthened their correct taxonomic affiliation and identification of the genes involved in colonization and adaptation to the host, and their mechanisms of action, among other aspects (Figure 1).

**Genomic studies for the taxonomic affiliation of BCA of microbial origin (BCA-M).** At present, the robust taxonomic affiliation of microorganisms is based on the extraction, sequencing, and analysis of their genome, partial or total, supported by morphological, physiological, and metabolic traits (Figure 2). For this, sequencing high-quality DNA of the microorganism of interest and validating the obtained data through a quality control process are decisive factors, because reads of DNA without the required quality can be excluded in subsequent analysis (Xi *et al.*, 2019). FastQC is a digital tool designed to perform numerous quality control checks of the sequences that are obtained (Andrews, 2010). Then, the adapters must be trimmed, and low-quality data of the obtained



entre microorganismos y su ambiente (Jagadeesan *et al.*, 2019). Además, estas herramientas han permitido el estudio de cepas microbianas a nivel genómico, lo que ha robustecido su correcta afiliación taxonómica y la identificación de genes involucrados en la colonización y adaptación al hospedero, sus mecanismos de acción, entre otros aspectos (Figura 1).

**Estudios genómicos para la afiliación taxonómica de ACB de origen microbiano (ACB-M).** En la actualidad, la afiliación taxonómica robusta de microorganismos se basa en la extracción, secuenciación y análisis de su genoma, parcial o total, apoyado de rasgos morfológicos, fisiológicos y metabólicos (Figura 2). Para esto, es determinante la secuenciación del ADN de alta calidad del microorganismo de interés y validar los datos obtenidos por un proceso de control de calidad, lo cual permite la exclusión de lecturas de ADN sin la calidad necesaria para análisis posteriores (Xi *et al.*, 2019). FastQC es una herramienta digital que permite realizar numerosas comprobaciones de control de calidad de las secuencias obtenidas (Andrews, 2010). Posteriormente, se debe eliminar los adaptadores y remover datos de baja calidad de la información genómica obtenida, mediante el uso de los programas como Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) y Cutadapt v1.18 (Martin, 2011). Posteriormente, el genoma es ensamblado, con programas como SPAdes v3.14.1, el cual ensambla los péptidos no ribosomales asociados a mecanismos de control biológico (Bankevich *et al.*, 2012), hybrid SPAdes (Antipov *et al.*, 2016), Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2008), IDBA-UD v1.1.1 (Peng *et al.*, 2012), Canu (Koren *et al.*, 2017) y SOAPdenovo2 (Luo *et al.*, 2012). Una vez que el genoma ha sido ensamblado, se deben reordenar los *contigs* obtenidos basados en un genoma de referencia, mediante el programa Mauve contig Mover 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004).

genomic information removed using programs such as Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) and Cutadapt v1.18 (Martin, 2011). The genome is assembled using programs such as SPAdes v3.14.1, which assembles non-ribosomal peptides associated with biological control mechanisms (Bankevich *et al.*, 2012), hybrid SPAdes (Antipov *et al.*, 2016), Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2008), IDBA-UD v1.1.1 (Peng *et al.*, 2012), Canu (Koren *et al.*, 2017) and SOAPdenovo2 (Luo *et al.*, 2012). Once the genome has been assembled, the obtained *contigs* are rearranged based on a reference genome with the Mauve contig Mover 2.4.0 program (Darling *et al.*, 2004). Finally, the genome annotation is carried out to identify the encoding sequences and associate them with a function or identify hypothetical proteins. For this, the National Center for Biotechnology Information (NCBI) provides an automatic prokaryotic genome annotation tool. Similarly, RAST and xBASE2 are web servers used to annotate genomes of bacteria and archaea (Aziz *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2008). Genome contamination can be quantified using different software packages, such as checkM and Quast, for prokaryotes and eukaryotes (Gurevich *et al.*, 2013; Parks *et al.*, 2015). Recently, bioinformatics tools *in silico* have been developed for taxonomic affiliation of bacterial species (Figure 2), of which the most important is the overall genome relatedness indices (OGRI), such as the average nucleotide identity (ANI) and the genome-to-genome distance calculator (GGDC), to replace the DNA–DNA hybridization standard (DDH) (Richter *et al.*, 2016). This has been used to study prokaryotes only since there is no equivalent OGRI for fungal strains (Raja *et al.*, 2017).

ANI is widely used to establish similarity between two prokaryote species at the genomic level (Yoon *et al.*, 2017) and is defined as the average percent of nucleotide sequences identity

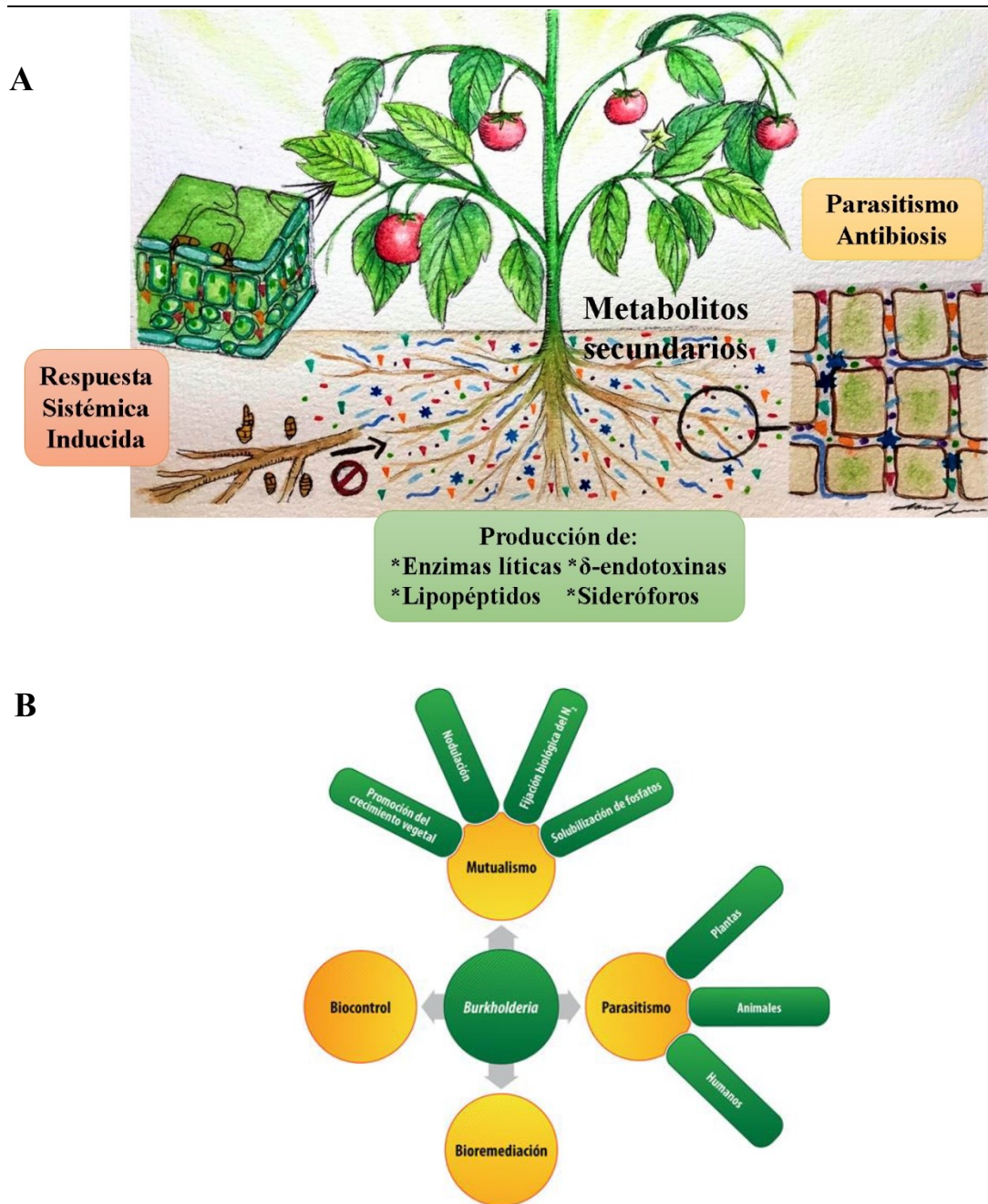


Figura 1. A. Mecanismos de acción más estudiados y reportados en agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) (Fuente: Autores). B. Multiplicidad de funciones bióticas-abióticas que pueden estar asociados con un ACB-M. Caso *Burkholderia* (Fuente: Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Figure 1. A. Mechanisms of action that have been most studied and reported in biological control agents of microbial origin (BCA-M) (Source: Authors). B. Multiple biotic-abiotic functions that can be associated with an BCA-M, *Burkholderia* case (Source: Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

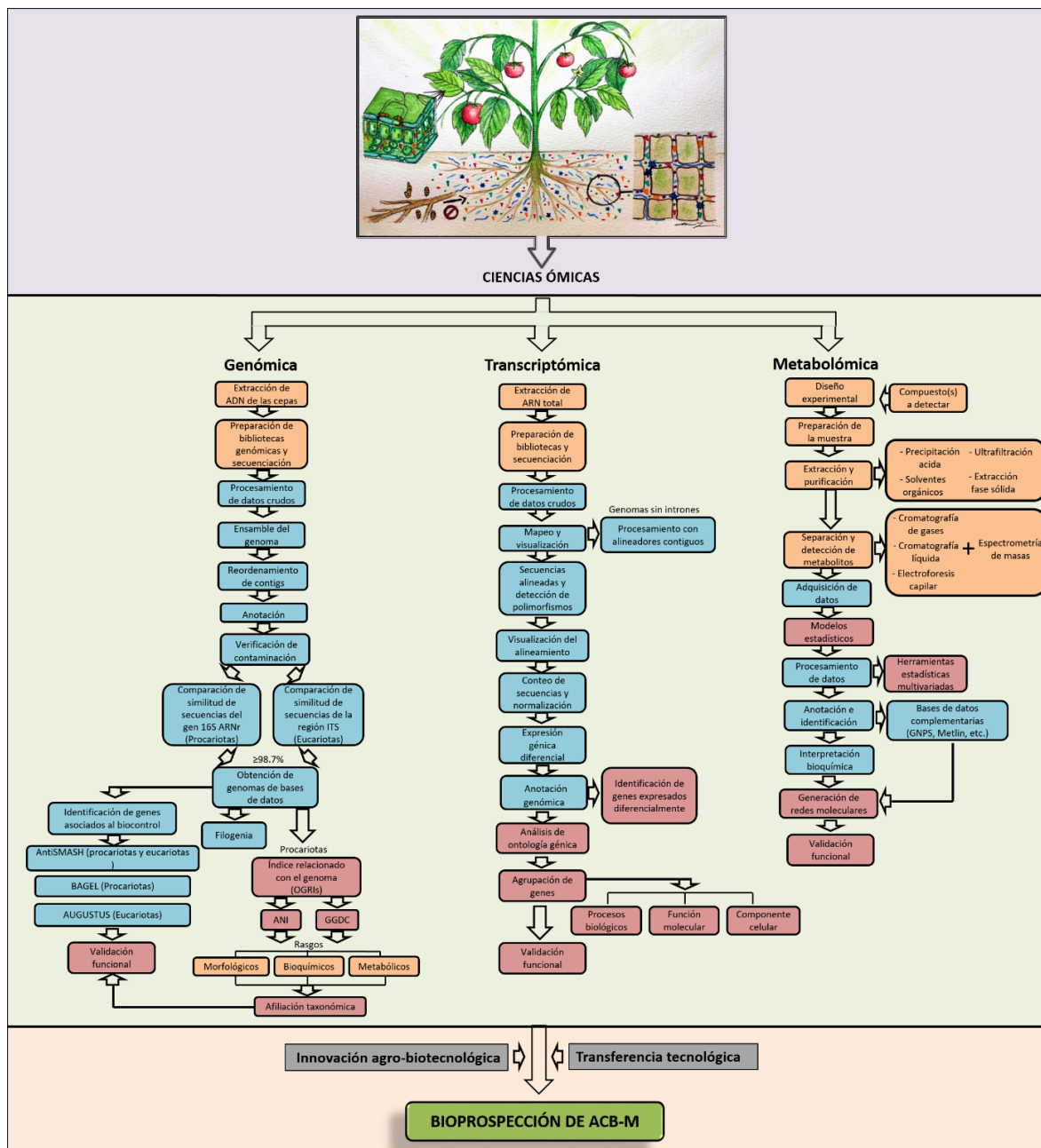


Figura 2. Flujo de procesos metodológicos genómicos y metabólicos empleados en investigación taxonómica y para establecer mecanismos de acción de agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) aplicados en la supresión de fitopatógenos.

Figure 2. Workflow of the genomic and metabolic methodological processes used in taxonomic research and to establish the mechanisms of action of biological control agents of microbial origin (BCA-M) to suppress phytopathogens.

Finalmente, la anotación del genoma se lleva a cabo para identificar las secuencias codificantes y asociarles una función, o identificar proteínas hipotéticas; para esto el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) proporciona una herramienta de anotación de genoma procariótico automático. Similarmente, RAST y xBASE2 son servidores web empleados para anotar genomas de bacterias y arqueas (Aziz *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2008). Por último, la contaminación del genoma se puede cuantificar con diversos softwares como checkM y Quast, para procariotas y eucariotas (Gurevich *et al.*, 2013; Parks *et al.*, 2015).

Recientemente, se han desarrollado herramientas bioinformáticas *in silico* para la afiliación taxonómica de especies bacterianas (Figura 2), entre las cuales destacan los índices generales de relación del genoma (OGRI, por sus siglas en inglés), tales como: la identidad de nucleótidos promedio (ANI, por sus siglas en inglés) y la Calculadora de distancia de genoma a genoma (GGDC, por sus siglas en inglés), para reemplazar el estándar de hibridación ADN-ADN (DDH, por sus siglas en inglés) (Richter *et al.*, 2016). Lo anterior sólo se ha utilizado para el estudio en procariotas, ya que para cepas fúngicas no existen equivalentes de OGRI (Raja *et al.*, 2017).

De esta manera, ANI es ampliamente utilizada para establecer la similitud -a nivel genómico- entre dos especies procariotas (Yoon *et al.*, 2017), y es definida como el porcentaje promedio de identidad de secuencias de nucleótidos de genes ortólogos compartidos entre dos genomas (Sentausa and Fournier, 2013). El valor ANI del genoma en estudio corresponde al promedio de los valores de identidad entre todos los pares de fragmentos ortólogos entre dos genomas. El valor de ANI empleado para afiliar una cepa a una especie bacteriana previamente descrita es  $\geq 95-96\%$  (Varghese *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2019).

of orthologous genes shared between two genomes (Sentausa and Fournier, 2013). The ANI value of the genome under study corresponds to the average of the identity values among all the pairs of orthologous fragments between two genomes. The ANI value used to affiliate a strain to a bacterial species previously described is  $\geq 95-96\%$  (Varghese *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2019).

On the other hand, unlike ANI (index similarity type), GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) is an OGRI based on the distance ratio which enables the alignment of the genome of interest with one of reference; then a set of high-scoring segment pairs (HSP) is obtained, known as “intergenomic coincidences”, from which specific distance formulae are calculated to transform the HSP data to a GGDC value (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), using a  $>70\%$  GGDC value to taxonomically affiliate a strain to a bacterial species previously reported.

Currently, the use of tools and strategies focused on robust and comprehensive BCA-M taxonomic affiliation (based on genome sequencing and polyphasic studies) is experiencing a boom in Mexico. For example, one of these studies was recently published by de los Santos-Villalobos *et al.* (2019), who reported a new bacterial species with biological control capacity against *Bipolaris sorokiniana*, an emerging agent that causes spot blotch in wheat in the Yaqui Valley, Mexico. Initially, this bacterial strain (TE3<sup>T</sup>) was affiliated to the *Bacillus* genus based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2018). Then, Villa-Rodriguez *et al.* (2019) proposed its taxonomic affiliation to the *B. subtilis* species by sequencing the whole 16S rRNA gene. Finally, the sequencing and study of the whole genome, the OGRI analysis (ANI and GGDC), and the polyphasic characterization of strain TE3<sup>T</sup> allowed a robust taxonomic affiliation of this BCA to a new bacterial species, termed *B. cabrialesii* (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019). *Bacillus cabrialesii*



Por otra parte, a diferencia de ANI (índice de tipo similitud), GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) es un OGRÍ basado en la relación de distancia, que permite que se alinee el genoma de interés contra uno de referencia; posteriormente, se obtiene un conjunto de pares de segmentos de alta puntuación (HSP), titulados “coincidencias intergenómicas”, a partir de los cuales se calculan fórmulas de distancia específica para transformar los datos de HSP en el valor de GGDC (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), utilizando un valor de GGDC >70% para afiliar taxonómicamente una cepa a una especie bacteriana previamente reportada.

En la actualidad, el uso de estas herramientas y estrategias enfocadas a una afiliación taxonómica robusta e integral de ACB-M (basadas en la secuenciación de genomas y estudios polifacéticos) se encuentra en auge en México. Por ejemplo, uno de estos trabajos fue recientemente publicado por de los Santos-Villalobos *et al.* (2019), quienes reportaron una nueva especie bacteriana con capacidad de control biológico contra *Bipolaris sorokiniana*, agente emergente causante de la mancha borrosa en el trigo, en el Valle del Yaqui, México. Inicialmente, esta cepa bacteriana (TE3<sup>T</sup>) fue afiliada al género *Bacillus*, con base a la secuenciación parcial del gen 16S ARNr (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2018). Posteriormente, Villa-Rodríguez *et al.* (2019) propusieron su afiliación taxonómica a la especie *B. subtilis*, mediante la secuenciación completa del gen 16S ARNr. Finalmente, la secuenciación y estudio completo del genoma, el análisis de OGRÍs (ANI y GGDC), y la caracterización polifacética de la cepa TE3<sup>T</sup> permitieron una afiliación taxonómica robusta de este ACB a una nueva especie, nombrada *B. cabrialesii* (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019). La inoculación de *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> en plantas de trigo infectadas por *B. sorokiniana* resultó en la mitigación de la enfermedad reduciendo la escala de severidad de infección en hoja de 3-5

TE3<sup>T</sup> inoculation in wheat plants infected by *B. sorokiniana* mitigated the disease by reducing the 3-5 severity scale of leaf infection and the density of lesions to  $3.06 \pm 0.6$  cm<sup>-2</sup> leaves compared to plants inoculated with the phytopathogen (8-9 and  $6.46 \pm 1.46$  lesions cm<sup>-2</sup>).

**Study of the action mechanisms in BCA-M.** In recent decades, studies of the effect of BCA-M in phytopathogens management have been carried out. This has been useful to elucidate the different mechanisms used by these agents to reduce the growth, development, and infection of phytopathogens in cultivated plants. Among the interaction mechanisms with suppressive effects that have been most studied and reported are i) mycoparasitism; ii) antibiosis; iii) lytic enzymes activity; iv) siderophore biosynthesis; v) production of  $\delta$ -endotoxins; vi) lipopeptides biosynthesis; and vii) induced systemic response (Figure 1A). However, since the action of the BCA-M involves non-parasitic phases that are essential for their adaptation to the edaphic or endophytic environment and ensure their suppressive activity, they must be systematically studied to design soil, substrate, or plant bioremediation strategies (Figure 1B).

In Mexico, based on the contributions published by the Mexican Journal of Phytopathology and other national and international scientific journals, there are many scientific studies focused on the selection and evaluation *in vitro* of promising BCA-M. Although to a lesser extent, the specific mechanisms of action previously mentioned have been also explored (Table 2 and Figure 1). However, the innovation of biopesticides developed in Mexico and other countries requires that new BCA along with the mechanisms responsible for the activity observed be identified, both in new strains and in those that have been already reported, because the



y la densidad de lesiones a  $3.06 \pm 0.6 \text{ cm}^{-2}$  hoja, en comparación con plantas inoculadas con el fitopatógeno (8 - 9 y  $6.46 \pm 1.46$  lesiones  $\text{cm}^{-2}$ ).

**Estudio de los mecanismos de acción de ACB-M.** Durante las últimas décadas se ha estudiado el efecto de ACB-M en el manejo de fitopatógenos. Lo anterior, ha permitido dilucidar los diferentes mecanismos empleados por dichos agentes para reducir el crecimiento, desarrollo e infección de fitopatógenos en plantas cultivadas. Entre los mecanismos de interacción con efectos supresivos más estudiados y reportados destacan i) micoparasitismo, ii) antibiosis, iii) actividad de enzimas líticas, iv) biosíntesis de sideróforos, v) producción de  $\delta$ -endotoxinas, vi) biosíntesis de lipopéptidos, y vii) respuesta sistémica inducida (Figura 1A). Sin embargo, la acción de los ACB-M implican fases no parasíticas determinantes en su adaptación al medio edáfico o endofítico para garantizar su actividad supresiva, por lo que deben estudiarse de manera sistémica para diseñar estrategias de bioremediación de suelos, sustratos u órganos vegetales (Figura 1B).

En México, con base en las contribuciones publicadas en la Revista Mexicana de Fitopatología y revistas nacionales e internacionales en el área, existe un gran número de trabajos científicos desarrollados para la selección y evaluación *in vitro* de ACB-M promisorios. Aunque en menor proporción, también se han explorado mecanismos de acción específicos descritos anteriormente (Cuadro 2 y Figura 1). Sin embargo, la innovación de bio-plaguicidas desarrollados en México y otros países demanda la identificación de nuevos ACB y los mecanismos responsables de la actividad observada, tanto en nuevas cepas como en aquellas ya reportadas, debido a que no necesariamente los mecanismos o metabolitos que emplean dichos ACB *in vitro* son los responsables del efecto observado

mechanisms or metabolites used by those BCA are not necessarily responsible for the observed effect or are directly related to their bioactivity in the field. Consequently, state-of-the-art and integrating strategies that allow a better understanding of the mechanisms of action of the BCA-M under field conditions must be implemented. This would increase the probabilities of success in implementing these agents in the agricultural sector, thereby optimizing the production processes, scaling new bioproducts, and promoting the innovation of those already registered and available on the market.

**Genomic studies of BCA-M to identify potential mechanisms of action.** So far, several strategies and platforms have been developed to identify *clusters* of genes in genomes associated with biological control, especially those related to non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) (Figure 2). These secondary metabolites exhibit a significant variety of biological activities, and many of them are clinically valuable antimicrobial, antifungal, antiparasitic, antitumor, and immunosuppressant compounds (Ansari *et al.*, 2004). Among the tools to identify those *clusters* of genes in the genome of BCA of bacterial origin are PRISM (Skinnider *et al.*, 2017), CLUSEAN (Weber *et al.*, 2009), RIPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017), and for fungal genomes, SNAP (Jhonson *et al.*, 2008), Augustus (Keller *et al.*, 2011) and GeneMark-ES (Borodovsky and Lomsadze, 2011). However, the AntiSMASH 5.0 and BAGEL4 tools have been widely reported and used for these purposes, but the identification of genes associated with the BCA-M activity using these tools is predictive, and, for this reason, their expression and function *in vivo* must be further studied and complemented with other strategies that will be later described.

o están relacionados de forma directa con su bioactividad en campo. En consecuencia, es determinante el empleo de estrategias de vanguardia e integradoras que permitan un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los ACB-M bajo condiciones de campo. Lo anterior incrementaría las probabilidades de éxito de estos agentes en su implementación agrícola y permitiría la optimización de procesos de producción y escalamiento de nuevos bioproductos, y la innovación de bioproductos ya registrados y disponibles en el mercado.

**Estudios genómicos de ACB-M para la identificación de potenciales mecanismos de acción.** En la actualidad, se han desarrollado diversas estrategias y plataformas enfocadas a la identificación de *clusters* de genes en el genoma asociados al control biológico, principalmente aquellos relacionados a las sintetetas de péptido no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés) y las policétido sintetas (PKS, por sus siglas en inglés) (Figura 2). Estos metabolitos secundarios exhiben una significativa diversidad de actividades biológicas, y muchos de ellos son compuestos antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitarios, antitumorales e inmunosupresores clínicamente valiosos (Ansari *et al.*, 2004). Entre las herramientas empleadas para la identificación de dichos *clusters* de genes en el genoma de ACB de origen bacteriano se encuentran PRISM (Skinnider *et al.*, 2017), CLUSEAN (Weber *et al.*, 2009), RIPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017), mientras que para genomas fúngicos destacan SNAP (Johnson *et al.*, 2008), Augustus (Keller *et al.*, 2011) y GeneMark-ES (Borodovsky y Lomsadze, 2011). Sin embargo, las herramientas AntiSMASH 5.0 y BAGEL4 han sido ampliamente reportadas y utilizadas para estos fines; no obstante, la identificación de genes asociados a la actividad de los ACB-M mediante estas herramientas es predictiva, por lo que, su expresión y función *in vivo* debe ser

AntiSMASH 5.0 uses the HMMer3 tool (<http://hmmer.janelia.org/>) and the translations of the amino acid sequence of all the encoding genes, which are analyzed with profile hidden Markov models (pHMM) based on alignments of multiple sequences associated with experimentally characterized proteins or proteins/domains (Blin *et al.*, 2019). The detection stages use a filtering logic of negative and positive pHMM and their cut-off points, based on the knowledge of the minimum basic components of each type of *clusters* of the genes reported in the scientific literature.

On the other hand, BAGEL4 translates into six proteins [one for each open reading framework (ORF)], each of the encoding genes of the BCA genome that is being studied (Van Heel *et al.*, 2018). These proteins are examined to detect the occurrence of certain protein motifs (elements conserved in an amino acid sequence that is usually associated with a specific function) and compared to a peptide database. Finally, the areas of interest (AOI) are identified and thoroughly analyzed. The ORF in AOI are first analyzed using Glimmer3 (Delcher *et al.*, 2007). This program is set up in such a way that Glimmer3 creates a model for each defined AOI. Later, small ORF are named in the intergenic regions. The default setup for these ORFs is a minimum length of 72 bp (24 amino acid residues) and a superposition of 10 bp is allowed with the ORF of Glimmer3.

Currently, the use of these tools for the integrative approach of the potential mechanisms of action of BCA-M are being exponentially developed in Mexico. An example of this is the research of Valenzuela-Ruiz *et al.* (2019), who used this strategy to identify an BCA-M taxonomically affiliated, by studying its genome and OGRIs, as *Bacillus paralicheniformis* TRQ65. The study of the *clusters* of genes associated with NRPS and PKS of the *B. paralicheniformis* TRQ65 genome

ampliamente estudiada y complementadas con otras estrategias que se describirán posteriormente.

AntiSMASH 5.0 utiliza la herramienta HMMer3 (<http://hmmer.janelia.org/>), y las traducciones de la secuencia de aminoácidos de todos los genes codificantes, mismas que se analizan con modelos de perfil oculto de Markov (pHMM, por sus siglas en inglés), basados en alineamientos de secuencias múltiples asociadas a proteínas o proteínas/dominios experimentalmente caracterizados (Blin *et al.*, 2019). La etapa de detección utiliza una lógica de filtrado de pHMM negativos y positivos, y sus puntos de corte, donde se basa en el conocimiento de los componentes básicos mínimos de cada tipo *clusters* de genes reportados en la literatura científica.

Por otra parte, BAGEL4 traduce en seis proteínas [una para cada marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés)], cada uno de los genes codificantes del genoma del ACB estudiado (Van Heel *et al.*, 2018). Estas proteínas se examinan para detectar la ocurrencia de ciertos motivos proteicos (elementos conservados en una secuencia de aminoácidos que habitualmente se asocian con una función específica), y se compara con la base de datos de péptidos. Finalmente, las áreas de interés (AOI, por sus siglas en inglés) son identificadas y analizadas a detalle. Los ORF en el AOI se analizan de primera instancia usando Glimmer3 (Delcher *et al.*, 2007). El programa está configurado para que Glimmer3 realice un modelo para cada AOI definida. Posteriormente, ORF pequeños se denominan en las regiones intergénicas. La configuración pre-determinada para estos ORF es una longitud mínima de 72 bp (24 residuos de aminoácidos) y se permite una superposición de 10 pb con los ORF de Glimmer3.

Actualmente, el empleo de estas herramientas para el acercamiento integrativo de los potenciales mecanismos de acción de ACB-M se están

made it possible to identify nine genes associated with the lipopeptide biosynthesis: lichenicidin, haloduracin, bacteriocin, enterocin and sonorensin (by BAGEL4), and eight genes associated with the lipopeptide biosynthesis: bacillibactin, butirosin, lichenysin, bacitracin, and haloduracin (by antiSMASH). The functionality of those genes was validated through essays of dual confrontation against *Bipolaris sorokiniana*, where an inhibition area of  $1.6 \pm 0.4$  cm was observed, which confirmed the functionality of the putative genes found in the genome of strain TRQ65, associated with biological control of phytopathogens (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

**Transcriptomic studies to identify potential mechanisms of action of BCA-M.** The modulation in the gene expression of an organism, associated with its interaction with biotic and/or abiotic factors, is found by conducting transcriptomic studies, which are focused on the study of the gene expression, co-expression patterns, signaling cascades, and regulated molecular mechanisms during a biological condition and specific time (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020).

The transcriptomic studies are highly dependent on high-quality total RNA extracted under the specific conditions of the study, followed by sample preparation and sequencing (Figure 2). The reads taken are filtered through a quality analysis using FastQC (Andrews, 2010), the adapters and low-quality reads are removed using Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) or Prinseq (Schmieder and Edwards, 2011). Subsequently, the reads are aligned with and mapped to a reference genome (or transcriptome) to identify and quantify the regulation of the genes and find out what their allelic variants are (Rollano-Peñaloza and Mollinedo-Portugal 2017). The organisms whose genomes have no introns are processed with contiguous

desarrollando de forma exponencial en México. Ejemplo de ello, es el trabajo de Valenzuela-Ruiz *et al.* (2019) quienes emplearon esta estrategia para la identificación de un ACB-M afiliado taxonómicamente, a través del estudio de su genoma y OGRIs, como *Bacillus paralicheniformis* TRQ65. El estudio de los *clusters* de genes asociados a NRPS y PKS del genoma de *B. paralicheniformis* TRQ65 permitió identificar nueve genes asociados con la biosíntesis de lipopéptidos: lichenicidina, haloduracina, bacteriocina, enterocina y sonorenina (por BAGEL4), y ocho genes asociados con la biosíntesis de lipopéptidos: bacillibactina, butirocina, liquenicina, bacitracina y haloduracina (antiSMASH). La funcionalidad de dichos genes se validó mediante ensayos de confrontación dual contra *Bipolaris sorokiniana*, observando una zona de inhibición de  $1.6 \pm 0.4$  cm, lo que confirmó la funcionalidad de los genes putativos encontrados en el genoma de la cepa TRQ65, asociados al control biológico de fitopatógenos (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

**Estudios transcriptómicos para la identificación de potenciales mecanismos de acción de ACB-M.** La modulación en la expresión génica de un organismo, asociadas a sus interacciones con factores bióticos y/o abióticos, son reveladas por estudios transcriptómicos; los cuales se centran en el estudio de la expresión génica, patrones de co-expresión, cascadas de señalización y mecanismos moleculares regulados durante una condición biológica y tiempo específico (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). Los estudios transcriptómicos son altamente dependientes del ARN total de alta calidad extraído bajo las condiciones específicas de estudio, seguido de la preparación y secuenciación de las muestras (Figura 2). Las lecturas obtenidas son filtradas mediante un análisis de calidad por FastQC (Andrews, 2010), se eliminan los adaptadores y lecturas de

aligners, such as Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) or BWA (Li and Durbin 2009), which are designed to align DNA. Conversely, the best option when there are genomes with introns is the use of aligners such as Tophat2 (Kim *et al.*, 2013), Hisat2 (Kim *et al.*, 2013), STAR (Dobin *et al.*, 2013), GSNAP (Wu and Nacu 2010), SOAP2 (Li *et al.*, 2009) or Kallisto (Bray *et al.*, 2016). The assembly of transcripts and estimation of abundances is usually performed with Cufflinks and Cuffmerge (Trapnell *et al.*, 2009), but there are also reports of transcriptomic studies using DESeq (Love *et al.*, 2014) or HTSeq-count (Anders and Huber, 2015).

The aligned sequences can be arranged with Samtools (Li, 2011) and Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). This information can be used by programs such as Bedtools (Quinlan and Hall, 2010) to detect single-nucleotide polymorphisms (SNP) (Rollano-Peñaloza and Mollinedo-Portugal, 2017). The appropriate analysis of the gene expression is based on a standardization due to the different genome sizes and depth variation in each sample sequencing. Therefore, when studying *de novo* transcriptomes, it is recommended to use RSEM software (Li and Dewey, 2011) because it also provides standardization values. Then, to identify the differentially expressed genes, a genomic annotation must be performed by aligning the sequences of the genes that were identified as significantly expressed (Camacho *et al.*, 2009). Then, the gene families and/or their products are identified using software packages such as HMMER (Potter *et al.*, 2018), InterProScan (Mitchell *et al.*, 2015), and SignalP (Petersen *et al.*, 2011). Finally, a gene ontology analysis (GO) is carried out, whereby genes are grouped by biological processes, molecular function, cell component and metabolic pathway analysis (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2004) and other more complex groups (PANTHER) (Mi *et al.*, 2013), where tools such as AgriGO (Tian *et*

baja calidad por Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) o Prinseq (Schmieder y Edwards, 2011). Posteriormente, se procede con el alineamiento y mapeo de las lecturas con un genoma (o transcriptoma) de referencia para identificar y cuantificar la regulación de los genes, así como conocer sus variantes alélicas (Rollano-Peñaloza y Mollinedo-Portugal 2017). Los organismos cuyos genomas no presentan intrones son procesados con alineadores continuos, como Bowtie2 (Langmead y Salzberg 2012) o BWA (Li y Durbin 2009), diseñados para alinear ADN. Caso contrario, cuando se tienen genomas que poseen intrones es mejor utilizar alineadores como Tophat2 (Kim *et al.*, 2013), Hisat2 (Kim *et al.*, 2013), STAR (Dobin *et al.*, 2013), GSNAP (Wu y Nacu 2010), SOAP2 (Li *et al.*, 2009) o Kallisto (Bray *et al.*, 2016). El ensamble de transcritos y la estimación de sus abundancias es realizado por lo general con Cufflinks y Cuffmerge (Trapnell *et al.*, 2009); aunque también se han reportado estudios transcriptómicos utilizando DESeq (Love *et al.*, 2014) o HTSeq-count (Anders y Huber, 2015).

Las secuencias alineadas pueden ser ordenadas con el uso de Samtools (Li, 2011) y Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Esta información puede ser utilizada por programas como Bedtools (Quinlan y Hall, 2010) para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) (Rollano-Peñaloza y Mollinedo-Portugal, 2017). El análisis apropiado de expresión génica se basa en una normalización debido a los diversos tamaños de los genes y a la variación de la profundidad en la secuenciación de cada muestra. De esta manera, en el estudio de transcriptomas *de novo* es recomendado el software RSEM (Li y Dewey, 2011), que también proporciona valores de normalización. Posteriormente, para la identificación de genes expresados diferencialmente se debe realizar una anotación genómica, mediante un alineamiento de las secuencias de los genes que se fueron iden-

*al.*, 2017) are used to visualize, through hierarchical trees, the GO terms that are significantly expressed. Another approach can be the use of primers or primers of specific genes that have previously shown mechanisms of action of interest to quantify the gene expression through qPCR or ddPCR. This technique avoids the transcriptomic study of an organism.

Several reports have been published worldwide about the use of transcriptomics focused on understanding the biological control mechanisms during the plant-pathogen-BCA interaction by conducting studies of the gene expression in BCA-M (in the presence of a phytopathogen *in vitro* or in the field); the regulation of the gene expression in the pathogen or in the host plant (in the presence of the BCA-M or its metabolites); the impact of the phytopathogens on the gene expression profiles; and the modulation of these profiles by the presence or absence of an BCA-M. For example, Duke *et al.* (2017) reported that *Brassica napus* (canola) is greatly affected by *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. However, when *Pseudomonas chlororaphis* PA23 was inoculated in canola in the presence of *S. sclerotiorum*, the infection rate was reduced by 91%. This result was associated with the transcriptional reprogramming in canola, *i.e.*, the plants infected with *S. sclerotiorum* positively regulated approximately 8000 genes, while the preventive treatment with *P. chlororaphis* PA23 reduced 16 times the expression of the genes previously regulated by the phytopathogen. In addition, in the absence of the pathogen, *P. chlororaphis* PA23 caused the regulation of defense genes in canola, which are involved in the induced systemic response and production of reactive oxygen species.

**Metabolomic studies to identify potential mechanisms of action of BCA-M.** As a scientific



tificados como significativamente expresadas (Carmacho *et al.*, 2009). En seguida, se procede a identificar las familias de los genes y/o sus productos mediante softwares como HMMER (Potter *et al.*, 2018), InterProScan (Mitchell *et al.*, 2015) y SignalP (Petersen *et al.*, 2011). Por último, se realiza un análisis de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés), donde permite agrupar genes por procesos biológicos, función molecular, componente celular y el análisis de rutas metabólicas (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2004) y otras agrupaciones de mayor complejidad (PANTHER) (Mi *et al.*, 2013), y así herramientas como AgriGO (Tian *et al.*, 2017) permiten visualizar -mediante arboles jerárquicos- los términos GO significativamente expresados. Otro enfoque puede ser el empleo de primers o iniciadores de genes específicos previamente identificados con mecanismos de acción de interés para su empleo en qPCR o ddPCR para cuantificar la expresión génica. Esta técnica evita el estudio transcriptómico de un organismo.

Diversas investigaciones han sido publicadas a nivel mundial sobre el uso de la transcriptómica para el entendimiento de mecanismos de control biológico durante la interacción planta-patógeno-ACB mediante el estudio de los perfiles de expresión génica en el ACB-M (en presencia del fitopatógeno *in vitro* o en campo); regulación de la expresión de genes en el fitopatógeno o en la planta hospedera (en presencia del ACB-M o sus metabolitos); impacto del fitopatógeno sobre los perfiles de expresión génica de su hospedero; y la modulación de estos perfiles por la presencia o ausencia del ACB-M. Por ejemplo, Duke *et al.* (2017) reportaron que el cultivo de *Brassica napus* (canola) es fuertemente afectado por *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de la pudrición del tallo de canola; sin embargo, la inoculación de *Pseudomonas chlororaphis* PA23 a la canola en presencia de *S. sclerotiorum*, redujo la tasa de infección en 91%. Lo

approach based on data to detect and quantify hundreds of metabolites by differential analyses (Lloyd *et al.*, 2015), metabolomics is ideal for analyzing complex interactions at the metabolic level during plant-microorganisms-environment interactions.

The metabolomic studies are based, in the first place, on establishing the experimental condition for the study (Figure 2) by which the strategy of sample preparation will be established (focused on the type of compounds to be detected, including extractions with organic solvents or solid-phase extractions), followed by sample preparation, either by concentration or purification (Mhlongo *et al.*, 2018). Then, the separation and detection of metabolites of interest is carried out using gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE) coupled to mass spectrometry (MS) (Naz, 2014). CE separates the compounds depending on the charge and size and provides high-resolution power. CE-MS is mainly used for primary-intermediate metabolic pathways and is usually coupled to a TOF mass analyzer (Ramautar *et al.*, 2016). In recent years, MS imaging (MSI) has evolved and has been used in different metabolic studies to obtain the distribution of compounds in tissue areas (cells, tissue, or specific sections) (Mhlongo *et al.*, 2018). Compared to other traditional molecular imaging techniques, MSI makes it possible to obtain more information by providing the distribution of characteristics of a wide range of metabolites at high resolution (Schwamborn, 2012).

Metabolomics, the same as other omics tools, produces a large amount of complex data which require storage and processing instruments. These data can be processed using free statistical tools such as MarVis1, Mzine, XCMS, MAVEN, Metaboanalyst and MetAlign (Benton *et al.*, 2008), or commercial programs: Markerlynx (Waters),

anterior, se asoció a la reprogramación transcripcional en la canola, *i.e.* las plantas infectadas con *S. sclerotiorum* regularon positivamente aproximadamente 8000 genes, mientras que el tratamiento preventivo con *P. chlororaphis* PA23 disminuyó 16 veces la expresión de los genes previamente regulados por el fitopatógeno. Además, en ausencia del patógeno, se observó que *P. chlororaphis* PA23 causó la regulación de genes de defensa en la canola, los cuales están involucrados en la respuesta sistémica inducida y la producción de especies reactivas de oxígeno.

**Estudios metabolómicos para la identificación de potenciales mecanismos de acción de ACB-M.** La metabolómica, como un enfoque científico basado en datos para detectar y cuantificar cientos de metabolitos por análisis diferencial (Lloyd *et al.*, 2015), es ideal para el análisis de interacciones complejas, a nivel de metabolitos, durante las interacciones planta-microorganismos-ambiente.

Los estudios metabolómicos se basan primeramente en establecer la condición experimental para el estudio (Figura 2), con lo cual se definirá la estrategia de preparación de la muestra (enfocada el tipo de compuestos a detectar, incluyendo extracciones con solventes orgánicos o extracción de fase sólida), seguido por la preparación de la muestra ya sea concentrándola o purificándola (Mhlongo *et al.*, 2018). Posteriormente, se realiza una separación y detección de metabolitos de interés a través de cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés), o la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) acopladas a la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) (Naz, 2014). La CE separa los compuestos según la carga y el tamaño, y ofrece un alto poder de resolución. La CE-MS se utiliza principalmente para vías metabólicas primarias-intermedias, y por lo general se acopla a un analizador de masas TOF (Ramautar *et*

profile creation solutions (Shimadzu), Mass Profiler. pro (Agilent) and metabolic profiler (Bruker) (Mhlongo *et al.*, 2018). Multivariate statistical tools are also used to reduce data dimensionality, variable discrimination, and to form groups based on shared characteristics among samples (*i.e.*, n-strains); part of these are the Principal Component Analysis and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) (Worley and Powers, 2013). Finally, the metabolites are annotated and identified using complementary databases which contain mass ranges, compound name and structures, statistical models, and metabolic pathways (Fukushima and Kusano, 2013). Recently, several databases have been developed that contain statistical and metabolomic tools based on MS or nuclear magnetic resonance, *i.e.*, MeRy-B, MeltDB, and SetupX (Fukushima and Kusano, 2013).

The addition of metabolomic approaches to understanding the mechanisms of action of the BCA-M are highly valuable for the agricultural sector due to the wide diversity of metabolites produced by the BCA-M with high agro-biotechnological potential, and the knowledge of the metabolites involved in phytopathogens biological control during the BCA-host-phytopathogen-environment interaction. For example, Vinale *et al.* (2014), using metabolomic approaches, identified a new metabolite produced by *Trichoderma harzianum*, called isoharzianic acid, which inhibits the growth of phytopathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. The isoharzianic acid also improves tomato seed germination and induces systemic resistance in plants. Similarly, other metabolites associated with biological control were reported for *Trichoderma*, such as hetelidic acid, sorbicilinol, trichodermanone C, giocladic acid and bisorbicilinol (Kang *et al.*, 2011).

It is essential that in Mexico important agricultural producer support be strengthened

*al.*, 2016). En los últimos años, la imagenología de MS (MSI, por sus siglas en inglés) ha avanzado y se ha aplicado en diferentes estudios metabólicos que proporciona la distribución de compuestos en superficie tisular (células, tejido o secciones específicas) (Mhlongo *et al.*, 2018). En comparación con otras técnicas tradicionales de imagenología molecular, la MSI permite obtener mayor información al proporcionar una distribución de características con alta resolución para una amplia gama de metabolitos (Schwamborn, 2012).

La metabolómica, como otras herramientas ómicas, genera grandes cantidades de datos complejos que requieren instrumentos de almacenamiento y procesamiento. Lo anterior se puede procesar mediante herramientas estadísticas gratuitas como MarVis1, Mzine, XCMS, MAVEN, Metaboanalyst y MetAlign (Benton *et al.*, 2008); así como programas comerciales: Markerlynx (Waters), soluciones de creación de perfiles (Shimadzu), Mass Profiler.pro (Agilent) y perfilador metabólico (Bruker) (Mhlongo *et al.*, 2018). Además, se utilizan herramientas estadísticas multivariadas para reducir la dimensionalidad de los datos, la discriminación de variables, y agrupar mediante características compartidas entre muestras (*i.e.* n-cepas); dentro de los cuales se encuentran los análisis de componentes principales y el análisis discriminante de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS-DA, por sus siglas en inglés) supervisado (Worley y Powers, 2013). Por último, se anotan e identifican los metabolitos mediante el uso de bases de datos complementarias que incorporan espectros de masas, nombres y estructuras de compuestos, modelos estadísticos y rutas metabólicas (Fukushima y Kusano, 2013). Recientemente, se han desarrollado varias bases de datos que incorporan herramientas estadísticas y metabolómicas basadas en la MS o resonancia magnética nuclear, *i.e.* MeRy-B, Mel-tDB y SetupX (Fukushima y Kusano, 2013).

for cutting-edge scientific research focused on the polyphasic taxonomic affiliation of BCA-M and the integrative study of the knowledge of the mechanisms of action of those agents during the interaction with the host plant, the phytopathogen, and the environment. This will strengthen the development, innovation, and success of the use of formulated and registered bioproducts and thus provide a sustainable and ecological alternative to benefit crop health.

**Agroecological perspectives of BCA-M supported by omics sciences.** The use of BCA-M is a functional and economically viable alternative for controlling phytopathogens. However, it is important to create and strengthen regional stocks to identify potential BCA-M and delve into the study of their mechanisms of action under field conditions, since this will make it possible to know with a greater degree of certainty what the diverse aspects that impact their establishment and functionality are, such as specific suppression actions, as well as the action threshold density, population dynamics, interspecific competence and mechanisms of physicochemical adaptation to the edaphic environment and plant. This knowledge would help establish doses, frequency, and multiplication-application substrates.

Among the aspects identified that are determinant to increase the efficiency of the BCA-M actions in the field, is the activation of the induced systemic response (ISR) through the recognition of microorganisms-associated molecular patterns (MAMPs) to pathogens (PAMPs), or damage (DAMPs) (Figure 2). This kind of signal in plants makes it possible to detect the pathogen and reduce its colonization in the infection spot, and even activate the systemic mechanisms in the plant's distal tissues (Burketova *et al.*, 2015). Thus, ISR is a plant status which, through biotic factors

La incorporación de enfoques metabolómicos para entender los mecanismos de acción de los ACB-M son de gran valor para el sector agrícola, debido a la amplia diversidad de metabolitos producidos por los ACB-M con alto potencial agrobiotecnológico, así como el conocimiento de los metabolitos implicados en el control biológico de fitopatógenos durante la interacción ACB-hospedero-fitopatógeno-ambiente. Por ejemplo, Vinale y colaboradores (2014), a través de enfoques metabolómicos, identificaron la producción de un nuevo metabolito producido por *Trichoderma harzianum*, nombrado como ácido isoharziánico, el cual inhibe el crecimiento de fitopatógenos como: *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*. Además, el ácido isoharziánico mejora la germinación de semillas de jitomate e induce resistencia sistémica en plantas. De forma similar, otros metabolitos asociados al control biológico fueron reportados para *Trichoderma*, tales como: ácido hetelídico, sorbicilinol, tricodermanona C, ácido giocládico y bisorbicilinol (Kang *et al.*, 2011).

Es primordial que en México un importante productor agrícola, se fortalezcan los apoyos a la investigación científica de vanguardia enfocada a la afiliación taxonómica polifacética de ACB-M, y el estudio integrativo del conocimiento de los mecanismos de acción de dichos agentes durante la interacción con la planta hospedera, el fitopatógeno, y ambiente. Lo anterior, permitirá potenciar el desarrollo, innovación, y el éxito del uso de bio-productos formulados y registrados con el fin de proporcionar una alternativa ecológica sustentable que beneficien la sanidad de los cultivos.

**Perspectivas agroecológicas de ACB-M con sustento en ciencias ómicas.** El uso de ACB-M es una alternativa funcional y económicamente viable para el control de fitopatógenos. Sin embargo, es fundamental realizar y fortalecer inventarios regionales

(*i.e.*, BCA-M) or chemicals, protects itself against continuous and future phytopathogen attacks (Ku'c, 1982). This process was first reported when the phytopathogen came into contact with the root, but studies about the colonization of resistance inductors through foliar applications have proposed the initial mechanisms of that resistance. For example, Lamdan *et al.* (2015) reported that the BCA belonging to the *Gliocladium virens* and *G. atroviride* species interact with the plant and the pathogen, thereby promoting the plant's growth and inducing a systemic response through proteins that are secreted by these fungi, which reduces the disease in the aerial parts of the plant. In this way, microbial elicitors induce the systemic response and act as endogenous or exogenous activators by reprogramming the resistance genes (Gupta and Bar, 2020). Ergosterol, the main component of fungal cell membranes and action substrate of many chemical fungicides, has acted as a resistance inductor in tomato and tobacco (Granado *et al.*, 1995; Vatsa *et al.*, 2011). On the other hand, host and non-host plants of *Cladosporium fulvum* (tomato pathogen) showed that the CfHNN11 gene induces a hypersensitive response in tomato and tobacco (Xu *et al.*, 2012), which coincides with the report of Zhang *et al.* (2013), who mentioned that the *Sclerotinia sclerotiorum* protein elicitor SCFE1 induced immunity through PAMP in *Arabidopsis thaliana*. Nevertheless, compared to bacteria and oomycetes elicitors, the fungal elicitors are not yet totally understood, and the function of those detected so far is still unknown, so the need to conduct further studies prevails (Liu *et al.*, 2013).

In this way, healthy plants can be treated with systemic response inductors, but since they are not universal, more research processes are needed. To date, the induction of preventive response in plants is achieved with BCA-M to sensitize the host to respond quickly, strong, lasting, and with the least

para identificar potenciales ACB-M y profundizar sobre sus mecanismos de acción bajo condiciones de campo, lo que permitirá identificar con mayor certeza diversos aspectos que impactan en su establecimiento y funcionalidad, tales como acciones específicas de supresión, así como densidad de umbrales de acción, dinámicas poblacionales, competencia inter-específica y mecanismos de adaptación físico-química al entorno edáfico y planta. Este conocimiento permitiría establecer dosis, frecuencia y sustratos de multiplicación – aplicación.

Entre los aspectos identificados como determinantes para incrementar la eficiencia de acción de los ACB-M en campo destaca la activación de la respuesta sistémica de la planta (ISR, por sus siglas en inglés), mediante el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), a patógenos (PAMPs), o por daño (DAMPs) (Figura 2). Esta señalización en la planta permite detectar al patógeno y reducir su colonización en el sitio de infección, incluso activar mecanismos sistémicos en tejidos distales de la planta (Burketova *et al.*, 2015). Así, la IRS es un estado de la planta que, mediante factores bióticos (i.e. ACB-M) o químicos, le provee protección contra sostenidos y futuros ataques de fitopatógenos (Ku'c, 1982). Este proceso fue primeramente reportado cuando el fitopatógeno estaba en contacto con la raíz; sin embargo, estudios sobre la colonización de inductores de resistencia mediante aplicaciones foliares han propuesto los mecanismos iniciales de dicha resistencia. Por ejemplo, Lamdan y colaboradores (2015) reportaron que los ACB pertenecientes a la especie *Gliocladium virens* y *G. atroviride* interactúan con la planta y patógeno, promoviendo el crecimiento de las plantas e induciendo respuesta sistémica, mediante proteínas secretadas por dichos hongos, lo cual reduce la enfermedad en las partes aéreas de la planta. Así, el empleo de elicitors microbianos permite inducir la respuesta sis-

waste of the energy required when a phytopathogen attack occurs (Mauch-Mani *et al.*, 2017). This is because when plants are growing under field conditions, they are continually exposed to different stimuli of abiotic and biotic type (bacteria, fungi, herbivore, oomycetes, viruses, arthropods, among others), which could activate defenses in the plants and influence the improvement of their response capacity by maintaining basal levels of resistance or a biochemical memory (Mauch-Mani *et al.*, 2017). So, when a plant receives the stimulus, changes occur at the physiological, transcriptional, metabolic, and epigenetic levels, an event which is known as a preventive response induction phase for the plant to develop a faster and stronger response to a potential attack, since the plant was already prepared. This kind of preventive resistance can last and be kept during the plant's life cycle, and the induction of preventive response can be considered transgenerational (Mauch-Mani *et al.*, 2017). However, to understand the molecular mechanisms that induce a preventive response, two potential mechanisms are suggested: i) epigenetic changes in DNA methylation and modification of histones which may carry stress memories and trigger immune responses, and ii) accumulation of kinase proteins activated by mitogens (MPK) (Espinosa *et al.*, 2016).

On the other hand, another approach in the study of BCA-M is the use of secondary metabolites (SM), which is considered as a green solution in agriculture since most of those BCA can secrete their metabolites (Köhl *et al.*, 2019). In this way, the bioactive metabolites (polyketides, non-ribosomal peptides, hybrid metabolites of peptide-peptide, terpenes, siderophores, lytic enzymes, among others) are isolated and purified (Figures 1 and 2). These metabolites are of great interest not only for the scientific community but also for the agro-biotechnology industry because of their



témica y funcionan como activadores endógenos o exógenos mediante la reprogramación de los genes de resistencia (Gupta y Bar, 2020). El ergosterol, un componente principal de la membrana fúngica y sustrato de acción de muchos fungicidas químicos, ha funcionado como inductor de la resistencia en jitomate y tabaco (Granado *et al.*, 1995; Vatsa *et al.*, 2011). Por otra parte, en plantas hospederas y no hospederas de *Cladosporium fulvum* (patógeno del jitomate), se encontró que el gen CfHNN1 es capaz de inducir la respuesta hipersensible en jitomate y tabaco (Xu *et al.*, 2012), similar a lo reportado por Zhang y colaboradores (2013), quienes mencionaron que la proteína elicitora SCFE1 de *Sclerotinia sclerotiorum* indujo la inmunidad por PAMP en *Arabidopsis thaliana*. No obstante, en comparación con elicitores de bacterias y oomicetos, los elicitores fúngicos continúan sin ser comprendidos en su totalidad, y aquellos detectados hasta ahora se desconoce su función, por lo que prevalece su importancia para ser investigados (Liu *et al.*, 2013).

De esta manera, las plantas sanas pueden ser tratadas con inductores de respuesta sistémica; sin embargo, éstos no resultan ser universales, por lo cual se necesitan más procesos de investigación. Actualmente, la inducción de respuesta preventiva en plantas es abordada con ACB-M con la finalidad de sensibilizar al hospedero para responder de forma rápida, fuerte, duradera, y que el gasto de energía requerido sea menor ante un fitopatógeno (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Lo anterior, debido a que las plantas en crecimiento en condiciones de campo están constantemente expuestas a diferentes estímulos de tipo abióticos y bióticos (bacterias, hongos, herbívoros, oomicetos, virus, artrópodos, entre otros) que podrían activar defensas en las plantas, e influir para mejorar su capacidad de respuesta manteniendo niveles basales de resistencia o una memoria bioquímica (Mauch-Mani *et al.*,

biological activities against phytopathogens, such as hormones or carriers of chemical elements during biopesticide and biofertilizer production (Woo *et al.*, 2014). SM are highly diverse in chemical structure, but the biosynthesis pathways are related to the primary metabolism, such as the pathway of shikimate acid, acetyl Co-A, sugar derivatives or amino acids (Pott *et al.*, 2019). Understanding these metabolic pathways is very important for the innovation of products focused on phytopathogens control, either using traditional techniques or those labeled as omics.

A classic holistic approach that has been recently re-valuated with the advent of new technologies as metagenomics is the function of suppressive soils, whose microbial community composition keeps the phytopathogens present from infecting or multiplying in the plant of interest. Those soils can be divided into two categories: i) general suppressive soils, with a high content of microbial mass but low suppression levels; and ii) specific suppressive soils, with a high concentration of one or more microbial species and high levels of plant protection against pathogens (Mousa and Raizada, 2016). Shen *et al.* (2015) reported that the composition of the microbial community of the rhizosphere of chill pepper plants inoculated with *B. amyloliquefaciens* (a beneficial bacterium) induced *Fusarium* suppression and increased the potentially stimulating bacterial diversity (acidobacteria, firmicutes, *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeriopsis*). However, there are no recent studies about suppressive soils, especially where BCA-M are continually applied for phytopathogen management, so this kind of studies is a challenge for the agro-biotechnological sector focused on ensuring plant health in a sustainable and integrating way by using highly accurate approaches as the omics sciences.

2017). Así, cuando la planta percibe el estímulo, se producen cambios a nivel fisiológico, transcripcional, metabólico y epigenético, conocido como fase de inducción de respuesta preventiva, para que la planta desarrolle una respuesta más rápida y fuerte al potencial ataque, dado que ya estaba previamente preparada. Este tipo de resistencia previa puede ser duradera y mantenerse durante el ciclo de vida de la planta, incluso esta inducción de respuesta preventiva puede considerarse como transgeneracional (Mauch-Mani *et al.*, 2017). No obstante, para el entendimiento de los mecanismos moleculares de la inducción de respuesta preventiva, se sugieren dos mecanismos potenciales: i) cambios epigenéticos en la metilación del ADN y las modificaciones de histonas que pueden ser portadoras de memoria de estrés y desencadenantes de respuestas inmunes, y ii) la acumulación de proteína quinasas activadas por mitógenos (MPK) (Espinás *et al.*, 2016).

Por otra parte, otro de los enfoques en el estudio de los ACB-M es el empleo de sus metabolitos secundarios (MS), considerado como una solución verde en la agricultura ya que la mayoría de dichos ACB poseen la capacidad de secretar sus metabolitos (Köhl *et al.*, 2019). De esta manera, los metabolitos bio-activos (poliquétidos, péptidos no ribosomales, metabolitos híbridos de péptido-péptido, terpenos, sideróforos, enzimas líticas, entre otros) son aislados y purificados (Figura 1 y 2). Estos metabolitos resultan de gran interés no sólo para la comunidad científica sino también para la industria agro-biotecnológica, debido a las actividades biológicas que poseen contra fitopatógenos, como hormonas o transportadores de elementos químicos durante la producción de bioplaguicidas y biofertilizantes (Woo *et al.*, 2014). Los MS son altamente diversos en estructura química, pero las vías de biosíntesis se relacionan con el metabolismo primario, como la ruta del ácido shikímato, acetil Co-A, los derivados de azúcares o aminoácidos (Pott *et al.*,

The development and innovation of the agrobiotechnology sector is decisive for the extensive and successful implementation of the BCA-M in Mexico, yet it represents a great scientific challenge. There are multiple studies about BCA-M used in phytopathogens management, but further integrative and creative studies are still needed to develop or innovate profitable, effective, and ecological alternatives to strengthen the use of high-quality and safe biopesticide bioproducts required for plant health in the world.

## CONCLUSIONS

The massive use of BCA-M in Mexico and around the world requires a greater diversity of registered and marketed biopesticides. However, it is necessary to abandon the reductionist concept of implementation by using specimens from microbial culture collections, and the unrestricted regional scalability from the agroecological environment. It is necessary to create and have unlimited access to technical and scientific information that supports the relative effectiveness to the complex interactions with biotic and/or abiotic factors in the agroecosystem. This will permit the establishment of more effective development, innovation, and adoption processes of these agrobiotechnological strategies. In Mexico and other countries, the systemic and holistic research of BCA-M must be strengthened with the integration of modern approaches based on the emergence and development of the omics sciences, which can only be enhanced with highly skilled human capital and specialized scientific infrastructure. This will enable the development of more effective and cost-effective BCA-M through the bioprospection of new BCA-M and a detailed study of their taxonomic affiliation and mechanisms of action

2019). El entendimiento de estas rutas metabólicas es de gran importancia para la innovación de bio-productos enfocados al control de fitopatógenos, a través de técnicas tradicionales o aquellas catalogadas como ómicas.

Un enfoque clásico holístico, pero recientemente revalorado con el advenimiento de nuevas tecnologías como la metagenómica es el funcionamiento de suelos supresivos, cuya composición de la comunidad microbiana impide que los fitopatógenos presentes infecten o se multipliquen en la planta de interés. Dichos suelos pueden dividirse en dos categorías: i) suelos supresivos generales, los cuales tienen un alto contenido de biomasa microbiana, pero resulta en bajos niveles de supresión, y ii) los suelos supresivos específicos, que tiene una alta concentración de uno o más especies microbianas y resulta en altos niveles de protección de la planta contra patógenos (Mousa y Raizada, 2016). Shen y colaboradores (2015), reportaron que la composición de la comunidad microbiana de la rizósfera de plantas de chile inoculada con *B. amyloliquefaciens* (bacteria benéfica) indujo la supresión de *Fusarium* y aumentó la diversidad bacteriana potencialmente estimulantes (Acidobacterias, Firmicutes, *Lep-tosphaeria* y *Phaeosphaeriopsis*). Sin embargo, hace falta mayor número de estudios actuales sobre suelos supresivos, en especial donde se realizan aplicaciones constantes de ACB-M para el manejo de fitopatógenos, por lo que este tipo de estudios representa un reto para el sector agro-biotecnológico enfocado en garantizar la sanidad vegetal de forma sostenible e integradora, utilizando enfoques altamente precisos como las ciencias ómicas.

El desarrollo e innovación del sector agro-biotecnológico es determinante para la implementación extensiva y exitosa de ACB-M en México, pero representa un gran reto científico. Existen múltiples estudios de ACB-M para el manejo de fitopatógenos, pero aún requieren estudios

at the agroecosystem level. This can be achieved based on transdisciplinary thematic areas, such as microbiomes, metapopulation dynamics, functional relations at the community level, and gene-metabolic interaction in the plant-microorganisms-environment system under an adaptative and evolutionary environment. The systemic and comprehensive understanding of BCA-M in the agroecosystems, the establishment of researcher networks and biotechnological companies, as well as knowledge dissemination, will enhance the adoption of BCA-M in the Mexican cropping fields, and contribute to plant health and food security in a sustainable, economically viable and biosafety way.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) for funding the project PROFAPI 2020\_0013 “*Bacillus* sp. TSO9: *Afiliación taxonómica a nivel del genoma e identificación de genes asociados a la promoción del crecimiento en el trigo*”. They also thank the valuable suggestions from Dr. Gustavo Mora Aguilera and the panel of anonymous reviewers, which enriched the content of this manuscript.

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

integradores y creativos enfocados a la generación o innovación de alternativas rentables, efectivas y ecológicas para potenciar el uso de bioproductos bioplaguicidas con la calidad y seguridad que demanda la sanidad vegetal a nivel mundial.

## CONCLUSIONES

El empleo masivo de ACB-M en nuestro país y en el mundo demanda mayor diversidad de bioplaguicidas registrados y comercializados. Sin embargo, es necesario abandonar la concepción reduccionista de la implementación mediante el uso de especímenes de colecciones microbianas y su escalabilidad regional irrestricta del entorno agroecológico. Es necesario generar y disponer de un amplio acceso a información técnica-científica que soporte la efectividad relativa a las complejas interacciones con factores bióticos y/o abióticos del agroecosistema. Esto permitirá detonar procesos de generación, innovación y adopción más eficiente de estas estrategias agrobiotecnológicas. En México y a nivel internacional, la investigación sistémica y holística de ACB-M debe fortalecerse con la integración de enfoques vanguardistas a partir del surgimiento y desarrollo de las ciencias ómicas, las cuales solo podrán ser potenciadas con capital humano altamente capacitado e infraestructura científica especializada. Esto permitiría desarrollar la nueva generación de ACB-M eficientes y costo-efectivos mediante la bioprospección de nuevos ACB-M y el estudio detallado de su afiliación taxonómica y sus mecanismos de acción a nivel de los agroecosistemas. Lo anterior basado en ejes temáticos transdisciplinarios, tales como microbiomas, dinámicas metapoblacionales, relaciones funcionales nivel comunidad, e interacción génica-metabólica en el sistema planta-microorganismos-ambiente en un contexto adaptativo y evolutivo. El entendimiento sistémico e integral de ACB-M en los agroecosistemas, la generación de redes de investigadores y empresas biotecnológicas, y la divulgación del conocimiento permitirá potenciar la adopción de ACB-M en el campo mexicano, contribuir a la sanidad vegetal y seguridad alimentaria de forma sostenible, económicamente viable y biosegura.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) por el financiamiento del proyecto PROFAPI 2020\_0013 “*Bacillus* sp. TSO9: Afiliación taxonómica a nivel del genoma e identificación de genes asociados a la promoción del crecimiento en el trigo”. Además, agradecemos las valiosas sugerencias de Gustavo Mora Aguilera y el panel de revisores anónimos, las cuales enriquecieron el presente manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- Agrawal P, Khate S, Gupta M, Sain N and Mohanty D. 2017. RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W80–W88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx408>
- Aguilar-Marcelino L, Mendoza-de-Gives P, Al-Ani LKT, López-Arellano ME, Gómez-Rodríguez O, Villar-Luna E and Reyes-Guerrero DE. 2020. Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. Pp: 333–349. *In: Sharma V, Salwan R, and Al-Ani LKT (eds). Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture.* <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818469-1.00027-4> 425p.
- Anders S, Pyl PT and Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (Consulta, Mayo, 2020).
- Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS and Mohanty D. 2004. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic acids research* 32(2): W405–W413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh359>
- Antipov D, Korobeynikov A, McLean JS and Pevzner PA. 2016. HYBRIDSPADES: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics* 32(7):1009–1015, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- Arredondo-Bernal HC y Rodríguez-del Bosque LA. 2015. Casos de control biológico en México. Editorial Colegio de Postgraduados. Vol. 2. Texcoco, México. 413 p.
- Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Serna-Domínguez MG, Arredondo-Bernal HC and Montesinos-Matías R. 2015. Characterization of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology* 25(10): 1192–1207. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1041878>



- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formosa K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A and Zagnitko O. 2008. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9(75): 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA and Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology* 19(5): 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Benton HP, Wong DM, Trauger SA and Siuzdak G. 2008. XCMS2: processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization. *Analytical Chemistry* 80(16): 6382-6389. <https://doi.org/10.1021/ac800795f>
- Bernal JS and Quezada JR. 1999. Perspectivas y desafíos para el control biológico en México. *Vedalia* 6: 3-14.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH and Weber T. 2019. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47(1): W81-W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borodovsky M and Lomsadze A. 2011. Eukaryotic gene prediction using GeneMark.hmm-E and GeneMark-ES. *Current protocols in bioinformatics* 35(1): 4.6.1-4.6.10. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0406s35>
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P and Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34: 525-527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Burketova L, Trda L, Ott PG and Valentova O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances* 33(6):994-1004. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carrion G y Desgarenes D. 2012. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 86-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a9.pdf>
- Chaudhuri RR, Loman NJ, Snyder LAS, Bailey CM, Stekel DJ and Pallen MJ. 2008. xBASE2: a comprehensive resource for comparative bacterial genomics. *Nucleic Acids Research* 36(1): D543-D546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm928>
- Darling AC, Mau B, Blattner FR and Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research* 14:1394-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- De León SG y Mier T. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 10(20): 37-63. <https://biblat.unam.mx/hevila/Sociedadesruralesproducciony-medioambiente/2010/vol10/no20/2.pdf>
- De los Santos-Villalobos S, Kremer J M, Parra-Cota, FI, Hayaño-Kanashiro AC, García-Ortega LF, Gunturu SK, Tiedje JM, He SY, Peña-Cabriales JJ. 2018. Draft genome of the fungicidal biological control agent *Burkholderia anthina* strain XXVI. *Archives of Microbiology* 200:803-810. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1490-6>
- De los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B y Estrada-Mora JC. 2018. Colmena: colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(1): 191-202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- De los Santos-Villalobos S, Robles-Montoya RI, Parra-Cota FI, Larsen J, Lozano P and Tiedje JM. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(12): 3939-3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC and Salzberg SL. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 23(6): 673-679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>
- Delgado Ortiz JC, Beltrán Beache M, Cerna Chávez E, Aguirre Uribe LA, Landero Flores J, Rodríguez Pagaza Y y Ochoa Fuentes YM. 2019. *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 22: 1-12. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S and Gingeras TR. 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1): 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Duke KA, Becker MG, Girard LJ, Millar JL, Fernando WGD, Belmonte MF and De Kievit TR. 2017. The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC Genomics* 18: 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3848-6>
- Ehling-Schulzn M, Lereclus D and Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum* 7(3): GPP3-0032. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- Espinosa NA, Saze H and Saijo Y. 2016. Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1201-1201. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01201>
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-5>



- FAO. 2018. El futuro de la alimentación y la agricultura: Vías alternativas hacia el 2050. Versión resumida. Rome. 64 pp. <http://www.fao.org/3/CA1553ES/ca1553es.pdf> (Consulta, Mayo 2020).
- Franco-Navarro F, Cid del Prado-Vera I y Romero-Tejeda, ML. 2013. Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 30(2): 101-114. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n2/v30n2a1.pdf>
- Fukushima A and Kusano M. 2013. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. Frontier in Plant Science 4: 73. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00073>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Allende R, Balderas K, Patiño M, Trejo M, Wong MA, Rayo E, Isauro D and Jurado C. 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. Electronic Journal of Biotechnology 16(3): 5-5. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Balderas-Ruiz KB, Muñoz-Celaya AL, Mezo-Villalobos M y Arroyo-Colín J. 2015. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 18(1): 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.005>
- Gallou A, Serna-Domínguez MG, Berlanga-Padilla AM, Ayala-Zermeño MA, Mellín-Rosas MA, Montesinos-Matías R and Arredondo-Bernal HC. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Dia-phorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. Fungal biology 120(3): 414-423. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.009>
- García-Juárez HS, Ortiz-García CF, Salgado-García S, Valdez-Balero A, Silva-Rojas HV, and Ovalle-Saenz WR. 2016. Immunodetection of the *Leifsonia Xyli* ssp. *xyli* bacteria in commercial clones of *Saccharum* spp. in Tabasco, Mexico. Agro Productividad 9(3): 3-9. [https://www.colpos.mx/wb\\_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD\\_III\\_2016.pdf](https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD_III_2016.pdf)
- García-Nevárez G and Hidalgo-Jamison E. 2019. Efficacy of indigenous and commercial *Simplicillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 237-250. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-4>
- García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR; Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ and González-Esquivel CE. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(1): 58-79. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4>
- Gill HK and Garg H. 2014. Pesticides: environmental impacts and management strategies. In: Larramendy ML and Solonneski S (eds.). Pesticides-toxic aspects. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/57399>
- Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villarnovo GLL and Hernández-Leal TI. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 172-183. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1708-1>
- Granado J, Felix G and Boller T. 1995. Perception of fungal sterols in plants-Subnanomolar concentrations of ergosterol elicits extracellular alkalisation in tomato cells. Plant Physiology 107: 485-490. <https://doi.org/10.1104/pp.107.2.485>
- Guerrero PVM, Blanco PAC, Guigón LC, Tamayo UCJ, Molina CFJ, Berlanga RDI, Carvajal ME and Ávila QGD. 2011. Competencia por nutrientes; modo de acción de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología 29 (2): 90-97. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a1.pdf>
- Gupta R and Bar M. 2020. Plant Immunity, Priming, and Systemic Resistance as Mechanisms for *Trichoderma* spp. Biocontrol. Pp: 81-110. In: Sharma A. and Sharma P. (eds) *Trichoderma*. Rhizosphere Biology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_5)
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N and Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29(8): 1072-1075. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hassan MM, Farid MA and Gaber A. 2019. Rapid identification of *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma longibrachiatum* using sequence-characterized amplified region markers. Egyptian Journal of Biological Pest Control 29 (13): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0113-0>
- Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2017. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017 MEX-INEGI. EEC2.05-ENA-2017. <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/498> (Consulta, Mayo, 2020).
- Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard MW, Leuillet S, Winkler A, Xiao Y, Chaffron S, Vossen JVD, Tang S, Katase M, McClure P, Kimura B, Chai LC, Chapman J and Grant K. 2019. The Use of Next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into practice. Food Microbiology 79: 96-115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
- Jhonson AD, Handsaker RE, Pulit SL, Nizzari MM, O'Donnell CJ and and Bakker PIW. 2008. SNAO: a web based tool for identification and annotation of proxy SNPs using hadmap. Bioinformatics 24(24): 2938-2939. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn564>
- Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R and García-Hernández JL. 2018. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2): 256-275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y and Hattori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the ge-

- nome. *Nucleic Acids Research* 32: 277-280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
- Kang D, Kim J, Choi JN, Liu KH and Lee CH. 2011. Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(1): 5-13. <https://doi.org/10.4014/jmb.1008.08018>
- Keller O, Kollmar M, Stanke M and Waack S. 2011. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 27(6): 757-763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr010>
- Kim D, Perteu G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R and Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcripts in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14(4):1-13. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontier in Plant Science* 10: 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH and Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 27: 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kuč J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32(11): 854-860. <https://doi.org/10.2307/1309008>
- Lagunes-Castro MS, López Monteón A, Ramos Ligonio A, Trigos A, Salinas A y Espinoza C. 2015. Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 87-94. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00087.pdf>
- Lamdan NL, Shalaby S, Ziv T, Kenerley CM and Horwitz BA. 2015. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular Cell Proteomics* 14(4): 1054-1063. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046607>
- Langmead B and Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359. <https://www.nature.com/articles/nmeth.1923>
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS and Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Li B and Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMCBioinformatics* 12: 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li H and Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li H. 2011. Improving SNP discovery by base alignment quality. *Bioinformatics* 27(8): 1157-1158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr076>
- Li R, Yu C, Li Y, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K and Wang J. 2009. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 25(15): 1966-1967. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp336>
- Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z and Wan GL. 2013. Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* 6(3): 605-620. <https://doi.org/10.1093/mp/sst015>
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Wang L and Shao Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* 5: 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Lloyd N, Johnson DL and Herderich MJ. 2015. Metabolomics approaches for resolving and harnessing chemical diversity in grapes, yeast and wine. *Australian Journal of Grape Wine Research* 21(S1): 723-740. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12202>
- Love MI, Huber W and Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lozano-Alejo N, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta-Mejía E, Aguilar-Rincón VH y Ayala-Escobar V. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de la Marchitez del chile de árbol (*Capsicum annum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 31-53. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00031.pdf>
- Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu SM, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam TW and Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short read de novo assembler. *Gigascience* 1(1): 18. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>
- Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagonista sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 11-30. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a2.pdf>
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17(1): 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E and Flors V. 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 68: 485-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Mazrou YSA, Makhlof AH, Elseehy MM, Awad MF and Hassan MM. 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(4): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0207-8>
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP and Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14(60): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristobal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC y Pacheco-Aguilar JR.

2016. *Bacillus* spp. in the control of wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1>
- Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Labuschagne N and Dubery IA. 2018. The Chemistry of Plant-Microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers in Plant Science* 9: 112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT and Thomas PD. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* 8: 1551-1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092>
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Díaz-Castro A, Martínez-Rojero RD, Ariza-Flores R y Barrios-Ayala A. 2013. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del mango, con *Trichoderma* spp., en condiciones de campo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 1-12. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a1.pdf>
- Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, López R, McAnulla C, McMenamin C, Nuka G, Pesseat S, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Rato C, Yong SY, Bateman A, Punta M, Attwood TK, Sigrist CJA, Redaschi N, Rivoire C, Xenarios I, Kahn D, Guyot D, Bork P, Letunic I, Gough J, Oates M, Haft D, Huang H, Natale DA, Wu CH, Orengo C, Sillitoe I, Mi H, Thomas PD and Finn R. 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research* 43(D1): 1-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1243>
- Moriuchi R, Dohra H, Kanesaki Y and Ogawa N. 2019. Complete Genome Sequence of Bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and Reclassification of the Strains of the Genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* Based on Phylogenetic and Whole-Genome Sequence Analyses. *Frontiers in Microbiology* 10: 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00133>
- Mousa WK and Raizada MN. 2016. Natural disease control in cereal grains. Pp:1-7. In: reference module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00206-7>
- Naz S. 2014. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* 6(12): 1657-1677. <https://doi.org/10.4155/BIO.14.119>
- Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solis J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR, López-Alcocer E and Olalde-Portugal V. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 146-159. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-2>
- ONU. 2018. La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe (LC/G.2681-P/Rev.3), Santiago. [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/40155/24/S1801141\\_es.pdf](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/40155/24/S1801141_es.pdf) (Consulta, Junio 2020).
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P and Tyson GW. 2015 CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* 25: 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, Chin FYL and IDBA-UD. 2012. a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28(11): 1420-1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Pérez-Moreno L, Belmonte-Vargas JR, Núñez-Palenius HG, Guzmán-Mendoza R y Mendoza-Celedón B. 2015. Sensibilidad de 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.pdf>
- Pérez-Rojas F, León-Quipe J y Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos Aislados del Compost y su Actividad Antagonista a Fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 116-139. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00116-en.pdf>
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G and Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Natural Methods* 8: 785-786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pott DM, Osorio S and Vallarino JG. 2019. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in Plant Science* 10: 835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>
- Potter SC, Aurélien Luciani, Sean R Eddy, Youngmi Park, Rodrigo Lopez and Robert D Finn. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W200-W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>
- Quinlan A and Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformática* 26(6): 841-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80(3): 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramautar R, Somsen GW and de Jong GJ. 2016. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2014-2016. *Electrophoresis* 38(1): 1-13. <https://doi.org/10.1002/elps.201600370>
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F and Peplies J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32(6): 929-931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E and Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84-99. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rodríguez-Millán KA, Monreal Vargas CT, Huerta Díaz J, Soria Colunga JC y Jarquín Gálvez R. 2013. Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea* var



- capitata*) y su efecto en el pH. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1):29-44. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a4.pdf>
- Rodríguez-Romero VM, Villanueva-Arce R, Trejo-Raya AB and Bautista-Baños S. 2019. Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 202-219. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1812-2>
- Rollano-Peñaloza OM y Mollinedo-Portugal P. 2017. Análisis bioinformático de Arn-Seq con una perspectiva para Bolivia. *Revista Boliviana de Química* 4(2): 50-55. [http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v34n2/v34n2\\_a02.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v34n2/v34n2_a02.pdf)
- Roser M. 2019. Pesticides. University of Oxford. <https://ourworldindata.org/pesticides> (Consulta, Mayo de 2020).
- Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Pérez-Corral DA, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA and Fernández-Pavía SP. 2018. Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 444-456. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1804-5>
- Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Samaniego-Gaxiola JA, Pedroza-Sandoval A, Chew-Madineitia Y and Gaytán-Mascorro A. 2019. Reductive disinfestation, soil desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 287-303. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-7>
- Serret-López M, Aranda-Ocampo S, Espinosa-Victoria D, Ortiz-Martínez LE and Ramírez-Razo K. 2021. Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(1): 1-20. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-2>
- Schmieder R and Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6): 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schwamborn K. 2012. Imaging mass spectrometry in biomarker discovery and validation. *Journal of Proteomics* 75(16): 4990-4998. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.015>
- Sentausa E and Fournier PE. 2013. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19(9): 790-795. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12181>
- Serrano-Carreón L, Balderas K, Wong MA, Rosas DR y Galindo-Fentanes EG. 2010. Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: Logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias* 208: 28-37. <https://info.aserca.gob.mx/claridades/revistas/208/ca208-28.pdf>
- Shen Z, Ruan Y and Chao X. 2015. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression. *Biology and Fertility Soils* 51: 553-562. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1002-7>
- Skinnider MA, Merwin NJ, Johnston CW and Magarvey NA. 2017. PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W49-W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx320>
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W and Su Z. 2017. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research* 45(W1): W122-W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- Tlalpal-Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI y Rubio Cortes R. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(1): 62-74. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a6.pdf>
- Trapnell C, Pachter L and Salzberg SL. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9): 1105-1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>
- Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L y Hernández-Cuevas LV. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(2): 151-169. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-5>
- Uc-Arguelles AK, Perez-Moreno J, Ayala-Escobar V y Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(2):263-283. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-6>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G Arellano-Wattenbarger GL and de los Santos-Villalobos S. 2019. Plant-assisted selection: a promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant Soil* 435: 367-384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>
- Valenzuela-Ruiz V, Gálvez-Gamboa GT, Villa-Rodríguez ED, Parra-Cota FI, Santoyo G and de los Santos-Villalobos S. 2020. Lipopeptides produced by biological control agents of the genus *Bacillus*: a review of analytical tools used for their study. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(2): 419-432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>
- Valenzuela-Ruiz V, Robles-Montoya R, Parra-Cota FI, Santoyo G, Orozco-Mosqueda, Ma. Del Carmen, Rodríguez-Ramírez R and de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9:436. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>
- Van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J and Kuipers OP. 2018. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W278-W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

- Varghese NJ, Mukherjee S, Ivanova N, Konstantinidis KT, Mavrommatis K, Kyrpides NC and Pati A. 2015. Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research* 43(14): 6761–6771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv657>
- Vatsa P, Chiltz A, Luini E, Vandelle E, Pugin A and Roblin G. 2011. Cytosolic calcium rises and related events in ergosterol-treated Nicotiana cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(7): 764-773. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.002>
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota F, Castro-Longoria E, López-Cervantes J and de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological control* 132: 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI and De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(1): 95-130.
- Vinale F, Manganiello G, Nigro M, Mazzei P, Piccolo A, Pascale A, Ruocco M, Marra R, Lombardi N, Lanzuise S, Varlese R, Cavallo P, Lorito M and Woo SL. 2014. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules* 19(7): 9760-9772. <https://doi.org/10.3390/molecules19079760>
- Weber T, Rausch C, Lopez P, Hoof I, Gaykova V, Huson DH and Wohlleben W. 2009. CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Journal of Biotechnology* 140(1-2): 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.01.007>
- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Lanzuise S, Manganiello G and Lorito M. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycology Journal* 8: 71–126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Worley B and Powers R. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics* 1(1):92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Wu TD and Nacu S. 2010. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26(7): 873-881. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq057>
- Xi W, Gao Y, Cheng Z, Chen C, Han M, Yang P, Xiong G and Ning K. 2019. Using QC-Blind for Quality Control and Contamination Screening of Bacteria DNA Sequencing Data Without Reference Genome. *Frontiers in Microbiology* 10: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01560>
- Xu Y, Chen H, Zhong X and Cai X. 2012. Induction of hypersensitive response and nonhost resistance by a *Cladosporium fulvum* elicitor CfHNNII is dose-dependent and negatively regulated by salicylic acid. *Journal of Integrative Agriculture* 11(10): 1665–1674. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60169-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60169-5)
- Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S and Chun J. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>
- Zerbino DR and Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
- Zhang W, Fraiture M, Kolb D, Löffelhardt B, Desaki Y and Boutrot FF. 2013. *Arabidopsis* receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVER-SHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *Plant Cell* 25(10): 4227–4241. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117010>



# Population dynamics of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* under greenhouse conditions

## Dinámica poblacional del nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* bajo condiciones de invernadero

Ilia Mariana Escobar-Ávila, Alejandro Tovar-Soto\*, Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Santo Tomás, Alcaldía Miguel Hidalgo, CP 11340, CDMX, México. \*Corresponding author: alejandrotovars@hotmail.com

Recibido: 10 de Julio, 2020.

Aceptado: 17 de Septiembre, 2020.

Escobar-Ávila IM and Tovar-Soto A. 2021. Population dynamics of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* under greenhouse conditions. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 185-197.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-1>

Primera publicación en línea: 28 de Septiembre, 2020.

First publication on line: September 28, 2020.

**Abstract.** The carrot cyst nematode *Heterodera carotae* is an important pest of *Daucus carota* crops. For control measures to be effective, knowledge about nematode population dynamics over time is essential. This study evaluated the population dynamics of *H. carotae* in carrot over a ten-month cultivation period under greenhouse conditions. In June 2017, 90 pots (3 L volume) were placed in the greenhouse: 60 were filled with nematode naturally infested soil (1200 J2/pot) and the remaining 30 were controls (without the nematode). Ten seeds of carrot were sown into each pot. After germination,

**Resumen.** El nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* es un patógeno importante en *Daucus carota*. Para que las medidas de control sean efectivas, el conocimiento de la dinámica poblacional del nematodo a través del tiempo es indispensable. El presente trabajo, evaluó la dinámica poblacional de *H. carotae* en cultivo de zanahoria, durante 10 meses bajo condiciones de invernadero. En junio del 2017, se colocaron en invernadero 90 macetas (3 L volumen): 60 fueron llenadas con suelo naturalmente infestado con el nematodo (1200 J2/maceta) y las 30 restantes se utilizaron como controles (sin nematodos). En cada maceta, se sembraron 10 semillas de zanahoria. Después de la germinación, las macetas fueron muestreadas destructivamente cada 15 y 30 días (n=3). Las raíces de cada maceta fueron pesadas y posteriormente teñidas. Los quistes y J2 se extrajeron del suelo. Las poblaciones de J2 tanto en suelo como raíz, se comportaron de manera similar. En suelo, se observaron tres picos de J2 a los 105, 150 y 195 días con 735, 882 y 967 J2/200 cm<sup>3</sup> de suelo respectivamente.

pots were destructively sampled every 15 and 30 days (n=3). Roots from each pot were weighed and stained. J2s and cysts were extracted from soil. J2 populations in soil and roots behaved similarly. In soil, three J2 peaks were observed after 105, 150 and 195 days with 735, 882 and 967 J2/200 cm<sup>3</sup> of soil, respectively. A multiplication factor of 1.6 was calculated and five generations of the nematode were observed. *H. carotae* caused an average 70.8% yield loss during the experiment. The results can be used in the development of decision-making tools to optimize the implementation of management measures.

**Key words:** cyst-forming nematode, *Daucus carota*, multiplication factor, life cycle, generations, endo-radicular stages.

Carrot (*Daucus carota*) is a root vegetable that is grown worldwide and used for human consumption in salads, juices, stews and as a garnish. In Mexico, 353,750 t were produced in 2019 with a value of 54,738,948 US dollars. In 2018, Mexico was the 24<sup>th</sup> largest producer of carrots worldwide (FAO, 2020; SIAP, 2020). As with all crops, carrot is affected by a large number of pathogens e.g., bacteria, fungi, viruses, phytoplasmas and nematodes (Davis and Nuñez, 2007; Seo *et al.*, 2015; Groves *et al.*, 2020). The carrot cyst nematode, *Heterodera carotae* Jones (1950a), is a cyst-forming nematode (CFN) that is distributed throughout the carrot-growing areas of Europe, North America and South Africa (Subbotin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018; Handoo and Subbotin, 2018). This CFN has a limited host range: wild and cultivated carrots and a number of wild members of Apiaceae Family, such as *Torilis* spp. (Jones, 1950b; Greco, 1986; Mugniery and Bossis, 1988). This nematode completes its life cycle in 36 days

Se calculó un factor de reproducción de 1.6 y se observaron cinco generaciones del nematodo. *H. carotae* causó una pérdida promedio en rendimiento de 70.8% durante el experimento. Los resultados pueden ser usados para desarrollar herramientas en la toma de decisiones para optimizar el momento de implementación de medidas de manejo.

**Palabras clave:** Nematodo formador de quistes, *Daucus carota*, factor de reproducción, ciclo de vida, generaciones, estadios endo-radicales.

La zanahoria (*Daucus carota*) es una raíz que se cultiva en todo el mundo y se utiliza para consumo humano en ensaladas, jugos, guisos y como guarnición. En 2019, en México se produjeron 353,750 t valuadas en 54,738,948 dólares. En 2018, México ocupó el lugar 24 entre los más grandes productores de zanahoria a nivel mundial (FAO, 2020; SIAP, 2020). Como ocurre con todos los cultivos, la zanahoria es afectada por un gran número de patógenos, donde destacan, bacterias, hongos, virus, fitoplasmas y nematodos (Davis y Nuñez, 2007; Seo *et al.*, 2015; Groves *et al.*, 2020). El nematodo del quiste de la zanahoria (NQZ), *Heterodera carotae* Jones (1950a), es un patógeno que se encuentra distribuido en las zonas productoras de zanahoria en Europa, Norteamérica y África del Sur (Subbotin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018; Handoo y Subbotin, 2018). Este NFQ tiene un rango limitado de hospedantes: zanahorias silvestres y cultivadas, y algunos miembros silvestres de la familia Apiaceae, como *Torilis* spp. (Jones, 1950b; Greco, 1986; Mugniery y Bossis, 1988). Este nematodo completó su ciclo de vida en 36 días a 20 °C y, en un estudio de campo en Italia, tuvo cuatro generaciones por año y causó pérdidas de rendimiento de hasta 20% en cultivos de zanahoria (Greco, 1986; Greco y Brandonisio, 1986).

at 20 °C and, in an Italian field study, had four generations per year and caused up to 20% yield losses in carrot crops (Greco, 1986; Greco and Brandonisio, 1986). Recently, *H. carotae* was found to be widely distributed in several municipalities of the Tepeaca Valley, Puebla, Mexico, where its life cycle was completed in 73 days at 20-25 °C (Escobar-Avila *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018). The difference in duration of the life cycle between European and Mexican populations of *H. carotae* has led us to believe that the number of generations per year and the population dynamics will also be different. Understanding population dynamics is key to design management strategies. The objectives of the present study were: i) to determine the population dynamics of one population of *H. carotae* in soil and in carrot roots over a ten-month cultivation period under greenhouse conditions; ii) to determine the number of generations of the nematode and its population multiplication capacity; and iii) to determine carrot yield losses at the nematode population densities evaluated.

In June 2017, 90 pots (3 L volume) were placed under greenhouse conditions at 13-20 °C (greenhouse temperature). Sixty of these pots each contained 3 kg of naturally nematode-infested soil and ten carrot seeds (cv. Christian). The naturally nematode-infested soil came from an infested field from Santa Maria Actipan, Acatzingo, Puebla, Mexico (18° 58' 486'' N; 97° 50' 295'' W; 2246 masl). The soil was thoroughly homogenized and then second-stage juveniles were extracted using the centrifugal flotation technique (Jenkins, 1964) to determine average initial inoculum of *H. carotae* which was 1200 second stage juveniles (J2) per pot. The thirty remaining pots were controls; each contained 3 kg of the same soil, except that it had been tinalized, and 10 carrot seeds (cv. Christian) placed. The experiment was set up in a completely

Recientemente, se encontró que *H. carotae* está ampliamente distribuido en varios municipios del Valle de Tepeaca, Puebla, México, donde completa su ciclo de vida en 73 días a 20-25 °C (Escobar-Avila *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018). La diferencia en la duración del ciclo de vida entre las poblaciones europeas y mexicanas de *H. carotae* nos lleva a creer que el número de generaciones por año y la dinámica poblacional también son diferentes. Entender la dinámica poblacional es determinante para diseñar estrategias de manejo. Los objetivos del presente estudio fueron: i) determinar la dinámica poblacional de una población de *H. carotae* en suelo y en raíces de zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero; ii) determinar el número de generaciones del nematodo y la capacidad de reproducción de la población; y iii) determinar las pérdidas en el rendimiento del cultivo de zanahoria a las densidades poblacionales del nematodo que fueron evaluadas.

En junio de 2017, se colocaron en invernadero 90 macetas (3 L volumen) a 13-20 °C (temperatura en el invernadero). Sesenta de las macetas contenían suelo naturalmente infestado con el nematodo y 10 semillas de zanahoria (cv. Christian). El suelo naturalmente infestado con el nematodo fue recolectado en un campo infestado en Santa Maria Actipan, Acatzingo, Puebla, México (18° 58' 486'' N; 97° 50' 295'' O; 2246 msnm). El suelo fue completamente homogeneizado y después se extrajeron los juveniles de segundo estadio utilizando la técnica de tamizado-centrifugado y flotación (Jenkins, 1964), a fin de determinar el promedio por maceta del inóculo inicial de *H. carotae*, que fue de 1200 juveniles de segundo estadio (J2). Las otras 30 macetas se utilizaron como controles; cada maceta con 3 kg del mismo suelo, salvo que éste fue tinalizado, en donde se colocaron 10 semillas de zanahoria (cv. Christian). El experimento fue establecido en

randomized design. All pots were maintained in the greenhouse over a 10-month period (June 2017 - April 2018) and were watered every 3 days with 20 mL of tap water. Immediately after the seeds had germinated, pots were destructively sampled to determine nematode population densities; three treatment pots were evaluated every 15 days and three control pots were evaluated every 30 days. The roots and soil were evaluated separately from each pot. To determine the fresh weight of carrot roots, these were gently shaken, washed and then foliage was removed. From each pot, the roots of each plant were individually weighed and then a mean per pot was determined. As control pots were only evaluated monthly, only data from treatment pots sampled at the same time as control pots were used in statistical analysis of fresh weight. A t-test was performed to identify any significant differences between the weight of the roots when nematodes were present or absent ( $p < 0.05$ ). Analysis was done using the SygmaPlot 12.0 program. Carrot yield loss was calculated as the percentage loss between the root weight of control pots and infested pots. After weighing, all of the roots from each pot were carefully washed with tap water and then stained using acid fuchsin lactoglycerol to observe and count nematode stages inside and on the surface of roots (J2, J3, J4, females and cysts) (Byrd *et al.*, 1983). All nematode stages were recorded and a mean nematode density per stage and date was calculated. The total mean nematode density was taken as the 100 per cent for each date. On the other hand, the soil from each pot was thoroughly homogenized and then J2s and cysts were extracted from 200 cm<sup>3</sup> of soil using the centrifugal flotation technique (Jenkins, 1964) and Fenwick's method (Fenwick, 1940), respectively. The mean number of cysts were used to calculate the population multiplication factor by dividing the final population (Pf) density from each date

un diseño completamente al azar. Todas las macetas se mantuvieron en el invernadero por un periodo de 10 meses (junio 2017-abril 2018) y se regaron cada 3 días con 20 mL de agua del grifo. Después de que las semillas germinaron, las macetas fueron muestreadas destructivamente para determinar las densidades poblacionales del nematodo; se evaluaron tres macetas (con nematodo) cada 15 días y tres macetas control (sin nematodo) cada 30 días. Las raíces y el suelo de cada maceta fueron evaluados por separado. Para determinar el peso fresco de las raíces de zanahoria, éstas se agitaron ligeramente, se lavaron y después se eliminó el follaje. De cada maceta, las raíces de cada planta fueron pesadas de manera individual y posteriormente se determinó la media por maceta. Dado que las macetas control se evaluaron mensualmente, solo los datos de las macetas con suelo infestado muestreadas al mismo tiempo que las macetas control fueron utilizados para el análisis estadístico del peso fresco. Se realizó una prueba t para identificar diferencias significativas entre el peso de las raíces cuando había nematodos presentes o ausentes ( $p < 0.05$ ). El análisis se realizó con el programa SygmaPlot 12.0. La pérdida de rendimiento de zanahoria se calculó como el porcentaje de pérdida entre el peso de la raíz de las macetas control y las macetas con suelo infestado. Después de pesarlas, todas las raíces de cada maceta fueron cuidadosamente lavadas con agua del grifo y luego teñidas con fucsina ácidolactoglicerol para observar y contar los estadios del nematodo en el interior y en la superficie de las raíces (J2, J3, J4, hembras y quistes) (Byrd *et al.*, 1983). Se registraron todos los estadios del nematodo y se calculó la densidad promedio del nematodo por etapa y fecha. La densidad total promedio del nematodo se tomó como el 100 por ciento de cada fecha. Por otro lado, el suelo de cada maceta se homogeneizó completamente y, a continuación, se extrajeron los J2 y quistes de 200 cm<sup>3</sup> de suelo

by the initial population ( $P_i$ ) density. The value of  $P_i$  was taken from the immediate previous date of sampling.

Overall, the fresh weight of carrot roots was significantly smaller in the nematode treatment pots than in the control pots ( $p < 0.05$ ) (Table 1). From the beginning of the experiment and up to 60 days post germination (DPG), the fresh root weight was not significantly different between the treatment and control pots ( $p > 0.05$ ). However, from 90 DPG, there was a significant difference in the root fresh weight between treatment and control pots on every sampling time. At the end of the experiment (300 DPG), an average 70.8% yield loss was observed. Inside carrot roots, J2 were observed at 15 DPG, but as DPG increased the number of J3, then J4 and female stages increased in number (Figure 1). By 75 DPG, all nematode stages were present in various proportions, but cysts were the predominant stage (Figure 1). Five generations of the nematode were

utilizando la técnica de tamizado-centrifugado y flotación (Jenkins, 1964) y el método de Fenwick (Fenwick, 1940), respectivamente. El número promedio de quistes se utilizó para calcular el factor de reproducción de la población dividiendo la densidad de población final ( $P_f$ ) de cada fecha por la densidad de la población inicial ( $P_i$ ). El valor de  $P_i$  se tomó de la fecha anterior inmediata de muestreo.

En general, el peso fresco de las raíces de zanahoria fue significativamente menor en las macetas con nematodos que en las macetas control ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 1). Desde que comenzó el experimento y hasta 60 días post-germinación (DPG), el peso fresco de la raíz no fue significativamente diferente entre las macetas con nematodo y control ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, a partir de los 90 DPG, se observó una diferencia significativa en el peso fresco de la raíz entre las macetas con nematodo y las macetas control cada vez que se muestrearon. Al final del experimento (300 DPG), se observó un promedio

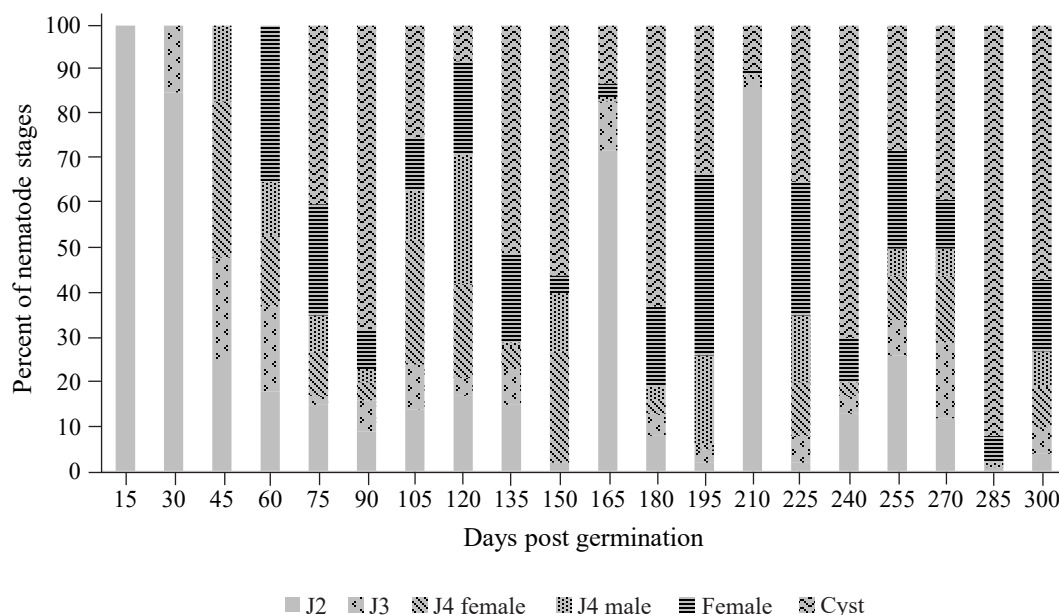
**Table 1. Fresh root weight of *Heterodera carotae* infested and control carrots over a ten-month culture period under greenhouse conditions.**

**Cuadro 1. Peso fresco de la raíz de zanahoria control e infestada con *Heterodera carotae* en un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero.**

| DPG | Fresh carrot root weight (g) |                                 | P       | Yield loss (%) |
|-----|------------------------------|---------------------------------|---------|----------------|
|     | Control                      | Infested with <i>H. carotae</i> |         |                |
| 30  | 0.006 ± 0.0008               | 0.005 ± 0.00008                 | 0.751   | 16.7           |
| 60  | 0.019 ± 0.0033               | 0.018 ± 0.0087                  | 0.849   | 5.3            |
| 90  | 0.066 ± 0.003                | 0.039 ± 0.0126                  | 0.023*  | 40.9           |
| 120 | 3.547 ± 1.5                  | 0.242 ± 0.11                    | 0.019** | 93.2           |
| 150 | 7.039 ± 0.985                | 1.519 ± 1.06                    | 0.003** | 78.4           |
| 180 | 8.402 ± 2.559                | 0.528 ± 0.0599                  | 0.006** | 93.7           |
| 210 | 9.963 ± 3.619                | 1.745 ± 0.223                   | 0.017** | 82.5           |
| 240 | 10.192 ± 3.467               | 1.406 ± 0.352                   | 0.012** | 86.2           |
| 270 | 13.712 ± 4.255               | 1.659 ± 0.297                   | 0.008** | 87.9           |
| 300 | 16.599 ± 5.379               | 3.168 ± 0.367                   | 0.012** | 80.9           |

Each value is the mean of three replicates ± standard deviation. Significant differences were determined using a t-test. \* = significant ( $p \leq 0.05$ ); \*\* = highly significant ( $p \leq 0.01$ ). Average yield loss = 70.8%. DPG = days post germination. / Cada uno de los valores es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Las diferencias significativas se determinaron mediante una prueba t. \* = significativo ( $p \leq 0.05$ ); \*\* = altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ). Pérdida de rendimiento promedio = 70.8%. DPG = días post-germinación.





**Figure 1. Stages of the cyst nematode *Heterodera carotae* present within roots of carrots over a ten-month culture period under greenhouse conditions. The total mean nematode density from the three replicates was taken as the 100 per cent for each date.**

**Figura 1. Estadios del nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* presentes dentro de las raíces de zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero. La densidad media total del nematodo de las tres repeticiones se consideró como el 100% de cada fecha.**

completed during the entire experimental period; peaks of females were observed at 60, 105, 195, 225 and 255 DPG with means of 172, 224, 228, 264 and 235 females, respectively (Figure 2A). As for nematode population in soil, three maximum peaks in J2 populations were observed at 105, 150 and 195 DPG with a mean of 735, 882 and 967 J2/200 cm<sup>3</sup> of soil respectively. A similar trend in J2 populations was observed inside carrot roots (Figure 2B). The multiplication factor calculated from cysts was inversely related to the initial population densities and varied between 230 and 558 cysts/200 cm<sup>3</sup> of soil (Figure 2C). At low nematode Pi densities, the multiplication factor was the greatest. In contrast, when nematode Pi densities were at their highest, the multiplication factor was at its smallest (Figure 2C). A multiplication factor of 1.6 was calculated at the end of the experiment.

de pérdida de rendimiento de 70.8%. En el interior de las raíces de zanahoria se observaron J2 a los 15 DPG, pero a medida que los DPG aumentaron, el número de J3, J4 y de hembras aumentó también (Figura 1). A los 75 DPG, se presentaron todos los estadios en varias proporciones, pero los quistes fueron el estadio predominante (Figura 1). A lo largo de todo el periodo que duró el experimento, se completaron cinco generaciones del nematodo; los mayores picos (números) de hembras se observaron a los 60, 105, 195, 225 y 255 DPG con medias de 172, 224, 228, 264 y 235 hembras, respectivamente (Figura 2A). En cuanto a la población del nematodo en el suelo, se observaron tres picos máximos en las poblaciones de J2 a los 105, 150 y 195 DPG con una media de 735, 882 y 967 J2/200 cm<sup>3</sup> de suelo, respectivamente. Se observó una tendencia similar en las poblaciones J2 en el interior de las raíces de

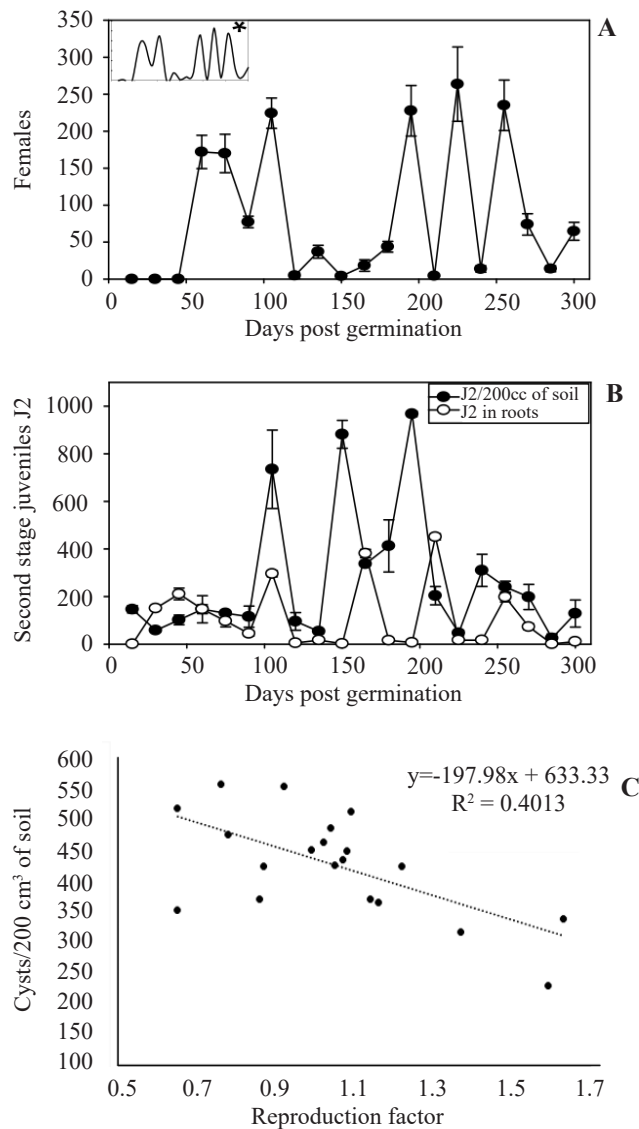


Figure 2. Population dynamics and multiplication factor of *Heterodera carotae* in soil and roots of carrot cv. Christian over a ten-month culture period under greenhouse conditions. A) Population dynamics of *Heterodera carotae* females in carrot roots. Average number of females from three replicates; \* = Simple spline curve representation. B) Population dynamics of second stage juveniles (J2) of *H. carotae* in soil and carrot roots. Average number of J2 from the three replicates. C) Relationship between *H. carotae* multiplication factor and initial population densities on carrot.

Figura 2. Dinámica poblacional y factor de reproducción de *Heterodera carotae* en suelo y raíces de zanahoria cv. Christian durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero. A) Dinámica poblacional de hembras de *Heterodera carotae* en raíces de zanahoria. Número promedio de hembras de tres repeticiones; \* = Representación simple de una curva spline. B) Dinámica poblacional de juveniles de segundo estadio (J2) de *H. carotae* en suelo y raíces de zanahoria. Número promedio de J2 de las tres repeticiones. C) Relación entre el factor de reproducción de *H. carotae* y las densidades poblacionales iniciales en zanahoria.

In this study, the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* caused an average 70.8% yield loss in carrot over a ten-month culture period from June 2017 to April 2018 under greenhouse conditions. This is much higher than those previously reported by Greco *et al.* (1993), which was a maximum of 20% under Italian conditions. Ambrogioni and Marinari-Palmisano (1976) determined a tolerance limit, i.e. the maximum nematode density at which no yield

zanahoria (Figura 2B). El factor de reproducción calculado de los quistes, se relacionó de manera inversa con las densidades poblacionales iniciales y variaron entre 230 y 558 quistes/200 cm<sup>3</sup> de suelo (Figura 2C). Cuando las densidades de la Pi del nematodo estaban a su nivel mínimo, el factor de reproducción estaba a su nivel máximo. En cambio, cuando las densidades de Pi del nematodo estaban a su máximo, el factor de reproducción estaba a su

losses occur (Seinhorst, 1986; Schomaker and Been, 2006), of 0.19 eggs/cm<sup>3</sup> of soil in a field trial, while Greco and Brandonisio (1980) determined a tolerance limit of 0.8 eggs/cm<sup>3</sup> of soil in a microplot experiment. In the latter study, yield losses of 40 and 70% occurred at densities of 16 and 32 eggs/cm<sup>3</sup> of soil, respectively (Greco and Brandonisio, 1980). In our study, the initial nematode density was 1200 J2/three kg of soil, which is equivalent to 0.4 J2 per g of soil. It is difficult to compare our results with previous work because the initial nematode inoculum concentrations were not the same. However, the initial nematode density in our study was lower than the one reported by Greco and Brandonisio (1980) and yet still caused a yield loss of 70%. In addition, the inoculum concentration used in our study was, theoretically, within the tolerance limit, and so no yield losses should have been observed (Greco and Brandonisio, 1980). The difference in our results and previous reports may be due to a number of factors. Firstly, the plant varieties used in the experiments were different and it is known that some varieties of carrots are more susceptible to nematodes than others (Barrot, 2018). It is possible that carrot cv. Christian is more susceptible than cv. Vilmorin 66, which Greco and Brandonisio (1980) used. Secondly, temperature and type of soil play an important role in emergence and development of *H. carotae* (Greco and Brandonisio, 1986). The optimum temperature for emergence of *H. carotae* J2 is between 15 and 20 °C, although they can invade plants and develop at 10 °C (Greco and Brandonisio, 1986; Greco, 1987). Our study was conducted at 13-20 °C, therefore there were no temperature restrictions on emergence and development. Thirdly, the specific Mexican population (Santa Maria Actipan) of *H. carotae* used in this experiment could be more virulent than the European population. Further studies on virulence of the Mexican population

nivel mínimo (Figura 2C). Al final del experimento se calculó un factor de reproducción de 1.6.

En este estudio, el nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* causó pérdidas de rendimiento promedio de 70.8% en la zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses, de junio de 2017 a abril de 2018, bajo condiciones de invernadero. Este porcentaje es mucho más alto que los porcentajes anteriormente reportados por Greco *et al.* (1993), que llegaron a un máximo de 20% en condiciones de campo en Italia. Ambrogioni y Marinari-Palmisano (1976) determinaron un límite de tolerancia, es decir, la densidad máxima del nematodo a la cual no se producen pérdidas de rendimiento (Seinhorst, 1986; Schomaker y Been, 2006), de 0.19 huevos/cm<sup>3</sup> de suelo en un ensayo en campo, mientras que Greco y Brandonisio (1980) determinaron un límite de tolerancia de 0.8 huevos/cm<sup>3</sup> de suelo en un experimento a nivel de microparcela. En este último estudio, se produjeron pérdidas de rendimiento de 40 y 70% a densidades de 16 y 32 huevos/cm<sup>3</sup> de suelo, respectivamente (Greco y Brandonisio, 1980). En nuestro estudio, la densidad inicial del nematodo fue de 1200 J2/tres kg de suelo, que equivale a 0.4 J2 por g de suelo. Es difícil comparar estos resultados con trabajos anteriores porque las concentraciones iniciales de inóculo del nematodo no fueron iguales. Sin embargo, la densidad inicial del nematodo en este estudio fue menor que la que reportaron Greco y Brandonisio (1980), y aun así causó una pérdida de rendimiento de 70%. Además, la concentración de inóculo utilizada en nuestro estudio estuvo, teóricamente, dentro del límite de tolerancia, y, por tanto, no debió haber producido pérdidas de rendimiento (Greco y Brandonisio, 1980). La diferencia entre estos resultados y los reportes anteriores puede deberse a diversos factores. En primer lugar, las variedades vegetales que se usaron en el experimento fueron diferentes, y se sabe que algunas variedades de

are needed. Inside carrot roots, J2, J3, J4, females and cysts were observed after 15, 30, 45, 60 and 75 DPG, respectively at 13-20 °C. These results agree with those obtained by Escobar-Avila *et al.* (2017) who evaluated the same population in carrot cv. Mexicana and observed J2, J3, J4, females and cysts after 10, 24, 38, 59 and 73 DPG, respectively, under greenhouse conditions at 20-25 °C. In contrast, in Italy the life cycle of this nematode species was completed within 36 days at 20 °C in carrot cv. Selection 92 (Greco and Brandonisio, 1986). According to Greco and Brandonisio (1986) the temperature range for development of *H. carotae* is 10-20 °C and that above 25 °C nematode development stops. Therefore, in the months when the average temperatures are high, the life cycle may be longer (Greco, 1987; Mugniery and Bossis, 1988). However, this was not a factor in our study in which the temperature was maintained between 13 and 20 °C. Factors that might influence the duration of the life cycle (twice as long for the Mexican population compared with the Italian population) is the carrot variety used and the particular characteristics of the Mexican nematode population evaluated. *Heterodera carotae* has an interesting biology. Approximately half of the eggs are retained within the cyst, while the other half are laid in a gelatinous matrix secreted by the anal glands of the female (termed egg masses). Under suitable conditions, eggs in the egg masses hatch as soon as embryogenic development is completed. In contrast, hatching of eggs within the cysts is delayed; these eggs usually require a two-month period and the presence of host plant root exudates before they hatch. Therefore, *H. carotae* is capable of hatching all year round (Winslow, 1955; Aubert, 1986; Greco and Brandonisio, 1986; Greco, 1987; Baldwin and Mundo-Ocampo, 1991). This is unlike other species of cyst nematode that only complete one generation per year and require a dormancy

zanahoria son más susceptibles que otras a los nematodos (Barrot, 2018). Es posible que la cv. Christian sea más susceptible que la cv. Vilmorin 66 que utilizaron Greco y Brandonisio (1980). En segundo lugar, la temperatura y el tipo de suelo tienen un papel muy importante en la emergencia y el desarrollo de *H. carotae* (Greco y Brandonisio, 1986). La temperatura óptima para la emergencia de J2 de *H. carotae* es de entre 15 y 20 °C, aunque pueden invadir plantas y desarrollarse a 10 °C (Greco y Brandonisio, 1986; Greco, 1987). Nuestro estudio fue realizado a 13-20 °C, y, por tanto, no hubo restricciones de temperatura durante la emergencia y el desarrollo. En tercer lugar, es posible que la población mexicana (Santa María Actopan) de *H. carotae* utilizada en este experimento, pueda ser más virulenta que la población europea. Es necesario realizar más estudios sobre la virulencia de la población mexicana. En el interior de las raíces de zanahoria, se observaron J2, J3, J4, hembras y quistes a los 15, 30, 45, 60 y 75 DPG, respectivamente, a 13-20 °C. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Escobar-Avila *et al.* (2017), quienes evaluaron la misma población en la cv. Mexicana y observaron J2, J3, J4, hembras y quistes a los 10, 24, 38, 59 y 73 DPG, respectivamente, bajo condiciones de invernadero a 20-25 °C. Por el contrario, en Italia, el ciclo de vida de esta especie de nematodo se completó en 36 días a 20 °C en la cv. Selection 92 (Greco y Brandonisio, 1986). Según Greco y Brandonisio (1986), el rango de temperatura para el desarrollo de *H. carotae* es de 10-20 °C, y a más de 25 °C, el desarrollo del nematodo se detiene. Por tanto, en los meses en que las temperaturas promedio son elevadas, es posible que el ciclo de vida se prolongue (Greco, 1987; Mugniery y Bossis, 1988). Sin embargo, en este estudio este no fue un factor, ya que la temperatura se mantuvo entre 13 y 20 °C. Los factores que pudieron haber influido en la duración del ciclo de vida (dos veces mayor en la

period before hatching (e.g. the cereal cyst nematodes *H. avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons* and the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*). The peculiar biology of *H. carotae* explains why all nematode stages were found at the same time inside carrot roots during the experiment; after the first appearance of females, eggs within egg masses were continuously hatching and infesting carrot roots. Five generations of the nematode were completed during the ten-month culture period. In the first four months of the experiment, two nematode generations were completed (60 and 105 DPG), which corresponds to one typical carrot growing season. After six months, another three nematode generations were observed with a 30-day period between each one (195, 225 and 255 DPG). It seems that, at first, the nematode required some time to establish its population leading to long life cycles (75 days), but then the life cycle shortened and generations were completed every 30 days. During the experiment, the highest numbers of J2 in the soil were observed at 105, 150 and 195 DPG; a similar trend was observed inside carrot roots. In the first generation of females the number of J2 in soil was constant. From the second generation of females the J2 numbers peaked at 105 DPG and the timing suggests they were most probably derived from egg masses. At 150 days, a second peak of J2 was observed but there was no increase in the numbers of females or cysts in the roots; this second peak of J2 (150 days) was observed 60 days after the largest number of cysts was observed in roots (90 days). As the eggs inside cysts require a two-month period before they can hatch it is likely that this second peak of J2 was derived from the cysts (Greco and Brandonisio, 1986). The timing of the third peak of J2 suggests they were derived from egg masses of the third generation of females (195 days). These results demonstrate the high multiplication capacity of this species, especially

población de la cv. mexicana que la de la población italiana) fueron la variedad de zanahoria que se utilizó y las características particulares de la población mexicana del nematodo que se evaluó. *Heterodera carotae* tiene una biología interesante. Aproximadamente la mitad de los huevos son retenidos dentro del quiste, mientras que la otra mitad son depositados en una matriz gelatinosa que las hembras secretan por las glándulas anales (llamadas masas de huevos). En condiciones adecuadas, los huevos de las masas eclosionan tan pronto como concluye el desarrollo embriogénico. En cambio, la eclosión de los huevos dentro del quiste se demora; en general, estos huevos requieren un periodo de dos meses y la presencia de exudados de la raíz de la planta hospedante antes de eclosionar. Por tanto, *H. carotae* tiene la capacidad de eclosionar todo el año (Winslow, 1955; Aubert, 1986; Greco y Brandonisio, 1986; Greco, 1987; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991). Esto es diferente a otras especies de nematodos formadores de quistes, ya que completan únicamente una generación por año y requieren un periodo de latencia antes de eclosionar (por ejemplo, los nematodos del quiste de los cereales *H. avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons*, y el nematodo del quiste de la papa *Globodera rostochiensis*). La biología peculiar de *H. carotae* explica por qué todos los estadios del nematodo ocurrieron al mismo tiempo dentro de las raíces de zanahoria durante el experimento; después de la primera aparición de las hembras, los huevos dentro de las masas eclosionaron de manera continua e infestaron las raíces de zanahoria. Durante el periodo de cultivo de 10 meses se completaron cinco generaciones del nematodo. En los primeros cuatro meses del experimento se completaron dos generaciones de nematodos (60 y 105 DPG), lo cual corresponde a un típico ciclo de cultivo de zanahoria. Después de seis meses, se observaron otras tres generaciones de nematodos con un periodo de 30 días entre una y



in continuous carrot crops, as is done for carrot seed production. The multiplication factor was inversely related to initial population densities. This means that when the initial population is high, the multiplication factor is low. This is due to competition for space and food in large nematode populations (Seinhorst, 1966; Hajihasani *et al.*, 2010). Studies on population dynamics of the carrot cyst nematode in soil and roots are scarce. Moreover, they have generally been conducted over a shorter period (4-5 months only). Therefore, our findings provide novel and important information that can be used in the development of integrated management strategies and decision-making tools to optimize the timing of control applications.

## CONCLUSIONS

To be able to develop control strategies that are effective against the Carrot Cyst Nematode (CCN), *Heterodera carotae*, the knowledge of population dynamics is indispensable. The results obtained in this study showed three second-stage juveniles (J2's) peaks at 105, 150 and 195 post-germination days, at which time, control strategies that are effective against this stage of the CCN can be applied. Additionally, a multiplication factor of 1.6 was calculated and five generations of the nematode were observed. The CCN caused an average 70.8% yield loss during the experiment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The first author acknowledges CONACyT for the financial support provided for her PhD studies.

otra (195, 225 y 255 DPG). Al parecer, al principio, el nematodo necesitó algún tiempo para establecer su población, lo cual produjo ciclos de vida prolongados (75 días), pero después el ciclo se acortó y las generaciones se completaron cada 30 días. Durante el experimento, el mayor número de J2 en el suelo se observaron a los 105, 150 y 195 DPG; se observó una tendencia similar en el interior de las raíces de zanahoria. En la primera generación de hembras, el número de J2 en el suelo fue constante. A partir de la segunda generación de hembras, los números de J2 alcanzaron su punto máximo a los 105 DPG y el tiempo sugiere que lo más probable es que hayan surgido de las masas de huevos. A los 150 días, se observó un segundo pico de J2, pero no aumentó el número de hembras o de quistes en las raíces; este segundo pico de J2 (150 días) se observó 60 días después de que se produjo el número más grande de quistes en las raíces (90 días). Como los huevos en el interior de los quistes requieren un periodo de dos meses antes de eclosionar, es probable que este segundo pico de J2 se haya derivado de los quistes (Greco y Brandonisio, 1986). El momento en que se dio el tercer pico de J2 sugiere que fueron derivados de masas de huevos de la tercera generación de hembras (195 días). Estos resultados demuestran la gran capacidad de reproducción de esta especie, sobre todo en cultivos continuos de zanahoria, como se hace para la producción de semilla. El factor de reproducción se relacionó inversamente con las densidades poblacionales iniciales. Esto significa que cuando la población inicial es alta, el factor de reproducción es bajo. Esto se debe a la competencia por espacio y alimento en grandes poblaciones de nematodos (Seinhorst, 1966; Hajihasani *et al.*, 2010). Son escasos los estudios sobre la dinámica poblacional del nematodo del quiste de

## CITED LITERATURE

- Ambrogioni L and Marinari-Palmisano A. 1976. Effetto di avvicendamenti culturali su *Heterodera carotae* (Nematoda: Heteroderidae) e sulla produzione di carota in terreno infestato. *Redia* 59: 355.
- Aubert V. 1986. Hatching of the carrot cyst nematode. Pp: 347–348. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*. Plenum Press, London, UK. 467 p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_26)
- Baldwin JG and Mundo-Ocampo M. 1991. Heteroderinae, cyst- and non-cyst forming nematodes. Pp: 275-362. In: Nickle WR (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA. 1064 p.
- Barrot L. 2018. Resistance to *Heterodera carotae* and methods for use. US Patent 20,180,103,647. April 19.
- Byrd DW Jr, Kirkpatrick T and Barker KR, 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1): 142–143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/>
- Davis RM and Nuñez J. 2007. Integrated Approach for Carrot Pest and Disease Management. Pp: 149-188. In: Ciancio A and Mukerji KG (eds.). *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. Springer, The Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8_6)
- Escobar-Avila IM, Medina-Canales MG and Tovar-Soto A. 2017. Distribution, life cycle and histological changes by *Heterodera* sp. in carrot in Puebla. *Mexican Journal of Phytopathology* 35(2): 304-313. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-7>
- Escobar-Avila IM, López-Villegas EO, Subbotin SA and Tovar-Soto A. 2018. First Report of Carrot Cyst Nematode *Heterodera carotae* in Mexico: Morphological, Molecular Characterization and Host Range Study. *Journal of Nematology* 50(2): 229-242. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-021>
- FAO, 2020. Food and Agriculture organization. <http://www.fao.org/faostat/>. (Review september, 2020).
- Fenwick DW. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology* 18: 155-172. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00031485>
- Greco N. 1986. “The carrot cyst nematode”. Pp: 333-346. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*. Plenum Press, London, UK. 467 p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_25)
- Greco N. 1987. *Heterodera carotae*: A destructive nematode of carrot. *Nematology Circular No. 140*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Gainesville, Florida, USA. 4 p.
- Greco N and Brandonisio A. 1980. Relationship between *Heterodera carotae* and carrot yield. *Nematologica* 26(4): 497-500. <https://doi.org/10.1163/187529280x00440>

la zanahoria en el suelo y las raíces. Además, por lo general, se han realizado durante periodos más cortos (en solo 4-5 meses). Por lo tanto, estos resultados aportan información nueva e importante que se puede utilizar en el desarrollo de estrategias de manejo integrado y en las herramientas de toma de decisiones, a fin de optimizar el momento en que se realizan las aplicaciones de medidas de control.

## CONCLUSIONES

Para poder crear estrategias de control que sean eficaces contra el nematodo del quiste de la zanahoria (NQZ), *Heterodera carotae*, es indispensable conocer la dinámica poblacional. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron tres picos de juveniles de segundo estadio (J2) a los 105, 150 y 195 días después de la germinación, momento en que se pueden aplicar las estrategias de control más eficaces para combatir dicho estadio del NQZ. Adicionalmente, se calculó un factor de reproducción de 1.6 y se observaron cinco generaciones del nematodo. El nematodo del quiste de la zanahoria causó una pérdida de rendimiento promedio de 70.8% durante el experimento.

## AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece al CONACyT el apoyo económico que le proporcionó para la realización de sus estudios de doctorado.

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

- Greco N and Brandonisio A. 1986. The Biology of *Heterodera carotae*. *Nematologica* 32(4): 447-460. <https://doi.org/10.1163/187529286x00327>
- Greco N, D'Addabbo T, Brandonisio A and Elia F. 1993. Damage to Italian crops caused by cyst-forming nematodes. *Journal of Nematology* 25 (4S): 836-842. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619465/>
- Groves RL, Clements JR and Bradford BZ. 2020. Carrot diseases resulting from phytoplasmas and viruses. Pp: 148-155. In: Geoffriau E and Simon P (eds). Carrots and Related Apiaceae Crops. CAB International, London, UK. 368 p. <https://doi.org/10.1079/9781789240955.0148>
- Hajihassani A, Tanha Maafi Z, Nicol JM and Rezaee S. 2010. Effect of the cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi* on wheat in microplot trials. *Nematology* 12(3): 357-363. <https://doi.org/10.1163/138855409x12548945788321>
- Handoo ZA and Subbotin SA. 2018. Taxonomy, Identification and Principal Species. Pp: 365-398. In: Perry RN, Moens M and Jones JT (eds.). Cyst nematodes. CAB International, London, UK. 464 p. <https://doi.org/10.1079/9781786390837.0365>
- Jenkins DW. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48(9): 692.
- Jones FGW. 1950a. A new species of root eelworm attacking carrots. *Nature* 165: 81. <https://doi.org/10.1038/165081a0>
- Jones FGW. 1950b. Observations on the beet eelworm and other cyst-forming species of *Heterodera*. *Annals of Applied Biology* 37(3): 407-440. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1950.tb00966.x>
- Mugnieri D and Bossis M. 1988. *Heterodera carotae* Jones, 1950. 1. Gamme d'hôtes, vitesse de développement, cycle. *Revue de Nématologie* 11(3): 307-313. <https://core.ac.uk/reader/39867740>
- Schomaker CH and Been TH. 2006. Plant Growth and Population Dynamics. Pp: 275-301. In: Perry RN and Moens M (eds.). *Plant Nematology*. CAB International, London, UK. 463 p. <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0275>
- Seinhorst JW. 1966. *Longidorus elongatus* on *Fragaria vesca*. *Nematologica* 12(2): 275-279. <https://doi.org/10.1163/187529266x00680>
- Seinhorst JW. 1986. Effects of nematode attack on the growth and yield of crop plants. Pp: 191-209. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*; Plenum Press, London, UK. 467 p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_11)
- Seo Y, Kim YS, Park Y and Kim YH. 2015. Comparisons of Pathological Responses in Carrot to Root-knot Nematodes. *The Plant Pathology Journal* 31(4): 441-445. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.06.2015.0115>
- SIAP, 2020. Secretaria de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Review september, 2020).
- Subbotin SA, Mundo-Ocampo M and Baldwin JG. 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). *Nematology monographs and perspectives*. Vol. B. Brill, The Netherlands. 512 p. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004164345.i-512>
- Winslow RD. 1955. The hatching responses of some root eelworms of the genus *Heterodera*. *Annals of Applied Biology* 43: 19-36. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1955.tb02450.x>
- Yu Q, Ponomareva E, Van Dyk D, McDonald MR, Sun F, Madani M, Tenuta M, 2017. First report of the carrot cyst nematode (*Heterodera carotae* Jones) from carrot fields in Ontario, Canada. *Plant Disease* 101(6): 1056. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-17-0070-pdn>

# Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

## Producción de metabolitos secundarios inducida por quitosano en extractos vegetales de *Piper auritum* y actividad fungicida *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

<sup>1</sup>María del Socorro Fernández, <sup>1</sup>Flavio Hernández-Ochoa, <sup>2</sup>Oscar Carmona-Hernández, <sup>3</sup>Mauricio Luna-Rodríguez, <sup>1</sup>Facultad de Biología, <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias. <sup>3</sup>Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C. P. 91090, Xalapa, Veracruz, México; **Carolina Barrientos-Salcedo**, Facultad de Bioanálisis Veracruz, Universidad Veracruzana, Iturbide s/n, Centro, C. P. 91700. Veracruz, Veracruz, México; **Hugo Asselin**, School of Indigenous Studies, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, Rouyn-Noranda, Canada; **José Armando Lozada-García\***

\* Corresponding author: alozada@uv.mx

Recibido: 22 de Junio, 2020.

Aceptado: 22 de Septiembre, 2020.

Fernández M del S, Hernández-Ochoa F, Carmona-Hernández O, Luna-Rodríguez M, Barrientos-Salcedo C, Asselin H and Lozada-García JA. 2021. Chitosan induced the production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 198-206.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-6>

Primera publicación en línea: 13 de Octubre, 2020.

First publication on line: October 13, 2020.

**Abstract.** The effect of chitosan addition on the production of secondary metabolites of *Piper auritum* ethanolic extracts was tested, as well as the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium*

**Resumen.** Se probó el efecto del quitosano sobre la producción de metabolitos secundarios de extractos etanólicos de *Piper auritum*, así como la actividad fungicida *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Las plantas de *P. auritum* se dividieron en seis parcelas y se añadió quitosano comercial a la mitad de ellas. Se midieron las concentraciones de flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides y ácido salicílico en extractos etanólicos de *P. auritum* y la actividad antifúngica se midió con la concentración efectiva media (CE50). Las concentraciones totales de flavonoides, fenoles y terpenos fueron más altas con el tratamiento con quitosano (sin quitosano 12.8 *versus* con quitosano 12.4 µg equivalente de quercetina por mg, 12.6 *versus* 2.3 µg equivalente de ácido tánico por 10 mg y 16.3 *versus* 11.6 mg equivalente de mentol por

*oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Piper auritum* plants were divided into six parcels and commercial chitosan was added to half of them. The concentrations of flavonoids, phenols, terpenes, alkaloids and salicylic acid were measured in *P. auritum* ethanolic extracts and the antifungal activity was measured with the median effective concentration ( $EC_{50}$ ). The concentrations of total flavonoids, phenols and terpenes were higher with chitosan treatment (respectively 12.8 vs 12.4  $\mu\text{g}$  quercetin equivalent per mg, 12.6 vs. 2.3  $\mu\text{g}$  tannic acid equivalent per 10 mg, and 16.3 vs. 11.6 mg menthol equivalent per 100 mg). However, the alkaloid concentration was reduced by chitosan addition (from 148.2 to 84.5  $\mu\text{g}$  piperine equivalent per mg). Chitosan addition increased the concentration of salicylic acid (from 1.3 to 2.2  $\mu\text{g}$  salicylic acid equivalent per mg). A 4 mg  $\text{mL}^{-1}$  ethanolic extract of *P. auritum* treated with chitosan inhibited 100% of mycelial growth. The  $EC_{50}$  of *P. auritum* against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was lower with chitosan treatment (1.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) compared to control (5.1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Chitosan addition increased secondary metabolite production and *in vitro* antifungal activity in *P. auritum* extracts.

**Key words:** ethanolic extracts, Mexican pepperleaf, hoja santa

Secondary metabolites, such as alkaloids, flavonoids, terpenes and phenols, are molecules synthesized by plants as defense mechanisms against pathogen attacks (Scott *et al.*, 2008). Other molecules, such as chitosan, can be used to elicit secondary metabolite production in plants (López-Moya *et al.* 2019). Plant-produced secondary metabolites can be used as bioplaguicidas (Báez-Valdez *et al.*, 2010), providing environmentally friendly alternatives to the chemical control of

100 mg). Mientras que la concentración de alcaloides disminuyó mediante la adición de quitosano (de 148.2 a 84.5  $\mu\text{g}$  de equivalente de piperina por mg). La adición de quitosano aumentó la concentración de ácido salicílico (de 1.3 a 2.2  $\mu\text{g}$  de equivalente de ácido salicílico por mg). La concentración de 4 mg  $\text{mL}^{-1}$  de extracto etanólico de *P. auritum* tratado con quitosano inhibió el 100% del crecimiento micelial. El tratamiento con quitosano generó que la  $CE_{50}$  de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* fuera menor (1.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) respecto al control (5.1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Se concluye que la adición de quitosano aumentó la producción de metabolitos secundarios y la actividad antifúngica *in vitro* en extractos de *P. auritum*.

**Palabras clave:** extractos etanólicos, pimienta mexicana, hoja santa

Los metabolitos secundarios, como los alcaloides, flavonoides, terpenos y fenoles son moléculas que las plantas sintetizan como mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos (Scott *et al.*, 2008). Otras moléculas, como el quitosano, se pueden utilizar para obtener la producción de metabolitos secundarios en las plantas (López-Moya *et al.* 2019). Los metabolitos secundarios que producen las plantas se pueden utilizar como bioplaguicidas (Báez-Valdez *et al.*, 2010) y, por tanto, constituyen alternativas ecológicas para remplazar el control químico de patógenos como *Fusarium*, un hongo que ataca el sistema vascular de las plantas, que causa enfermedades en varias especies vegetales y frutícolas (Dweba *et al.*, 2017; McGovern, 2015) y considerables pérdidas económicas. El control biológico de *Fusarium* se puede llevar a cabo utilizando compuestos naturales sintetizados por algunas especies vegetales del género *Piper* (Scott *et al.*, 2008), ya que se ha reportado que los aceites esenciales y los extractos tienen efectos fungici-



pathogens such as *Fusarium*, a fungus that attacks the vascular system of plants and causes diseases in several vegetable and fruit species (Dweba *et al.*, 2017; McGovern, 2015) leading to serious economic loss. Biological control of *Fusarium* can be achieved with natural compounds synthesized by some plant species of the genus *Piper* (Scott *et al.*, 2008), which have been shown to have fungicidal effects on *F. solani* f. sp. *piperis* and *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (da Luz *et al.*, 2017; Suprapta and Ohsawa, 2007). The fungicidal activity of *Piper* can be attributed to resistance genes such as those developed by some black pepper (*P. nigrum*) cultivars that produce secondary metabolites when attacked by *F. solani* f. sp. *piperis* (da Luz *et al.*, 2017). Similarly, at least three American *Piper* taxa were reported being resistant to *Fusarium*: low mortality of *P. divaricatum* exposed to *Fusarium* was attributed to secondary metabolite production, especially phenols (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016), the seeds and seedlings of *P. aduncum* are protected by essential oils (Potzernheim *et al.*, 2012), and *P. tuberculatum* expresses gene resistance when are treated with *F. solani* f. sp. *piperis*, which involves some of the same genes related to the systemic acquired resistance (SAR) in *P. nigrum* (Nascimento *et al.*, 2009).

SAR is a generalized defense mechanism of plants against a broad range of pathogens generated by different proteins regulating interactions at the interface of the cellular membranes (Ádám *et al.*, 2018). For example, the recognition of fungal chitin triggers a cascade of chemical signals, activating response genes that synthesize proteins such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL) responsible for flavonoid and phenol production through a biosynthesis pathway involving the phytohormone salicylic acid as a signal molecule (López-Moya *et al.*, 2019). Salicylic acid and chitosan are used together to induce plant resistance

as in *F. solani* f. sp. *piperis* and *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (da Luz *et al.*, 2017; Suprapta and Ohsawa, 2007). La actividad fungicida de *Piper* se atribuye a los genes de resistencia como los que desarrollan algunas variedades de pimienta negra (*P. nigrum*) que producen metabolitos secundarios cuando son atacados por *F. solani* f. sp. *piperis* (da Luz *et al.*, 2017). De igual manera, se han reportado por lo menos tres taxones americanos de *Piper* que son resistentes a *Fusarium*: la baja mortalidad de *P. divaricatum* expuesta a *Fusarium* fue atribuida a la producción de metabolitos secundarios, sobre todo fenoles (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016); las semillas y plántulas de *P. aduncum* están protegidas por aceites esenciales (Potzernheim *et al.*, 2012); y *P. tuberculatum* expresa resistencia genética cuando son tratados con *F. solani* f. sp. *piperis*, que incluye algunos de los mismos genes relacionados con la resistencia sistémica adquirida (RSA) en *P. nigrum* (Nascimento *et al.*, 2009).

La RSA es un mecanismo de defensa generalizado contra una amplia variedad de patógenos que generan las diferentes proteínas que regulan las interacciones en la interfaz de las membranas celulares (Ádám *et al.*, 2018). Por ejemplo, el reconocimiento de la quitina fúngica desencadena una cascada de señales químicas y activan los genes de respuesta que sintetizan las proteínas, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), responsable de la producción de flavonoides y fenoles mediante una ruta biosintética que incluye la fitohormona ácido salicílico como una molécula señal (López-Moya *et al.*, 2019). El ácido salicílico y el quitosano se utilizan juntos para inducir la resistencia de la planta a los patógenos. Ambos ofrecen una alternativa al uso de fungicidas porque modulan la RSA y estimulan la producción de fenoles, terpenos y flavonoides en respuesta a la infección causada por hongos como *Fusarium* (Golkar *et al.*, 2019). Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron

against pathogens. They provide an alternative to fungicides by modulating SAR and by stimulating the production of phenols, terpenes and flavonoids in response to infection by fungi such as *Fusarium* (Golkar *et al.*, 2019). Therefore, the objectives of this study were to evaluate the production of secondary metabolites of chitosan-treated plant extracts of *P. auritum* and to determine their *in vitro* fungicidal activity against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

A wild population of *P. auritum* was selected in the locality of San Andrés Tlalnelhuayocan, Veracruz, Mexico (-96.9776678 W; 19.29358 N; 1450 m asl), within a cloud forest on an andosol, subject to a wet temperate climate. The population included 72 mature plants with reproductive structures, which were divided into 6 parcels with 4 individuals each. Three parcels were treated with commercial chitosan (trademark VEPINSA, Sinaloa, Mexico) [low molecular weight (22,000 to 33,000 g mol<sup>-1</sup>), 27 % chitosan in product, deacetylation 80 %, humidity 10 %, cinder 1.8%, viscosity (10g L<sup>-1</sup>, 25 °C) 30 to 200 cps] dissolved to 1 mg mL<sup>-1</sup> concentration and pH 5.5 (Treatment A). The other three parcels were the control, treated with a Tween 80 solution at 0.01 % (v/v) with pH 5.5 (Treatment B). The treatments were applied every week for one month, following the methodology of Benhamou and Thériault (1992). After the treatments, 3 kg of fresh *P. auritum* (leaves, inflorescences, and stems) were collected and oven dried at 45 ± 5 °C before maceration, separating the treated and control samples by 1.5 m in the drier.

The phytochemical extraction was carried out with a Soxhlet, using 10 g of plant material mixed with ethanol and concentrated with a rotavapor (250 rpm at 45 °C) (Carmona-Hernández *et al.*, 2014). Total alkaloids were measured by spectrophotometry with 544 nm absorbance using

evaluar la producción de metabolitos secundarios de extractos de plantas de *P. auritum* tratadas con quitosano y determinar su actividad fungicida *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Se seleccionó una población silvestre de *P. auritum* en la localidad de San Andrés Tlalnelhuayocan, Veracruz, México (-96.9776678 O; 19.29358 N; 1450 msnm); las muestras se recolectaron en un bosque nuboso con suelo tipo andosol y clima templado húmedo. La población incluyó 72 plantas maduras con estructuras reproductivas, que se distribuyeron en 6 parcelas con 4 individuos en cada una. Se trataron tres parcelas con quitosano comercial (marca VEPINSA, Sinaloa, México) [de bajo peso molecular (de 22,000 a 33,000 g mol<sup>-1</sup>), 27% de quitosano en el producto, 80% de desacetilación, 10% de humedad, 1.8% de ceniza, viscosidad (10g L<sup>-1</sup>, 25 °C) 30 a 200 cps] disuelto a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> y pH 5.5 (Tratamiento A). Las otras tres parcelas fueron el control, tratado con una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v) con pH 5.5 (Tratamiento B). Los tratamientos se aplicaron cada semana por un mes, siguiendo la metodología de Benhamou y Thériault (1992). Después de los tratamientos, se recolectaron 3 kg de *P. auritum* fresca (hojas, inflorescencias y tallos) y se secaron en estufa a 45 ± 5 °C antes de la maceración, separando las muestras tratadas y el control a una distancia de 1.5 m en el secador.

La extracción fitoquímica se llevó a cabo con un Soxhlet, utilizando 10 g de material vegetal mezclado con etanol y concentrado en un evaporador rotativo (250 rpm a 45 °C) (Carmona-Hernández *et al.*, 2014). Los alcaloides totales se midieron por espectrofotometría con 544 nm de absorbancia utilizando el método verde de bromocresol, y los resultados se expresaron en µg de equivalente de piperina (EP) por mg de extracto (Tiwari *et al.*, 2017). Para los flavonoides totales, se utilizó el método de reducción de aluminio con 420 nm

the bromocresol green method and the results were expressed in  $\mu\text{g}$  of piperine equivalent (PE) per mg of extract (Tiwari *et al.*, 2017). For total flavonoids, the aluminum reduction method was used with 420 nm absorbance and the results were expressed as  $\mu\text{g}$  quercetin equivalent (QE) per 10 mg of extract (Blainski *et al.*, 2013). For the total phenols, the Folin-Ciocalteu reagent was used with 760 nm absorbance and the results were expressed as  $\mu\text{g}$  tannic acid equivalent (TAE) per 10 mg of extract (Blainski *et al.*, 2013). The total terpenes were obtained following the methodology of Ghorai *et al.* (2012) and the results were expressed as mg menthol equivalent (ME) per 100 mg of extract. The salicylic acid response hormone was measured using the methodology of Rahman *et al.* (2016): 1000  $\mu\text{L}$  of ethanolic extract ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was added to 50  $\mu\text{L}$   $\text{ClFe}_3$  and 950  $\mu\text{L}$  bidistilled water and the absorbance measured at 540 nm. The results were expressed as  $\mu\text{g}$  salicylic acid equivalent (SAE) per mg of extract. Five replicas of each analysis were carried out.

The *in vitro* inhibitory activity of *P. auritum* extracts was tested using fungal cultures of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* in Petri dishes (90 mm diameter) for three replicas with five concentrations of extracts (0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) and a control (EtOH), added to potato dextrose agar (PDA). The tests were performed by placing 5 mm of mycelium in the center of the Petri dishes. Diameter growth was measured after five days incubation at 27 °C (Rongai *et al.*, 2015). Percentage of inhibition was calculated with the following formula: % growth inhibition = ((control growth – treatment growth) / control growth) \* 100.

The STATISTICA 10 software was used to perform ANOVAs with post hoc Tukey tests. The median effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was estimated with a probit model using the Biostat 6.0 software (Amini and Sidovich, 2010).

de absorbancia y los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de equivalente de quercetina (EQ) por 10 mg de extracto (Blainski *et al.*, 2013). Para el total de fenoles, se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu con 760 nm de absorbancia expresada como  $\mu\text{g}$  de equivalente de ácido tánico (EAT) por 10 mg de extracto (Blainski *et al.*, 2013). Los terpenos totales se obtuvieron siguiendo la metodología de Ghorai *et al.* (2012) y los resultados se expresaron como mg de equivalente de mentol (EM) por 100 mg de extracto. La respuesta de la fitohormona ácido salicílico se midió utilizando la metodología de Rahman *et al.* (2016): se agregaron 1000  $\mu\text{L}$  de extracto etanólico ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{ClFe}_3$  y 950  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada, y la absorbancia se midió a 540 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de equivalente de ácido salicílico (EAS) por mg de extracto. Se realizaron cinco réplicas de cada análisis.

La actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de *P. auritum* se probó utilizando cultivos fúngicos de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* en placas Petri (de 90 mm diámetro) con tres réplicas y cinco concentraciones de extractos (0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) y un control (EtOH), añadidos al papa dextrosa (PDA). Las pruebas se realizaron colocando 5 mm de micelio en el centro de las placas Petri. El crecimiento del diámetro se midió cinco días después de la incubación a 27 °C (Rongai *et al.*, 2015). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: % inhibición de crecimiento = ((crecimiento del control – crecimiento del tratamiento) / crecimiento del control) \* 100.

Para el análisis de varianza (ANEVA) se utilizó el programa STATISTICA 10 con las pruebas post hoc de Tukey. La concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ) se estimó con un modelo probit y el programa Biostat 6.0 (Amini y Sidovich, 2010).

Hubieron diferencias significativas en la producción de metabolitos secundarios entre los extractos de plantas de *P. auritum* con y sin tratamiento de

There were significant differences in the secondary metabolite production between the *P. auritum* plant extracts with and without chitosan treatment (Table 1). In line with previous studies with other plant species, the concentrations of flavonoids, terpenes and phenols were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the chitosan-treated plant extracts. For example, the application of chitosan (200 mg) to *Hypericum perforatum* induced flavonoid production (Brasili *et al.*, 2014), terpene production increased with chitosan addition (1 g) in *Mentha piperita* (Chang *et al.*, 1998), and phenol concentrations were higher with chitosan treatment (200, 500 and 1000 ppm) in extracts of *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Yin *et al.*, 2012). According to López-Moya *et al.* (2019), the chitosan treatment increased the production of salicylic acid in plants; which can trigger the production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), in turn exacerbating the production of flavonoids, terpenes, and phenols, which might contribute to generate the SAR (Wiesel *et al.*, 2014). Contrary to the positive effect

quitosano (Cuadro 1). Conforme a estudios anteriores en los que se utilizaron otras especies vegetales, las concentraciones de flavonoides, terpenos y fenoles fueron significativamente más altas ( $P < 0.05$ ) en los extractos de plantas tratadas con quitosano. Por ejemplo, la aplicación de quitosano (200 mg) a *Hypericum perforatum* indujo la producción de flavonoides (Brasili *et al.*, 2014), la producción de terpeno aumentó con la adición de quitosano (1 g) en *Mentha piperita* (Chang *et al.*, 1998) y las concentraciones de fenol fueron más altas con el tratamiento de quitosano (200, 500 y 1000 ppm) en extractos de *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Yin *et al.*, 2012). Al igual que en el estudio de López-Moya *et al.* (2019), el tratamiento de quitosano aumentó la producción de ácido salicílico en las plantas, que puede desencadenar la producción de fenilalanina amonio liasa (PAL), exacerbando la producción de flavonoides, terpenos y fenoles, lo cual pudo haber contribuido a la RSA (Wiesel *et al.*, 2014). A diferencia del efecto positivo en los flavonoides, terpenos y fenoles, el tratamiento con

**Table 1. Mean concentration (with standard deviation and coefficient of variation) of secondary metabolites and salicylic acid in *Piper auritum* extracts with and without chitosan treatment.**

**Cuadro 1. Concentración media (con desviación estándar y coeficiente de variación) de metabolitos secundarios y ácido salicílico en extractos de *Piper auritum* con y sin tratamiento de quitosano.**

| Metabolite     | Treatment | Mean concentration | Standard deviation | Coefficient of variation |
|----------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| Alkaloids      | A         | 84.5 <sup>a</sup>  | 1.1                | 0.8                      |
|                | B         | 148.2 <sup>b</sup> | 0.8                | 0.9                      |
| Flavonoids     | A         | 12.8 <sup>b</sup>  | 0.1                | 1.0                      |
|                | B         | 12.4 <sup>a</sup>  | 0.1                | 0.5                      |
| Phenols        | A         | 12.6 <sup>b</sup>  | 0.0                | 1.7                      |
|                | B         | 2.3 <sup>a</sup>   | 0.2                | 1.9                      |
| Terpenes       | A         | 16.3 <sup>b</sup>  | 0.3                | 2.7                      |
|                | B         | 11.6 <sup>a</sup>  | 0.4                | 2.7                      |
| Salicylic acid | A         | 2.2 <sup>b</sup>   | 0.1                | 7.5                      |
|                | B         | 1.3 <sup>a</sup>   | 0.0                | 1.2                      |

A: with chitosan, B: without chitosan. / A: con quitosano; B: sin quitosano.

Alkaloids:  $\mu\text{g EP mg}^{-1}$ , Flavonoids:  $\mu\text{g EQ mg}^{-1}$ , Phenols:  $\mu\text{g Eat } 10 \text{ mg}^{-1}$ , Terpenes  $\text{mg EM}/100 \text{ mg}$ , Salicylic acid:  $\mu\text{g ESA mg}^{-1}$ . Different superscript letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) in mean metabolite concentration. / Alcaloides:  $\mu\text{g EP mg}^{-1}$ , Flavonoides:  $\mu\text{g EQ mg}^{-1}$ , Fenoles:  $\mu\text{g Eat } 10 \text{ mg}^{-1}$ , Terpenos  $\text{mg EM}/100 \text{ mg}$ , Ácido salicílico:  $\mu\text{g ESA mg}^{-1}$ . Las diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración media de metabolitos.

on flavonoids, terpenes and phenols, the chitosan treatment significantly decreased the concentration of alkaloids ( $P < 0.05$ ). Such an effect has previously been reported in *Stemona curtisii* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999) at concentrations of chitosan higher than  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ , in less than 4 weeks.

The median effective concentration ( $EC_{50}$ ) of *P. auritum* extracts against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was significantly lower with chitosan treatment ( $EC_{50} = 1.473 \text{ mg mL}^{-1}$ ; standard error = 0.288) than in the control ( $EC_{50} = 5.123 \text{ mg mL}^{-1}$ ; standard error = 0.646) ( $P < 0.001$ ). The inhibition curve shows that the highest concentration *P. auritum* ethanolic extract (4 mg/mL) caused 100% inhibition of *Fusarium* growth with chitosan treatment, compared to 41% without chitosan (Figure 1). Fungicidal activity of *P. auritum* against *F. oxysporum* and other phytopathogenic fungi has previously been reported by Pineda *et al.*, (2012), which could be attributed to high

quitosano disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) la concentración de alcaloides. Este efecto fue reportado anteriormente en *Stemona curtisii* (Pitta-Alvarez *et al.*, 1999) a concentraciones de quitosano de más de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ , en menos de 4 semanas.

La concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de extractos de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* fue significativamente menor con el tratamiento de quitosano ( $EC_{50} = 1.473 \text{ mg mL}^{-1}$ ; error estándar = 0.288) que la del control ( $EC_{50} = 5.123 \text{ mg mL}^{-1}$ ; error estándar = 0.646) ( $P < 0.001$ ). La curva de inhibición muestra que la concentración más alta de extracto etanólico de *P. auritum* (4 mg/mL) inhibió el 100% del crecimiento de *Fusarium* con el tratamiento de quitosano comparado con el 41% sin quitosano (Figura 1). La actividad fungicida de *P. auritum* contra *F. oxysporum* y otros hongos fitopatogénicos fue anteriormente reportada por Pineda *et al.* (2012). La actividad podría ser atribuida a las altas concentraciones de fenoles, flavonoides y

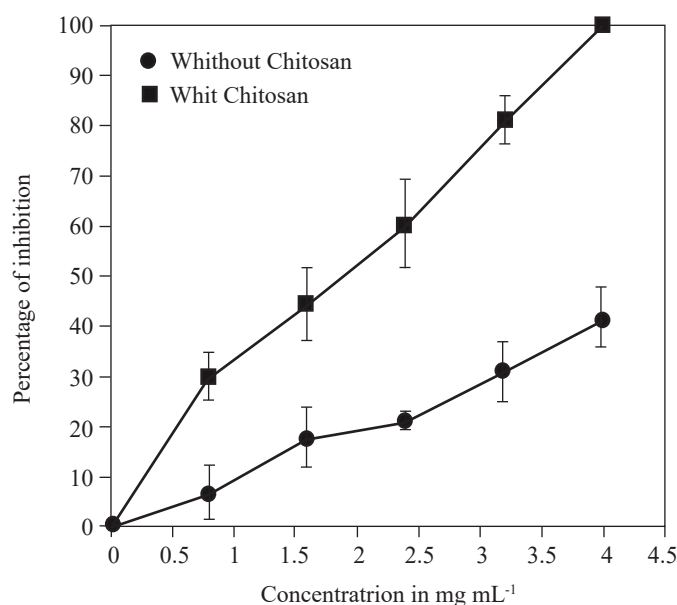


Figure 1. Fungicidal activity ethanolic extracts of *Piper auritum* against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* previously treated with chitosan (mean and standard error).

Figura 1. Extractos etanólicos de la actividad fungicida de *Piper auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* previamente tratada con quitosano (media y errores estándar).



concentrations of phenols, flavonoids and terpenes. The American *Piper* species are known to possess resistance genes associated with the production of phenylpropanoids (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2009; Potzernheim *et al.*, 2012). The results presented here show that chitosan has an eliciting effect on the production of phenols, flavonoids, terpenes and salicylic acid in the plant extracts of *P. auritum*, but an antagonistic effect on alkaloid production. The fungicidal activity of *P. auritum* ethanolic extracts against *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* was markedly improved by chitosan addition.

terpenos. Se sabe que las especies americanas de *Piper* poseen genes de resistencia asociadas con la producción de fenilpropanoides (Erisléia-Meireles *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2009; Potzernheim *et al.*, 2012). Los resultados que aquí se describen muestran que el quitosano tiene un efecto desencadenante en la producción de fenoles, flavonoides, terpenos y ácido salicílico en los extractos de *P. auritum*, pero tiene también un efecto antagonista en la producción de alcaloides. La actividad fungicida de los extractos etanólicos de *P. auritum* contra *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* mejoró notablemente con la adición de quitosano.

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

## LITERATURE CITED

- Ádám AL, Nagy ZÁ, Kátay G, Mergenthaler E and Viczián O. 2018. Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4): 1146. <https://doi.org/10.3390/ijms19041146>
- Amini J and Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50: 172–178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>
- Báez-Valdez EP, Carrillo-Fasio JA, Báez-Sañudo MA, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB and Contreras-Martínez R. 2010. Uso de portainjertos resistentes para el control de la fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en condiciones de malla sombra. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 111–123. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a4.pdf>
- Benhamou N and Thériault G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 33–52. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90047-Y](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90047-Y)
- Blainski A, Lopes GC and De Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Brasili E, Pratico G, Marini F, Valletta A, Capuani G, Sciubba F, Miccheli A and Pasqua G. 2014. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* *in vitro* roots. *Metabolomics* 10: 1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0660-z>
- Carmona-Hernández O, Fernández MS, Palmeros-Sánchez B and Lozada-García JA. 2014. Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 67–73. <https://www.redalyc.org/pdf/370/37033725008.pdf>
- Chang JH, Shin JH, Chung IS and Lee HJ. 1998. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letters* 20: 1097–1099. <https://doi.org/10.1023/A:1005396924568>
- da Luz SFM, Yamaguchi LF, Kato MJ, de Lemos OF, Xavier LP, Maia JGS, Ramos AR, Setzer WN and da Silva JKR. 2017. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (black pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 2434. <https://doi.org/10.3390/ijms18122434>
- Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, Motaung TE, Sydenham S, Mwadzingeni L and Tsilo TJ. 2017. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection* 91: 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>
- Erisléia-Meireles N, Luciana-Xavier P, Alessandra-Ramos R, José-Guilherme MS, William-Setzer N and da Silva JKR. 2016. Phenylpropanoids produced by *Piper divaricatum*, a resistant species to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the pathogenic agent of fusariosis in black pepper. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 7: 333. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000333>
- Ghorai N, Ghorai N, Chakraborty S, Guchait S, Saha SK and Biswas S. 2012. Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard

- reagent. Protocol Exchange. November. <https://dx.doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Golkar P, Taghizadeh M and Yousefian Z. 2019. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 137(3): 575–585.
- López-Moya F, Suarez-Fernández M and López-Llorca LV. 2019. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 332. <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Nascimento SB, de Mattos C, Cezar J, de Menezes IC, Reis Duarte MDL, Darnet S, Harada ML and de Souza CRB. 2009. Identifying sequences potentially related to resistance response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by suppression subtractive hybridization. *Protein and Peptide Letters* 16: 1429–1434. <https://doi.org/10.2174/092986609789839368>
- Pineda RM, Vizcaíno SP, García CM, Gil JH, Durango DL. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 507–515. <http://www.chileanjar.cl/files/V7214Y2012CJAR120090.pdf>
- Pitta-Alvarez SI and Giulietti AM. 1999. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida*. Effect of medium pH and growth phase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 31–38. <https://doi.org/10.1023/A:1006359429830>
- Potzernheim MCL, Bizzo HR, Silva JP and Vieira RF. 2012. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 42: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.12.025>
- Rahman A, Sultana V, Ara J and Ehteshamul-Haque S. 2016. Induction of systemic resistance in cotton by the neem cake and *Pseudomonas aeruginosa* under salinity stress and *Macrophomina phaseolina* infection. *Pakistan Journal of Botany* 48: 1681–1689. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48\(4\)/45.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48(4)/45.pdf)
- Rongai D, Pulcini P, Pesce B and Milano F. 2015. Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Science* 10: 409–416. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0040>
- Scott IM, Jensen HR, Philogène BJ and Arnason JT. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Supranta DN and Ohsawa K. 2007. Fungicidal activity of *Piper betle* extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 13: 40–46. <http://issaasphil.org/wp-content/uploads/2020/02/J-Issaas-v13n2-December-2007-Full-Journal.pdf>
- Tiwari RK, Udayabhanu M. and Chanda S. 2016. Quantitative analysis of secondary metabolites in aqueous extract of *Clerodendrum serratum*. *International Research Journal of Pharmacy* 7: 61–65. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0712148>
- Wiesel L, Newton AC, Elliott I, Booty D, Gilroy EM, Birch PR and Hein I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Yin H, Fretté XC, Christensen LP and Grevsen K. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(1): 136–143. <https://doi.org/10.1021/jf204376j>

# Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean

## Efecto inhibitorio de bacterias antagonistas contra *Sclerotium rolfsii*, agente causal del tizón sureño del frijol

Juan Carlos Martínez-Álvarez<sup>§</sup>, Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México; Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, C.P. 81101; <sup>1</sup>Flavio Camacho-Angulo<sup>§</sup>, <sup>1</sup>Unidad de Investigación en Ambiente y Salud, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis, Sinaloa, México. Blvd. Macario Gaxiola S/N, Col. Conrado Espinoza, C.P. 81223, México; <sup>3</sup>Yolani de Jesús Bojórquez-Armenta <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Occidente, UR Guasave, Sinaloa, México. Avenida Universidad S/N, C.P. 81048, México; <sup>2</sup>Bardo Sánchez-Soto; <sup>3</sup>Jesús Damián Cordero-Ramírez; <sup>2</sup>Cecilia de los Ángeles Romero-Urías; <sup>2</sup>Rubén Felix-Gástelum, <sup>1</sup>Guadalupe Arlene Mora-Romero\*. <sup>§</sup>Igual colaboración de autores.

\*Autor de correspondencia: arlene.mora@uadeo.mx.

Recibido: 17 de Junio, 2020.

Aceptado: 20 de Septiembre, 2020.

Martínez-Álvarez JC, Camacho-Angulo F, Bojórquez-Armenta Y de J, Sánchez-Soto B, Cordero-Ramírez JD, Romero-Urías CA, Felix-Gástelum R and Mora-Romero GA. 2021. Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 207-218.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-5>

Primera publicación en línea: 11 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 11, 2020.

**Resumen.** El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* e *in planta*. Se recolectaron muestras de suelo en los municipios de Ahome, Guasave y Angostura,

**Abstract.** The objective of the present study was to select bacterial strains from the rhizosphere of common bean crop and to determine their potential to control *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and *in planta* conditions. Soil samples were collected in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, México. The strains were evaluated under *in vitro* conditions, afterwards the best isolates were tested *in planta*, and were identified based on 16S region of ribosomal DNA (three strains). Sixty-five bacterial isolates were tested against *Sclerotium rolfsii* with an inhibition from 2.5 to 65%. *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) and *Burkholderia* sp. (GLS06) inhibited 55, 60 and 65% under *in vitro* conditions; and resulted not hemolytic and their molecular identification was based on 16S rDNA. Only *Burkholderia* sp. exerted the highest percentage inhibition *in planta* to control *S. rolfsii*

Sinaloa, México, durante el ciclo agrícola 2018-2019. Los aislados se evaluaron bajo condiciones *in vitro* y se seleccionaron los mejores para la evaluación *in planta* e identificación molecular (tres aislados) con base a la región 16S del ADN ribosomal. Se evaluaron 65 aislados bacterianos *in vitro* contra *S. rolfsii* con un porcentaje de inhibición de 2.5 a 65%. *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06) inhibieron 55, 60 y 65% bajo condiciones *in vitro*; además resultaron no hemolíticas. Solo *Burkholderia* sp. ejerció mayor porcentaje de inhibición *in planta* para el control de *S. rolfsii*, con reducción de incidencia y severidad de la enfermedad en un 40 y 50% respectivamente, y promovió el peso seco de la planta. *A. pittii* o *P. putida* no fueron eficientes para el control del hongo *in planta*. Se sugiere hacer estudios con las bacterias en invernadero y campo.

**Palabras clave:** antagonista, biocontrol, *Phaseolus vulgaris*

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los principales cultivos en Sinaloa, México. Su producción es afectada por diversos factores, entre los que destacan las enfermedades fungosas como el tizón sureño *Sclerotium rolfsii* (teleomorfo *Athelia rolfsii*), el cual causa pudrición de la raíz y tallo. *S. rolfsii* es un patógeno polífago reportado en zonas tropicales y subtropicales, asociado con pérdidas económicas significativas (Gholami *et al.*, 2019). Para el control de la enfermedad se utilizan tratamientos químicos, pero se requieren esfuerzos para la implementación de estrategias amigables con el ambiente para el manejo de la enfermedad.

Se han reportado microorganismos del suelo con potencial para el control de *S. rolfsii* en algunos cultivos, pero los estudios realizados en el cultivo

with a reduction of incidence and disease severity of 40 and 50% respectively, and promoted the dry weight of the plant. *A. pittii* and *P. putida* were not efficient in controlling the fungus *in planta*. Greenhouse and field studies with these bacteria are suggested.

**Key words:** antagonist, biocontrol, *Phaseolus vulgaris*

The common bean crop (*Phaseolus vulgaris*) is one of the main crops in Sinaloa, Mexico. Its production is affected by a diversity of factors, mainly fungal diseases such as the southern blight *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*), which causes root and stem rot. *S. rolfsii* is a polyphagous pathogen reported in tropical and subtropical areas, related to significant economic losses (Gholami *et al.*, 2019). Chemical treatments are used to control the disease, although efforts are required to implement eco-friendly strategies for the control of the disease.

Soil microorganisms have been reported with the potential to control *S. rolfsii* in some crops, although studies performed on the common bean crop are scarce. Volpiano *et al.* (2018) reported that *Rhizobium* spp. (SEMIA 439 and SEMIA 4088) reduce the incidence 18.3 and 14.5%. However, the use of native strains is recommended for the biological control of the pathogen, since they present tolerance to the local environmental conditions and a higher potential in the control of the disease. Thus, the objective of the study was to select bacterial strains from the common bean crop rhizosphere collected in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, Mexico during the 2018-2019 growing season and determine their potential for the control of *S. rolfsii*.

de frijol son escasos. Volpiano *et al.* (2018) reportaron que el tratamiento con *Rhizobium* spp. (SEMIA 439 y SEMIA 4088) reducen la incidencia en 18.3 y 14.5%. Sin embargo, se recomienda el uso de cepas nativas en el control biológico del patógeno, porque exhiben tolerancia a las condiciones ambientales locales y muestran un mayor potencial en el control de la enfermedad. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol recolectadas en los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México durante el ciclo agrícola 2018-2019 y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii*.

**Aislamiento bacteriano.** Se realizaron muestreos dirigidos a cultivos de frijol, en etapa vegetativa, en tres municipios de Sinaloa. Se recolectaron muestras de suelos de la rizósfera de plantas asintomáticas, se incluyeron cuatro localidades (con 10 lotes cada una) en cada uno de los municipios (Ahome, Guasave y Angostura), con un total de 12 muestras compuestas. En el laboratorio se mezclaron 5 g de muestra de suelo en 50 mL de solución salina estéril al 0.85% para realizar diluciones seriales hasta  $10^{-4}$ ; enseguida 100  $\mu$ L de las dos últimas diluciones se distribuyeron por triplicado en cajas Petri con agar nutritivo (AN, BD Bioxon®), las cajas se incubaron a 25 °C durante 24 h. Las colonias se purificaron, con base en su color y forma, y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15%.

**Aislamiento e identificación de *S. rolfsii*.** Los aislados de *S. rolfsii* se obtuvieron a partir de esclerocios presentes en plantas de frijol en campos agrícolas del Municipio de Ahome, Sinaloa, los cuales se desinfectaron, sembraron y purificaron en medio PDA. La confirmación de la patogenicidad del aislado de *S. rolfsii* utilizado en este estudio, se evidenció a través de la inoculación en

**Bacterial isolation.** Samples were taken from common bean plants in a vegetative state from three Municipalities of Sinaloa. Soil samples were taken from the rhizospheres of asymptomatic plants. Four locations were included (with 10 fields each) in each of the Municipalities (Ahome, Guasave and Angostura), for a total of 12 compound samples. In the laboratory, 5 g of soil samples were mixed with 50 mL of a sterile saline solution at 0.85% to carry out serial dilutions up to  $10^{-4}$ ; next, 100  $\mu$ L of the last two dilutions were distributed in triplicate in Petri dishes with nutrient agar (AN, BD Bioxon®) and the dishes were incubated at 25 °C for 24 h. The colonies were purified based on their color and shape, and stored at -70 °C in 15% glycerol.

**Isolation and identification of *S. rolfsii*.** The *S. rolfsii* isolates were obtained from sclerotia present in the common bean plants in the fields in the Municipality of Ahome, Sinaloa; they were disinfested, seeded and purified in PDA medium. The pathogenicity of the *S. rolfsii* isolates used in this study was confirmed under greenhouse conditions with the inoculation in common bean seeds; the symptoms were corroborated 13 days after the inoculation and re-isolation of the fungus. The pathogen was identified preliminarily by carrying out morphological studies on the hyphae, as well as colony and sclerotia morphology (Nandi *et al.*, 2017). The identity was confirmed with the amplification and sequencing of a fragment of the ribosomal region, with oligonucleotides ITS4/ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'/5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') which amplify ~ 587 pb (White *et al.*, 1990).

**Antagonism test of bacteria against *S. rolfsii*.** The *in vitro* evaluation of the antagonism of bacteria was carried out using the dual culture technique in Petri dishes with PDA (Yáñez-Mendizábal *et*



semillas de frijol, la corroboración de síntomas a los 13 días después de la inoculación y el re-aislamiento del hongo, bajo condiciones de invernadero. La identificación preliminar del patógeno se efectuó mediante estudios morfológicos de las hifas, colonias miceliales y esclerocios (Nandi *et al.*, 2017). La identidad se confirmó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de la región ribososomal, con los oligonucleótidos ITS4/ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') que amplifican ~ 587 pb (White *et al.*, 1990).

**Prueba de antagonismo de bacterias contra *S. rolf sii*.** La evaluación del antagonismo *in vitro* de las bacterias en estudio se realizó mediante la técnica de cultivo dual en cajas Petri con PDA (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2011), como testigo se utilizaron cajas Petri con PDA solo con *S. rolf sii*. Las cajas se incubaron a 25 °C hasta que el crecimiento del micelio en el testigo alcanzó 4 cm de diámetro. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIRG) de acuerdo a los procedimientos descritos por Kumar *et al.* (2011), con la fórmula  $PIRG = (R1-R2 / R1)$  multiplicado por 100, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno y R2 es el crecimiento radial del patógeno que interactúa con las bacterias.

**Pruebas de hemólisis.** Se realizaron pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002) a los aislamientos bacterianos que mostraron porcentajes de inhibición mayor a 40%. Se utilizaron cajas de medio de cultivo agar-sangre a las cuales se les realizaron perforaciones de 0.5 cm de diámetro. Los aislados bacterianos se cultivaron en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. De cada aislado bacteriano se centrifugó 1 mL a 13,000 rpm por 5 minutos, se tomaron 100 µL del sobrenadante y se colocaron en las perforaciones

*al.*, 2011); Petri dishes with PDA containing only *S. rolf sii* were used as a control. The dishes were incubated at 25 °C until the growth of the mycelia reached a diameter of 4 cm. The percentage of inhibition of radial growth (PIRG) was calculated following the procedures described by Kumar *et al.* (2011), with the formula  $PIRG = (R1-R2 / R1)$  multiplied by 100, where R1 is the radial growth of the pathogen and R2 is the radial growth of the pathogen that interacts with the bacteria.

**Hemolysis tests.** Hemolysis tests were carried out (Forbes *et al.*, 2002) on the bacterial isolates that displayed percentages of inhibition higher than 40%. Agar-blood culture media dishes were used, in which holes with a diameter of 0.5 cm were made. The bacterial isolates were grown in 5 mL of Luria Bertani (LB) medium at 30 °C on a shaker at 250 rpm for 24 h. Out of each bacterial isolates, 1 mL was centrifuged at 13,000 rpm for 5 minutes, 100 µL of the supernatant were taken and placed in the holes of the dishes containing agar-blood. The dishes were incubated for 24 h at 37 °C. The criteria for the hemolysis test were as follows: alpha hemolysis ( $\alpha$ -hemolysis) or partial hemolysis when a dark green halo appears in the culture medium; beta hemolysis ( $\beta$ -hemolysis) or total hemolysis when a pale halo appears in the culture medium as an effect of the total lysis of the erythrocytes; and gamma hemolysis ( $\gamma$ -hemolysis) or non-hemolytic, is the culture medium presents no halo (Forbes *et al.*, 2002).

**Evaluation of antagonistic bacteria *in planta*.** For this evaluation, the three bacterial isolates with the highest percentage of inhibition, non-hemolytic, were chosen. A 0.5 cm PDA plug with active fungal growth was placed in pots with sterile vermiculite/sand (1:1, v/v), on top of which the previously disinfested common bean seed with

de las cajas de agar-sangre. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C. Los criterios de la prueba de hemólisis fueron los siguientes: hemólisis alfa ( $\alpha$ -hemólisis) o hemólisis parcial cuando se presenta un halo con obscurecimiento verde en el medio de cultivo; hemólisis beta ( $\beta$ -hemólisis) o hemólisis total cuando se observa un halo claro del medio de cultivo por el efecto de lisis total de los eritrocitos, y hemólisis gama ( $\gamma$ -hemólisis) o no hemolítico si el medio de cultivo no presenta ningún tipo de aclaramiento (Forbes *et al.*, 2002).

#### **Evaluación de bacterias antagonistas *in planta*.**

Para esta evaluación se seleccionaron los tres aislados con mayor porcentaje de inhibición, no hemolíticos. Se colocó un disco de 0.5 cm de PDA con crecimiento activo del hongo en macetas con vermiculita/arena (1:1, v/v) estéril, sobre éste se sembró la semilla de frijol previamente desinfectada con NaClO al 0.5%. A cada semilla en el sustrato se le agregó 1 mL de suspensión bacteriana (COHUI 06, SANMI 02 o GLS 06) en medio LB, incubada durante 24 h (Densidad óptica a 595 nm = 1.0). Las semillas testigo se trataron con 1 mL de medio LB sin bacteria. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, se distribuyeron en un arreglo completamente al azar y se mantuvieron en condiciones controladas (8 h de luz/16 h de oscuridad, 25 °C) durante 13 días.

La efectividad biológica de los tratamientos en el control de la enfermedad se determinó con base en la incidencia (número de plantas con síntomas entre el total de plantas evaluadas en cada tratamiento por 100) (Cuadro 2). También se evaluó el índice de severidad con la escala de 0 a 4 (Moreno y Acevedo, 2002), donde: 0 = sin daños; 1= 1-25% de hojas amarillas y marchitamiento inicial del tallo; 2= 26-50% de hojas amarillentas y comienzo de la muerte del tallo; 3= 51-75% de hojas necróticas amarillentas y muerte progresiva de tallos y 4=

0.5% NaClO was placed. One mL of bacterial suspension (COHUI 06, SANMI 02 or GLS 06) in LB broth, incubated for 24 h (Optical density at 595 nm = 1.0) was added to each seed in the substrate. The control seeds were treated with 1 mL in LB broth without bacteria. Ten plants were used per treatment, which were randomly distributed and kept under controlled conditions (8 h of light/16 h of darkness, 25 °C) for 13 days.

The biological effectiveness of the treatments in the control of the disease was determined based on the incidence (number of plants with symptoms divided by the total number of plants evaluated in each treatment times 100) (Table 2). The severity index was also evaluated with a scale of 1 to 4 (Moreno and Acevedo, 2002), where: 0=no damage; 1= 1-25% of yellow leaves and initial wilting of the shoot; 2= 26-50% of yellowing leaves and the start of the stem death; 3= 51-75% of necrotic yellow leaves and progressive death of stem, and 4= 76-100% of necrotic tissue, mycelial growth and sclerotia. In addition, the variables of plant height, and fresh and dry weights of roots and the aerial section were registered (data not shown). The data were subject to the Shapiro-Wilk normality test; then they were included in the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney non-parametric tests with a value of  $p<0.05$ .

**Molecular identification.** The bacterial isolations with the highest percentage of inhibition were molecularly identified; genomic DNA, extracted with DNazol® (Invitrogen, Cat. No. 10503-027), was used as a template to amplify a fragment of ~1400 pb of the 16S rDNA region by PCR, with the oligos F<sub>2</sub>C/C (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3' and 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3') (Shi *et al.*, 1997). The PCR products were visualized by electrophoresis through an 0.8% (w/v) agarose gel. Afterwards, the PCR products were purified using

76-100% de tejido necrótico, micelio en crecimiento y esclerocios. Además, se registraron las variables altura de planta, peso fresco y seco, tanto de la raíz, como de la parte aérea (datos no mostrados). Los datos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y se recurrió a las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney con un valor de  $p < 0.05$ .

**Identificación molecular.** Los aislados de bacterias con mayor porcentaje de inhibición se identificaron molecularmente, se partió de ADN genómico extraído con DNazol® (Invitrogen, Cat. No. 10503-027), que se utilizó como templado para amplificar un fragmento de ~1400 pb de la región 16S rADN por PCR, con los oligos F<sub>2</sub>C/C (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3' y 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3') (Shi *et al.*, 1997). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Después se realizó la purificación de los productos de PCR, con el kit QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104), los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se compararon con el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), en la plataforma BLASTn para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con los organismos que mostraran una identidad mayor al 90%. El árbol filogenético se construyó en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución de dos parámetros (Kimura, 1980). La solidez de la topología se evaluó mediante la prueba de bootstrap con 1000 réplicas.

Se aislaron un total de 65 bacterias de la rizósfera del cultivo de frijol, con un porcentaje de inhibición *in vitro* contra *S. rolfii* que osciló de 2.5 hasta 65% (Cuadro 1). Solo 14 aislados mostraron un porcentaje de inhibición superior a 40%. En las

the QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104); the purified products were sequenced in both directions. The sequences obtained were compared with the data bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), in the BLASTn platform to determine the similarity of the obtained sequences with the organisms that displayed an identity higher than 90%. The phylogenetic tree was created using the software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) with the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) and the two-parameter substitution model (Kimura, 1980). The solidness of the topology was evaluated using the bootstrap test with 1000 replications.

A total of 65 bacteria were isolated from the rhizosphere of the common bean plants, with a percentage of inhibition *in vitro* against *S. rolfii* that ranged from 2.5 to 65% (Table 1). Only 14 isolations displayed a percentage of inhibition higher than 40%. In the hemolysis tests (Forbes *et al.*, 2002), six displayed total hemolysis ( $\beta$ ), two displayed partial hemolysis ( $\alpha$ ) and six were non-hemolytic ( $\gamma$ ) (Table 1).

The three, non-hemolytic, with the highest *in vitro* inhibition, were *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) and *Burkholderia* sp. (GLS06) (Figure 1). For the *in planta* evaluation, the plants produced from seeds treated with *Burkholderia* sp. displayed an incidence and severity of 40 and 50%, respectively (Table 2), whereas in the plants in which *P. putida* and *A. pittii* were used, even though they did display inhibition of growth *in vitro*, these did not control the disease under greenhouse conditions, since the severity indices were similar to those of the control plants inoculated only with the pathogen (Table 2). This suggests that the results of the effects of antagonism observed *in vitro* do not always correlate to the results observed *in planta*, as in with *Pseudomonas fluorescences*

**Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial del *Sclerotium rolfii* (*in vitro*) con aislados bacterianos de la rizósfera del cultivo de frijol, colectados de los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México.**  
**Table 1. Inhibition of the mycelial growth of *Sclerotium rolfii* (*in vitro*) with bacterial isolations from the rhizosphere of bean plants, gathered in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, Mexico.**

| Aislado | Municipio | Inhibición (%) | Hemólisis | Aislado | Inhibición (%) | Municipio | Hemólisis |
|---------|-----------|----------------|-----------|---------|----------------|-----------|-----------|
| ALHU03  | Angostura | 40             | $\beta$   | GSI 03  | 7.5            | Guasave   |           |
| ALHU04  | Angostura | 22.5           |           | GSI04   | 12.5           | Guasave   |           |
| ALHU05  | Angostura | 17.5           |           | JJR01   | 15             | Guasave   |           |
| ALHU06  | Angostura | 25             |           | JJR03   | 20             | Guasave   |           |
| ALHU07  | Angostura | 20             |           | JJR04   | 7.5            | Guasave   |           |
| CAMA01  | Ahome     | 12.5           |           | JJR05   | 7.5            | Guasave   |           |
| CAMA02  | Ahome     | 17.5           |           | JJR06   | 20             | Guasave   |           |
| CAMA03  | Ahome     | 7.5            |           | JJR07   | 10             | Guasave   |           |
| CAMA04  | Ahome     | 12.5           |           | JJR71   | 15             | Guasave   |           |
| COHUI02 | Ahome     | 2.5            |           | MS01    | 27.5           | Angostura |           |
| COHUI03 | Ahome     | 15             |           | MS03    | 17.5           | Angostura |           |
| COHUI04 | Ahome     | 20             |           | MS04    | 25             | Angostura |           |
| COHUI41 | Ahome     | 32.5           |           | MS05    | 45             | Angostura | $\beta$   |
| COHUI06 | Ahome     | 55             | $\gamma$  | OLLE02  | 17.5           | Angostura |           |
| COHUI05 | Ahome     | 7.5            |           | OLLE71  | 62.5           | Angostura | $\beta$   |
| COHUI07 | Ahome     | 22.5           |           | OLLE72  | 40             | Angostura | $\beta$   |
| COHUI08 | Ahome     | 17.5           |           | OLLE74  | 52.5           | Angostura | $\beta$   |
| COHUI09 | Ahome     | 47.5           | $\gamma$  | PALM01  | 23.5           | Angostura |           |
| EB03    | Guasave   | 25             |           | PALM02  | 17.5           | Angostura |           |
| EB11    | Guasave   | 27.5           |           | SANMI01 | 45             | Angostura | $\alpha$  |
| EB12    | Guasave   | 12.5           |           | SANMI02 | 60             | Angostura | $\gamma$  |
| EBAN01  | Angostura | 22.5           |           | SANMI03 | 5              | Angostura |           |
| EBAN02  | Angostura | 22.5           |           | SANMI05 | 30             | Angostura |           |
| EBAN04  | Angostura | 5              |           | SANMI06 | 50             | Angostura | $\gamma$  |
| GLS01   | Guasave   | 25             |           | SANMI07 | 7.5            | Angostura |           |
| GLS02   | Guasave   | 5              |           | ZI 01   | 27.5           | Ahome     |           |
| GLS03   | Guasave   | 17.5           |           | ZI 02   | 25             | Ahome     |           |
| GLS04   | Guasave   | 22.5           |           | ZI 03   | 40             | Ahome     | $\beta$   |
| GLS05   | Guasave   | 42.5           | $\alpha$  | ZI 04   | 12.5           | Ahome     |           |
| GLS06   | Guasave   | 65             | $\gamma$  | ZI 09   | 7.5            | Ahome     |           |
| GLS07   | Guasave   | 25             |           | ZI 05   | 12.5           | Ahome     |           |
| GSI01   | Guasave   | 15             |           | ZI 06   | 45             | Ahome     | $\gamma$  |
| GSI02   | Guasave   | 32.5           |           |         |                |           |           |

$\beta$  = hemólisis total,  $\alpha$  = hemólisis parcial,  $\gamma$  = no hemolítica. /  $\beta$  = total hemolysis,  $\alpha$  = partial hemolysis,  $\gamma$  = no hemolysis.

pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002), seis presentaron hemólisis total ( $\beta$ ), dos hemólisis parcial ( $\alpha$ ) y seis resultaron no hemolíticas ( $\gamma$ ) (Cuadro 1).

Los tres aislados, no hemolíticos, con mejor porcentaje de inhibición *in planta*, correspondieron a *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06)

against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, where an effect was observed *in vitro*, although its efficiency *in vivo* did not manifest itself (Elsherif and Grossmann, 1994).

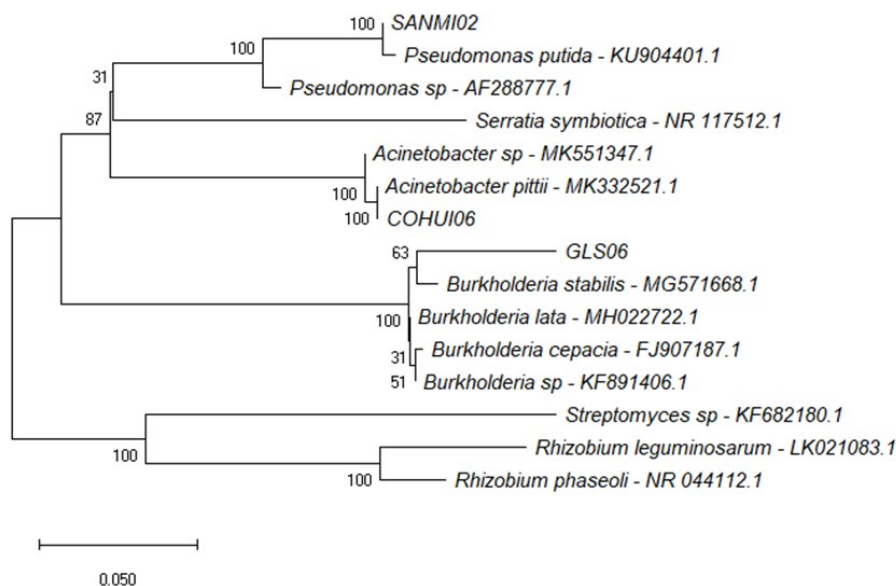
The potential of the microorganisms to produce antimicrobial compounds *in vitro* is not always correlated with results *in situ*, since the availability

(Figura 1). Para la evaluación *in planta*, las plantas originadas de las semillas tratadas con *Burkholderia* sp. mostraron incidencia y severidad de 40 y 50%, respectivamente (Cuadro 2), mientras que las plantas donde se utilizaron *P. putida* y *A. pittii*, aun cuando mostraron inhibición del crecimiento *in vitro*, éstas no ejercieron control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero, pues los índices de severidad fueron similares a los de las plantas testigo inoculadas sólo con el patógeno (Cuadro 2). Esto sugiere que los resultados de los efectos de antagonismo observados *in vitro* no siempre correlacionan con los resultados observados *in planta*, como ocurre con *Pseudomonas fluorescentes* contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, donde se observó efecto *in vitro*, pero su eficacia *in vivo* no se manifestó (Elsharif y Grossmann, 1994).

El potencial de los microorganismos para producir compuestos antimicrobianos *in vitro* varía con respecto a lo que ocurre *in situ*; esto debido a

of nutrients for bacteria is greater in the artificial medium than in the rhizosphere (Köhl *et al.*, 2019). Therefore, the metabolites *in vitro* may not be expressed *in situ* or have a reduced effect (Hennessy *et al.*, 2017). Additionally, the *in vitro* antagonism experiments without any contact with the plant exclude other modes of bacterial action, such as the ability to induce systemic resistance (Köhl *et al.*, 2019), and therefore, we cannot discard the possibility that isolations that showed no antagonism *in vitro* can induce other action mechanisms against *S. rolfsii* in the plant.

Species of both *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera have been proposed as plant growth promoters due to their ability to solubilize phosphate, produce indole acetic acid, fixate nitrogen and produce siderophores (Daur *et al.*, 2018; Qessaoui *et al.*, 2019). *A. pittii* JD-14 is efficient for increasing growth, fresh and dry weight in alfalfa (Daur *et al.*, 2018); the strain evaluated



**Figura 1. Relación filogenética de los aislados COHUI 06, SANMI 02 y GLS 06 basada en la secuencia del gen 16S rARN y comparada con secuencias de la base de datos de GenBank en NCBI.**

**Figure 1. Phylogenetic relation of isolations COHUI 06, SANMI 02 and GLS 06, based on the sequence of the gene 16S rRNA and compared with sequences from the GenBank data base in the NCBI.**



**Cuadro 2. Efecto de las cepas bacterianas en la incidencia y severidad del tizón sureño (*S. rolfsii*) en plantas de frijol bajo condiciones de invernadero.**  
**Table 2. Effect of the bacterial strains on the incidence and severity of southern blight (*S. rolfsii*) on bean plants under greenhouse conditions.**

| Tratamiento | Incidencia |                | Severidad |                    |
|-------------|------------|----------------|-----------|--------------------|
|             | (%)        | Escala 0-4 (%) | Mediana   | Rango              |
| CTRL        | 0          | 0.0 (0)        | 0.0       | 22.5a <sup>z</sup> |
| COHUI 06    | 0          | 0.0 (0)        | 0.0       | 22.5a              |
| COHUI 06+SR | 100        | 3.6 (90)       | 100       | 62.3bc             |
| GLS 06      | 0          | 0.0 (0)        | 0.0       | 22.5a              |
| GLS 06+SR   | 60         | 1.7 (43)       | 37.5      | 42.7ab             |
| SANMI 02    | 0          | 0.0 (0)        | 0.0       | 22.5a              |
| SANMI 02+SR | 100        | 4.0 (100)      | 100       | 65.5c              |
| SR          | 100        | 3.7 (93)       | 100       | 63.5c              |

<sup>z</sup>Letras diferentes, por columnas, indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ),  $n = 10$ . CTRL (sin bacteria, sin *S. rolfsii*), COHUI 06 (solo bacteria COHUI 06), COHUI 06 + Sr (bacteria COHUI 06 + *S. rolfsii*), GLS 06 (solo bacteria GLS 06), GLS 06 + Sr (bacteria GLS 06 + *S. rolfsii*), SANMI 02 (solo bacteria SANMI 02), SANMI 02 + Sr (bacteria SANMI 02 + *S. rolfsii*) y Sr (solo *S. rolfsii*). / <sup>z</sup>Different letters in each column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ),  $n = 10$ . CTRL (without bacteria, without *S. rolfsii*), COHUI 06 (only COHUI 06 bacteria), COHUI 06 + Sr (COHUI 06 bacteria + *S. rolfsii*), GLS 06 (only GLS 06 bacteria), GLS 06 + Sr (GLS 06 bacteria + *S. rolfsii*), SANMI 02 (only SANMI 02 bacteria), SANMI 02 + Sr (SANMI 02 bacteria + *S. rolfsii*) and Sr (only *S. rolfsii*).

que la disponibilidad de nutrientes para las bacterias es mayor en el medio artificial que en la rizósfera (Köhl *et al.*, 2019). Por lo que los metabolitos producidos *in vitro* pueden no expresarse *in situ* o tienen una función menor (Hennessy *et al.*, 2017). Además, los experimentos de antagonismo *in vitro* sin ningún contacto con la planta excluyen otros modos de acción bacteriana, por ejemplo, la capacidad de inducir resistencia sistémica (Köhl *et al.*, 2019) por lo que no se descarta la posibilidad de que los aislados que no mostraron antagonismo *in vitro* puedan inducir otros mecanismos de acción contra *S. rolfsii* en la planta.

Tanto especies del género *Pseudomonas* como de *Acinetobacter* se han propuesto como promotoras del crecimiento vegetal por la capacidad para solubilizar fosfato, producir ácido indol acético, fijar nitrógeno y producir sideróforos (Daur *et al.*, 2018; Qessaoui *et al.*, 2019). *A. pittii* JD-14 es eficaz para aumentar el crecimiento, y el peso fresco y

in the present study promoted the increase of the dry weight of the root (data not shown). *P. putida* showed no growth promotion in the common bean variety included (data not shown).

Species of *Acinetobacter* have been reported as antagonists of fungal pathogens. *Acinetobacter* sp. (5H2) and *A. lwoffii* (A5) inhibited 69.4 and 62.7% respectively, and *in vitro* growth of *Corynespora cassicola* and significantly reduced the severity of the pathogen in *Hibiscus sabdariffa* (Patricio-Hernández *et al.*, 2020). The species *A. pittii* evaluated in this investigation was not efficient in controlling *S. rolfsii* in planta.

The *Burkholderia* has a complex taxonomy and is a dominant genus in the microbiota of the rhizosphere. The group *B. cepacia* includes plant growth-promoting species and phytopathogen control agents (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019); *B. contaminans* UFLA02-27 has been isolated from common bean plants and

seco en alfalfa (Daur *et al.*, 2018), la cepa evaluada en el presente estudio promovió aumento del peso seco de la raíz (dato no mostrado). En el caso de *P. putida* no mostró promoción de crecimiento en la variedad de frijol evaluada (dato no mostrado).

Especies de *Acinetobacter* se han reportado como antagonistas de patógenos de hongos. *Acinetobacter* sp. (5H2) y *A. lwoffii* (A5) inhibieron 69.4 y 62.7% respectivamente, el crecimiento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* y redujeron significativamente la severidad del patógeno en *Hibiscus sabdariffa* (Patricio-Hernández *et al.*, 2020). La especie *A. pittii* evaluada en esta investigación no fue eficiente para el control de *S. rolfsii* *in planta*.

El género *Burkholderia*, de taxonomía compleja, es uno de los dominantes en la microbiota de la rizósfera. El grupo *B. cepacia*, incluye especies promotoras del crecimiento vegetal y agentes de control de fitopatógenos (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019); en frijol se ha aislado y evaluado *B. contaminans* UFLA02-27, esta cepa es capaz de solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y presenta antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Da Silva *et al.*, 2012). Especies de este grupo tienen potencial biotecnológico en la agricultura porque producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas y compuestos bioactivos pero su uso es restringido por los riesgos que representan como patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

*Burkholderia* sp. (cepa GLS06), la cual resultó no hemolítica (Cuadro 1), comparte alrededor del 95% de homología con secuencias del gen 16S de especies del grupo de *B. cepacia* (GenBank: MG571668.1, MH022722.1, FJ907187.1); se ha reportado que la homología del gen 16S de las especies del grupo *B. cepacia* es alta (>97.5%) (Da Silva *et al.*, 2012), nuestro análisis limita al aislado

evaluado. This strain can solubilize phosphate, fix nitrogen, and it antagonizes *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Da Silva *et al.*, 2012). Species of this group have a biotechnological potential in agriculture, since they produce a variety of hydrolytic enzymes and bioactive compounds, but their use is restricted, due to the risks they pose as opportunist pathogens in immunocompromised people (Eberl and Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

*Burkholderia* sp. (strain GLS06), which resulted to be non-hemolytic (Table 1), shares around 95% of homology with sequences of gene 16S of species of the group of *B. cepacia* (GenBank: MG571668.1, MH022722.1, FJ907187.1); the homology of gene 16S of the species of group *B. cepacia* is high (>97.5%) (Da Silva *et al.*, 2012). Our analysis limits the isolate isolation GLS06 at genus level; concatenated analysis is required, with different markers to determine the species.

*Burkholderia* sp. (GLS06), isolated from rhizosphere samples obtained in Guasave, Sinaloa, Mexico, displayed potential in the control of southern blight of common bean caused by *S. rolfsii*, which justifies future studies at an intermediate level and on the field to determine its potential as a biocontrol agent in an integrated disease management system, in strict adherence to ethical criteria related to care for human health and the environment.

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

GLS06 a nivel género; se requiere de análisis concatenado con distintos marcadores para determinar la especie.

*Burkholderia* sp. (GLS06) aislada de muestras de rizósfera de frijol colectadas en Guasave, Sinaloa, México, mostró potencial en el control de la

putrición sureña del frijol causada por *S. rolfsii*, lo que justifica estudios futuros a nivel invernadero y campo para determinar su potencial como agente de biocontrol en un sistema de manejo integrado de la enfermedad, esto en estricto apego a los criterios éticos relativos al cuidado de la salud humana y el ambiente.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Occidente (PIFIP-2019) y al Instituto Politécnico Nacional (SIP 20196294) por apoyar parte de esta investigación. FCA e YJBA a la beca CONACyT 634315 y 706421, respectivamente.

#### LITERATURA CITADA

- Da Silva K, Cassetari AES, Lima AS, de Brandt E, Pinnock E, Vandamme P and Moreira FM. 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology* 35(4):253-262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>.
- Daur I, Saad MM, Eida A A, Ahmad S, Shah ZH, Ihsan MZ, Muhammad Y, Sohrab SS and Hirt H. 2018. Boosting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) production with rhizobacteria from various plants in Saudi Arabia. *Frontiers in microbiology* 9: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00477>.
- Eberl L and Vandamme P. 2016. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research* 5:1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>.
- Elsherif M and Grossmann F. 1994. Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiological Research* 149(4): 371-377. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80084-4).
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00550-1>.
- Forbes BA, Sahn DF and Weissfeld AS. 2002. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 11<sup>th</sup> Ed. Mosby, St. Louis, MO. 1136 p
- Gholami M, Ebrahimi A, Mozafari J, Bihanta MR and Rahaie M. 2019. Phenotypic and genotypic screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces for resistance to collar rot fungus (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) in North of Iran. *Journal of Plant Pathology* 102: 67-78. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00373-9>.
- Hennessy R C, Glaring MA, Olsson S and Stougaard P. 2017. Transcriptomic profiling of microbe-microbe interactions reveals the specific response of the biocontrol strain *P. fluorescens* In5 to the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *BMC research notes* 10: 376. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2704-8>.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg W J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science* 10: 845-845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.
- Kumar DDP, Thenmozhi R, Anupama PD, Nagasathya A, Thajuddin N and Paneerselvam A. 2011. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Research Journal of Biological Sciences* 6(10): 523-531. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2011.523.531>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Moreno B and Acevedo R. 2002. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Rev Iberoam Micol* 19: 115-119. <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/115119.pdf>
- Nandi S, Hembaram S, Adhikari A, Tiwari BK and Dutta S. 2017. Host infection beyond the traditional range of *Sclerotium (Athelia) rolfsii* with *Physalis minima*. *Bioinformatics* 13(10):333-338. <https://doi.org/10.6026/97320630013333>.
- Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J. 2020. Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 450-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-1>.
- Qessaoui R, Bouharrou R, Furze JN, El Aalaoui M, Akroud H, Amarrague A, Van Vaerenbergh J, Tahzima R, Mayad EH and Chebli B. 2019. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. *Scientific Reports* 9: 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>.
- Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA and Estrada-de los Santos P. 2019. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* 51(1): 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>.
- 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>.
- 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>.

- Volpiano CG, Lisboa BB, São José JFB, de Oliveira AMR, Beneduzi A, Passaglia LMP and Vargas LK. 2018. *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium (Athelia) rolfsii* on the common bean. *Plant and Soil* 432: 229-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3799-y>.
- White TJ, Bruns TS, 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. 1990p.
- Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, Casals C, Marín S, Solsona S and Teixidó N. 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology* 21(4): 409-426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>.

# Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus Liberibacter* spp., causal agents of HLB

## Filogenia de la enzima ATP/ADP translocasa de *Candidatus Liberibacter* spp., agentes causales del HLB

Felipe Roberto Flores-de la Rosa\*, Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera, Ricardo Santillán-Mendoza. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Ixtacuaco. Km 4.5 carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan. Tlapacoyan, Veracruz. CP. 93650. \*Autor para correspondencia: flores.felipe@inifap.gob.mx

Recibido: 01 de Septiembre, 2020.

Aceptado: 06 de Noviembre, 2020.

Flores-de la Rosa FR, Rodríguez-Quibrera CG and Santillán-Mendoza R. 2021. Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus Liberibacter* spp., causal agents of HLB. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 219-227.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-1>

Primera publicación en línea: 11 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 11, 2020.

**Resumen.** Las bacterias causantes del huanglongbing (HLB), *Candidatus Liberibacter* spp., son bacterias obligadas al floema de los cítricos y a diferentes sistemas del insecto vector, *Diaphorina citri*, por lo tanto, el enfoque genómico ha sido útil para estudiar sus mecanismos de patogenicidad. Dicho enfoque ha permitido identificar una copia homóloga del gen codificante de la enzima ATP/ADP translocasa, la cual tiene la capacidad de importar ATP y nucleótidos desde el hospedante, causando un parasitismo de energía considerable.

**Abstract.** The bacteria that cause citrus huanglongbing (HLB), *Candidatus Liberibacter* spp., are obligate bacteria to the citrus phloem and to different systems of the vector insect, *Diaphorina citri*, therefore, the genomic approach has been useful to study its pathogenicity mechanisms. This approach has allowed the identification of a homologous copy of the gene coding for the enzyme ATP / ADP translocase, which has the ability to import ATP and nucleotides from the host, causing considerable energy parasitism. This enzyme has been related to the endoparasitic activity of animal and human pathogens more than to phytopathogens. The present work analyzed the evolutionary relationship between the amino acid sequence of ATP / ADP translocase between different species of *Ca. Liberibacter* and groups such as *Rickettsia* sp. and *Chlamydia* sp. Phylogenetic analyzes show that the variation in the sequence of the gene coding for the enzyme is delimited in clades corresponding to the species of *Ca. Liberibacter*, suggesting that the variation



Esta enzima se ha relacionado con la actividad endoparasítica de patógenos animales y humanos más que con fitopatógenos. El presente trabajo analizó la relación evolutiva entre la secuencia de aminoácidos de la ATP/ADP translocasa entre diferentes especies de *Ca. Liberibacter* y grupos como *Rickettsia* sp. y *Chlamydia* sp. Análisis filogenéticos muestran que la variación en la secuencia del gen codificante de la enzima está delimitada en clados correspondientes a las especies de *Ca. Liberibacter*, sugiriendo que la variación en la enzima responde a un proceso coevolutivo con los hospederos. Asimismo, la filogenia muestra que el ancestro común más cercano a *Ca. Liberibacter* podría ser un endosimbionte no patológico del género *Ca. Midichloria*. Análisis de conservación de la secuencia de aminoácidos muestran que existen varias posiciones en la secuencia que podrían estar relacionadas con la variación específica de esta enzima dentro de *Ca. Liberibacter*. Este trabajo presenta la hipótesis de que el origen evolutivo de la capacidad de parasitismo energético del género *Ca. Liberibacter*, causantes del HLB, es un endosimbionte no patológico.

**Palabras clave:** Coevolución, parasitismo de energía, Dragón Amarillo

El Huanglongbing (HLB) es considerada, actualmente, la enfermedad de mayor importancia a nivel mundial en la producción citrícola, ya que causa la muerte de los árboles algunos años posterior a la infección, además de que, a la fecha, no existe ningún método de control efectivo y económicamente viable, así como tampoco variedades resistentes al alcance del productor. Se relaciona a la enfermedad con la infección de bacterias del género *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*), así, se ha observado que el HLB es causado por *Ca. L. africanus* en Sudáfrica

in the enzyme responds to a co-evolutionary process. Also, the phylogeny shows that the closest common ancestor to *Ca. Liberibacter* could be a non-pathogenic endosymbiont of the genus *Ca. Midichloria*. Amino acid sequence conservation analysis shows that there are several positions in the sequence that could be related to species variation. The present work offers the hypothesis that the evolutionary origin of the energy parasitism capacity of the causal agents of HLB is a non-pathogenic endosymbiont.

**Key words:** coevolution, energy parasitism, citrus greening

Huanglongbing (HLB) is currently considered the most important disease that affects citrus production worldwide, since it causes trees to die a few years after infection, and because, up to now, there are no effective and economically viable methods for controlling it nor resistant varieties accessible to citrus producers. The disease is associated with infection produced by bacteria of the genus *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*), so, it has been observed that HLB is caused by *Ca. L. africanus* in South Africa (Roberts and Pietersen, 2017), by *Ca. L. americanus* in Brazil (Wulff *et al.*, 2014), and more extensively by *Ca. L. asiaticus*, for example, in the United States of America (Manjunath *et al.*, 2008) and Mexico (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). These bacteria are obligate pathogens in citrus phloem and endosymbionts in different systems of their vector, *Diaphorina citri* (Pelz-Stelinski and Killiny, 2016; Killiny *et al.*, 2018), and for this reason obtaining axenic crops is very complex and hinders pathological studies (Ha *et al.*, 2019; Merfa *et al.*, 2019). In order to understand the molecular mechanisms that favor the development of HLB, the genome of several

(Roberts y Pietersen, 2017), por *Ca. L. americanus* en Brasil (Wulff *et al.*, 2014) y más extensamente por *Ca. L. asiaticus*, por ejemplo en Estados Unidos de América (Manjunath *et al.*, 2008) y México (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Estas bacterias son patógenos obligados en el floema de los cítricos y endosimbiontes en diferentes sistemas de su vector, *Diaphorina citri* (Pelz-Stelinski y Killiny, 2016; Killiny *et al.*, 2018), por lo cual la obtención de cultivos axénicos es muy compleja y dificulta los estudios de patología (Ha *et al.*, 2019; Merfa *et al.*, 2019). En aras de comprender los mecanismos moleculares que permiten el desarrollo del HLB, se ha secuenciado el genoma de varias especies de *Ca. Liberibacter* spp. (Duan *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Fagen *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014, 2015; Cai *et al.*, 2018). Esto ha permitido descubrir genes con alto potencial de patogenicidad en la interacción con la planta. Por ejemplo, Vahling *et al.* (2010) detectaron la presencia de un gen codificante para una enzima ATP/ADP translocasa funcional y con alta afinidad al ATP y ADP, lo cual resulta importante ya que se ha documentado que una de las respuestas de las plantas a la infección por HLB es la acumulación excesiva de ATP (Pitino *et al.*, 2017). Esta enzima ha sido ampliamente relacionada con endosimbiontes intracelulares obligados, la cual tiene la capacidad de obtener ATP desde la célula del hospedante e importarlo dentro de su propia célula. Este mecanismo se conoce como parasitismo energético (Schmitz-Esser *et al.*, 2004). Lo anterior resulta especialmente de interés debido a que previamente no se conocía este tipo de habilidades parasitarias en fitopatógenos, sino únicamente en patógenos humanos y de animales (Trentmann *et al.*, 2007). La historia evolutiva de esta característica patogénica sugiere que el origen de este gen proviene de un endosimbionte ancestro al actual grupo de Rickettsiales que, tentativamente, se mueve de forma horizontal entre otros grupos de patógenos obligados (Emelyanov, 2007).

*Ca. Liberibacter* spp. species has been sequenced (Duan *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Fagen *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014, 2015; Cai *et al.*, 2018). This has led to the discovery of genes with high pathogenic potential in the interaction with plants. For example, Vahling *et al.* (2010) detected the presence of an encoding gene for an ATP/ADP functional translocase enzyme and with great affinity to ATP and ADP, which is important because it has been documented that one of the plant responses to HLB infection is the excessive accumulation of ATP (Pitino *et al.*, 2017). This enzyme has been widely related to obligate intracellular endosymbionts, for it has the capacity of obtaining ATP from the host's cell and import it into its own cell. This mechanism is known as energetic parasitism (Schmitz-Esser *et al.*, 2004). This is especially interesting because this type of parasitic abilities was not previously known in plant pathogens but only in human and animal pathogens (Trentmann *et al.*, 2007). The evolutionary history of this pathogenic trait suggests that the gene originates from an endosymbiont ancestor of the current Rickettsiales group which, tentatively, moves horizontally among other groups of obligate pathogens (Emelyanov, 2007).

The objective of this study was to analyze the evolutionary relationships among ATP/ADP translocase genes of different human and animal pathogens and endosymbionts, as well as those found in the genus *Ca. Liberibacter*, including the pathogens that cause HLB in citrus. For this, using the amino acids sequence reported by Vahling *et al.* (2010) as a base, a BLASTp analysis was conducted to identify the protein sequences with the greatest similarity, according to an e-value <0.001 and 90% identity in the Genbank database, belonging to *Ca. Liberibacter* and groups such as *Rickettsia* spp. and *Chlamydia* spp.

Once the amino acid sequences were obtained, a multiple alignment was done using the ClustalW

El presente trabajo tiene como objetivo analizar las relaciones evolutivas entre genes ATP/ADP translocasa de diferentes patógenos y endosimbiontes humanos y animales y los encontrados en el género *Ca. Liberibacter*, incluyendo los patógenos causantes del HLB de los cítricos. Para esto, utilizando como base la secuencia de aminoácidos reportada por Vahling *et al.* (2010), se realizó un análisis BLASTp para identificar las secuencias proteicas con mayor similitud de acuerdo a un *e-value* <0.001 y un porcentaje de identidad >90% en la base de datos del Genbank pertenecientes a *Ca. Liberibacter* y a grupos como *Rickettsia* spp. y *Chlamydia* spp.

Una vez obtenidas las secuencias de aminoácidos se realizó un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo ClustalW (gap open=15; gap extend=3) mediante el software Bioedit (Hall, 1999). Posteriormente, una búsqueda del árbol filogenético óptimo mediante el criterio de la Máxima Parsimonia, para lo cual se utilizó el software T.N.T. (Goloboff *et al.*, 2008), para esto se utilizó una búsqueda mediante algoritmos compuestos (ratchet + sectorial search + drift) y se construyó un árbol consenso estricto. Se realizó un remuestreo mediante bootstrap (1000 iteraciones) utilizando las opciones ofrecidas por el software. En seguida, se elaboró un análisis de conservación entre las secuencias de aminoácidos de la enzima en estudio. Para esto, el alineamiento fue analizado para determinar la conservación por sitios específicos mediante el software Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009), adicionalmente se realizó un análisis de entropía posicional mediante la función:

$$H_{(x)} = - \sum f(b;l) \ln(f(b;l))$$

Dónde  $f(b;l)$  es la frecuencia con que cada aminoácido aparece en cada columna, siendo mínima cuando la posición está totalmente conservada y

algorithm (gap open=15; gap extend=3) and the Bioedit software (Hall, 1999). Then, the optimal phylogenetic tree was determined by applying the Maximum Parsimony criterion and T.N.T. software (Goloboff *et al.*, 2008); for this, a search was conducted using compound algorithms (ratchet + sectorial search + drift), and a strict consensus tree was built. A bootstrap resampling (1000 iterations) was performed using the software options. Then, a conservation analysis among the amino acid sequences of the studied enzyme was done. In this case, the alignment was analyzed in order to determine conservation in specific sites using Jalview software (Waterhouse *et al.*, 2009); a positional entropy analysis was also conducted using the function:

$$H_{(x)} = - \sum f(b;l) \ln(f(b;l))$$

Where  $f(b;l)$  is the frequency with which each amino acid appears in each column: the frequency is minimum when the position is totally conserved and maximum when all the amino acids are equally represented. The analysis was conducted using Bioedit software.

A total of 39 sequences of the ATP/ADP translocase enzyme were used to root the phylogenetic tree, and the sequence of the ATP/ADP translocase enzyme of *Arabidopsis thaliana* plastids (Genbank CAA89201) was added as an external group. The phylogenetic analysis made it possible to recover eight equally parsimonious trees (L=2502) with which a strict consensus tree was built (Figure 1). The results of the analysis show that all the *Ca. Liberibacter* spp. sequences are clustered in a single clade (highlighted in blue); this clade matches with the enzyme coming from the *Candidatus* Midichloria mitochondrii endosymbiont, which is associated with ticks

máxima cuando todos los aminoácidos están igualmente representados. El análisis fue realizado en el software Bioedit.

Se utilizaron en total 39 secuencias de la enzima ATP/ADP translocasa, como grupo externo para enraizar el árbol filogenético, se incorporó la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa de plastidios de *Arabidopsis thaliana* (Genbank CAA89201). El análisis filogenético permitió recuperar ocho árboles igualmente parsimoniosos (L=2502), con los cuales se construyó un árbol de consenso estricto (Figura 1). Los resultados del análisis muestran que todas las secuencias provenientes de *Ca. Liberibacter* spp. se aglomeran en un solo clado (remarcado en azul), este clado es grupo hermana con la enzima proveniente del endosimbionte *Candidatus* Midichloria mitochondrii, asociado a las garrapatas causantes de diversas enfermedades alrededor del mundo, la cual tiene una característica interesante al ser una bacteria patógena intramitocondrial (Sassera *et al.*, 2006).

Es destacable que, dentro del clado antes mencionado, se ubican subclados bien definidos y con soporte bootstrap alto de acuerdo a cada especie del género. El ancestro hipotético basal del clado se comparte entre *Candidatus* Midichloria mitochondrii y *Ca. Liberibacter* aeuropaeus, esto resulta de interés ya que ambos organismos son considerados endosimbiontes no patogénicos en garrapatas (Najm *et al.*, 2012) y en perales (Raddadi *et al.*, 2011; Camerota *et al.*, 2012), respectivamente. Los subclados de *Ca. Liberibacter* americanus y *Ca. Liberibacter* africanus se encuentran igualmente bien definidos, los cuales son agentes patógenos causantes de HLB en Brasil (do Carmo Teixeira *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2008) y en África (Lin *et al.*, 2006). Igualmente, la presencia de *Ca. L. solanacearum* y *Ca. L. asiaticus* como subclados bien definidos y soportados permite plantear dos hipótesis: a) la capacidad patogénica de algunas especies de

responsable for causing different diseases worldwide and has an interesting characteristic because it is an intramitochondrial pathogenic bacterium (Sassera *et al.*, 2006).

It is worth noting that within the previously mentioned clade there are well defined subclades with a high bootstrap support according to each species of the genus. The hypothetical basal ancestor of the clade is shared between *Candidatus* Midichloria mitochondrii and *Ca. Liberibacter* aeuropaeus, which is interesting because both organisms are considered to be non-pathogenic endosymbionts in ticks (Najm *et al.*, 2012) and pear trees (Raddadi *et al.*, 2011; Camerota *et al.*, 2012), respectively. *Ca. Liberibacter* americanus and *Ca. Liberibacter* africanus clades are well defined too; they are pathogenic agents causing HLB in Brazil (do Carmo Teixeira *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2008) and Africa (Lin *et al.*, 2006). Likewise, based on the presence of *Ca. L. solanacearum* and *Ca. L. asiaticus* as well-defined and supported subclades, it is possible to propose two hypotheses: a) the pathogenic capacity of some *Ca. Liberibacter* species may have developed in a non-pathogenic endophytic ancestor, given that *Ca. L. aeuropaeus* is very basal within the *Ca. Liberibacter* clade, and b) the clades that are well defined by species suggest that their pathogenicity coevolved with the hosts.

The sequences of the *Ca. Liberibacter* clade show a high level of conservation in some regions, and the reason associated with ATP transportation is intact in all of them (data not shown). However, some regions are highly variable, following a pattern depending on the species to which the sequence of the enzyme belongs, which could produce a change in the structural dynamics and the protein function (Liu and Bahar, 2012). Figure 2A shows the sites with the highest level of conservation and those that have the highest variability according

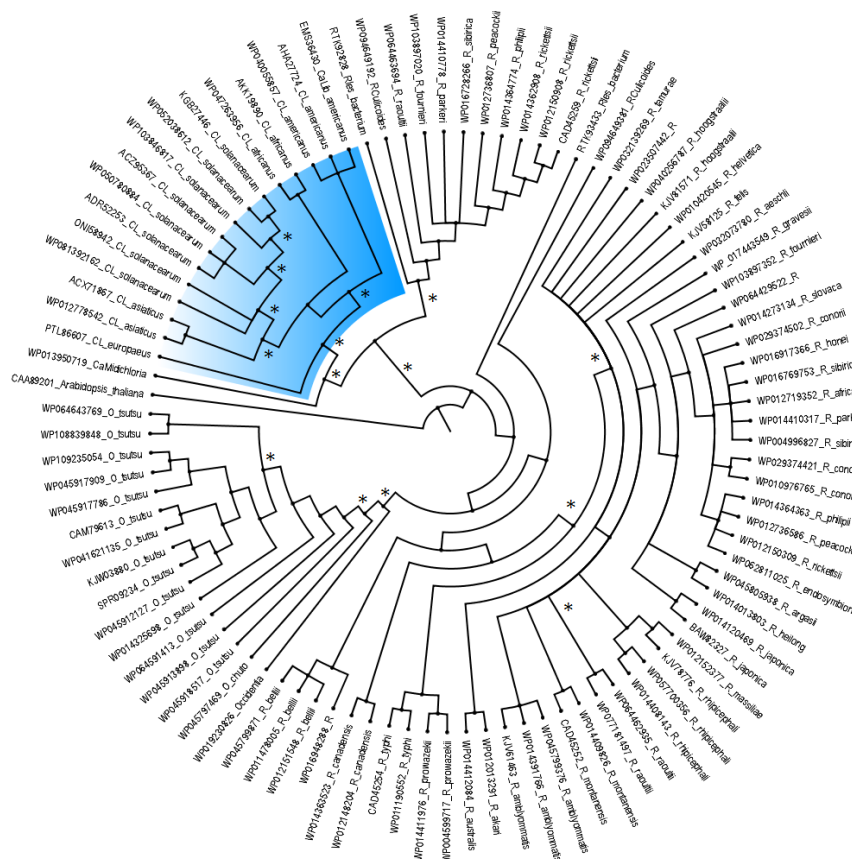


Figura 1. Análisis filogenético de la enzima ATP/ADP translocasa. Se muestra el árbol consenso de ocho árboles igualmente parsimoniosos (L=2502). El clado generado de las especies de *Ca. Liberibacter* está resaltado en azul. Los nodos marcados con un asterisco muestran soporte 100% mediante Bootstrap (1000 réplicas). El nombre de cada terminal del árbol está compuesto por el número de acceso a Genbank, seguido por la inicial del género y la especie. Abreviaciones de los géneros: CL o CaLib= *Candidatus Liberibacter*, R=*Rickettsia*, O=*Orientia*.

Figure 1. Phylogenetic analysis of the ATP/ADP translocase enzyme. It shows a consensus tree of eight equally parsimonious trees (L=2502). The *Ca. Liberibacter* clade is highlighted in blue. The nodes with an asterisk show 100% support using Bootstrap (1000 copies). The name of each tree terminal is made up of the access number to the Genbank followed by the initial of the genus and the species. Abbreviations of the genera: CL or CaLib= *Candidatus Liberibacter*, R=*Rickettsia*, O=*Orientia*.

*Ca. Liberibacter* pudo haber sido desarrollada en un ancestro endófito no patogénico, esto debido a que *Ca. L. europaeus* es muy basal dentro del clado de los *Ca. Liberibacter* y b) los subclados bien definidos por especie sugieren una coevolución de la patogenicidad con los hospederos.

Las secuencias del clado *Ca. Liberibacter* muestran un alto grado de conservación en algunas regiones, y el motivo relacionado con el transporte

to the alignment frequency. The entropy analysis (Figure 2B) shows that several positions of the ATP/ADP translocase enzyme sequence have an entropic level that suggests high variability in other possible sequences, and for this reason, if new species are found in *Ca. Liberibacter* with non-reported hosts, the sequence variation could be specific to each host. A thorough study of the function and evolution of this gene will provide a



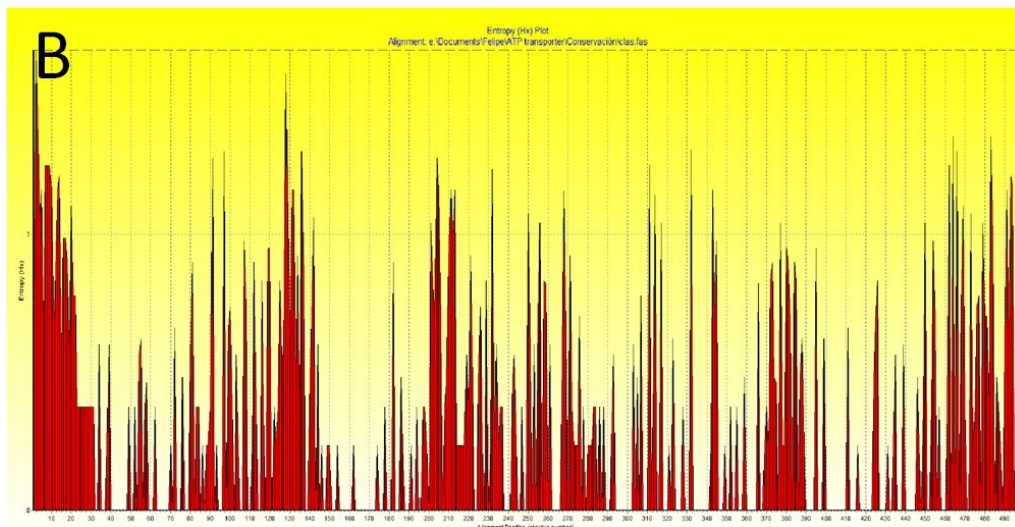
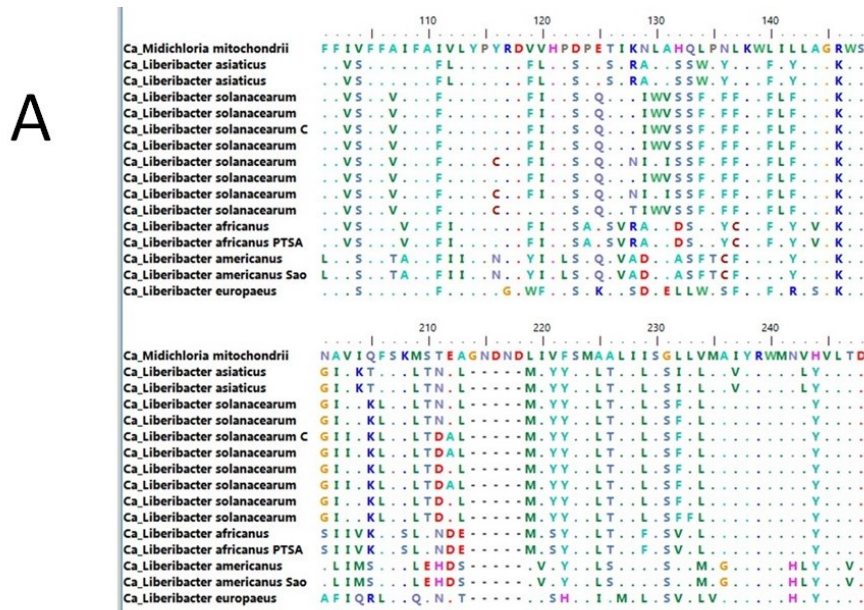


Figura 2. A) Fragmento del alineamiento de secuencias de aminoácidos de la enzima ATP/ADP translocasa. Se muestra la variabilidad aminoacídica en cada especie de *Ca. Liberibacter* con respecto a la secuencia de *Ca. Midichloria mitochondrii*. B) Entropía de las posiciones de cada aminoácido en la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa de *Ca. Liberibacter*. Eje X= Posición de aminoácido, eje Y= Entropía de cada posición.

Figure 2. Figure 2. A) Fragment of the alignment of amino acid sequences of the ATP/ADP translocase enzyme. Amino acidic variability of each *Ca. Liberibacter* species compared to the sequence of *Ca. Midichloria mitochondrii*. B) Entropy of the positions of each amino acid in the sequence of the *Ca. Liberibacter* ATP/ADP translocase enzyme. Axis X= Position of the amino acid, axis Y= Entropy of each position.

de ATP se encuentra intacto en todas ellas (datos no mostrados). Sin embargo, algunas regiones son altamente variables, siguiendo un patrón de acuerdo a la especie a que pertenece la secuencia de la enzima, lo cual podría generar un cambio en la dinámica estructural y en la función de la proteína (Liu y Bahar, 2012). En la Figura 2A se muestran los sitios con mayor nivel de conservación y los que presentan una mayor variabilidad de acuerdo a la frecuencia en el alineamiento. El análisis de entropía (Figura 2B) demuestra que varias posiciones de la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa contiene un nivel entrópico que sugiere una alta variabilidad en otras posibles secuencias, por tanto, de encontrarse nuevas especies dentro de *Ca. Liberibacter* con hospederos no reportados, la variación en las secuencias podría ser específicas a cada hospedero. Ahondar en el estudio de la función y la evolución de este gen permitirá comprender mejor los mecanismos por los cuales se genera el daño en la planta durante el desarrollo del HLB y coadyuvar al desarrollo de posibles estrategias de control de la enfermedad. Los resultados presentados en este estudio sugieren que la capacidad de parasitar ATP que tiene *Ca. Liberibacter* spp. es una característica compartida con endosimbiontes y endopatógenos; sin embargo, la secuencia de la enzima responsable por este parasitismo varía de acuerdo a cada especie dentro del género lo que sugiere eventos de coevolución del parasitismo con el hospedante.

## LITERATURA CITADA

- Cai W, Yan Z, Rascoe J and Stulberg MJ. 2018. Draft Whole-Genome Sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Strain TX1712 from Citrus in Texas. *Genome Announcements* 6(25):1–2. <https://doi.org/10.1128/genomea.00554-18>.
- Camerota C, Raddadi N, Pizzinat A, Gonella E, Crotti E, Tedeschi R, Mozes-Daube N, Ember I, Acs Z, Kolber M, Zchori-Fein E, Daffonchio D and Alma A. 2012. Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter europaeus*’ and phytoplasmas in *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants. *Phytoparasitica* 40:213–221. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0225-5>.
- do Carmo Teixeira D, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ and Bové J. 2005. “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(5):1857–1862. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>.
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Obtained Through Metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:1011–1020. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- Emelyanov VV. 2007. Suggested mitochondrial ancestry of nonmitochondrial ATP/ADP carrier. *Molecular Biology* 41(1):52–62. <https://doi.org/10.1134/s0026893307010086>.
- Fagen JR, Leonard MT, McCullough CM, Edirisinghe JN, Henry CS, Davis MJ and Triplett EW. 2014. Comparative genomics of cultured and uncultured strains suggests genes essential for free-living growth of *Liberibacter*. *PLoS One* 9:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084469>.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:195–210. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>.
- Goloboff P, Farris JS and Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24:774–786. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>

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

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Lin H, Han CS, Liu B, Lou B, Bai X, Deng C, Civerolo EL and Gupta G. 2013. Complete Genome Sequence of a Chinese Strain of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Genome Announcements* 1(2):e00184-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00184-13>.
- Lin H, Pietersen G, Han C, Read DR, Lou B, Gupta G and Civerolo E. 2006. Complete genome sequence of “*Candidatus Liberibacter africanus*,” a bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Genome Announcements* 3:3–4. <https://doi.org/10.13406/j.cnki.cyx.2006.06.005>.
- Liu Y and Bahar I. 2012. Sequence evolution correlates with structural dynamics. *Molecular Biology and Evolution* 29:2253–2263. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss097>.
- Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S and Lee RF. 2008. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98:387–396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0387>
- Merfa M V, Pérez-López E, Naranjo E, Jain M, Gabriel DW and De La Fuente L. 2019. Progress and obstacles in culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 109(7):1092–1101 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW>
- Najm N-A, Silaghi C, Bell-Sakyi L, Pfister K and Passos LMF. 2012. Detection of bacteria related to *Candidatus Midichloria mitochondrii* in tick cell lines. *Parasitology Research* 110:437–442. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2509-y>.
- Pelz-Stelinski KS and Killiny N. 2016. Better Together: Association with “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*” increases the reproductive fitness of its insect vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Annals of the Entomological Society of America* 109(3):371–376. <https://doi.org/10.1093/asesa/saw007>
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. *Horticulture Research* 4: 17040. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Raddadi N, Gonella E, Camerota C, Pizzinat A, Tedeschi R, Crotti E, Mandrioli M, Attilio Bianco P, Daffonchio D and Alma A. 2011. ‘*Candidatus Liberibacter europaeus*’ sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology* 13:414–426. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x>
- Roberts R and Pietersen G. 2017. A novel subspecies of ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ found on native *Teclea gerrardii* (Family: Rutaceae) from South Africa. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:437–444. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0799-x>
- Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M and Lo N. 2006. “*Candidatus Midichloria mitochondrii*”, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2535–2540. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64386-0>.
- Schmitz-Esser S, Linka N, Collingro A, Beier CL, Neuhaus HE, Wagner M and Horn M. 2004. ATP/ADP Translocases: A common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae. *Journal of Bacteriology* 186:683–691. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.683-691.2004>.
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ and Bové JM. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139–150. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006>
- Trentmann O, Horn M, van Scheltinga ACT, Neuhaus HE and Haferkamp I. 2007. Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. *PLOS Biology* 5:e231. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050231>.
- Vahling CM, Duan Y and Lin H. 2010. Characterization of an ATP translocase identified in the destructive plant pathogen “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Journal of Bacteriology* 192(3):834–840. <https://doi.org/10.1128/JB.01279-09>.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M and Barton GJ. 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Wulff N a, Zhang S, Setubal JC, Almeida NF, Martins EC, Harakava R, Kumar D, Rangel LT, Foissac X, Bové JM and Gabriel DW. 2014. The complete genome sequence of “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with Citrus huanglongbing. *Molecular plant-microbe Interactions* 27(2):163–176. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0292-R>.
- Zheng Z, Deng X and Chen J. 2014. Whole-Genome Sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from Guangdong, China. *Genome Announcements* 2:e00273-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00273-14>.
- Zheng Z, Sun X, Deng X and Chen J. 2015. Whole-Genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from a Huanglongbing-Affected citrus tree in central Florida. *Genome Announcements* 3:e00169-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00169-15>.