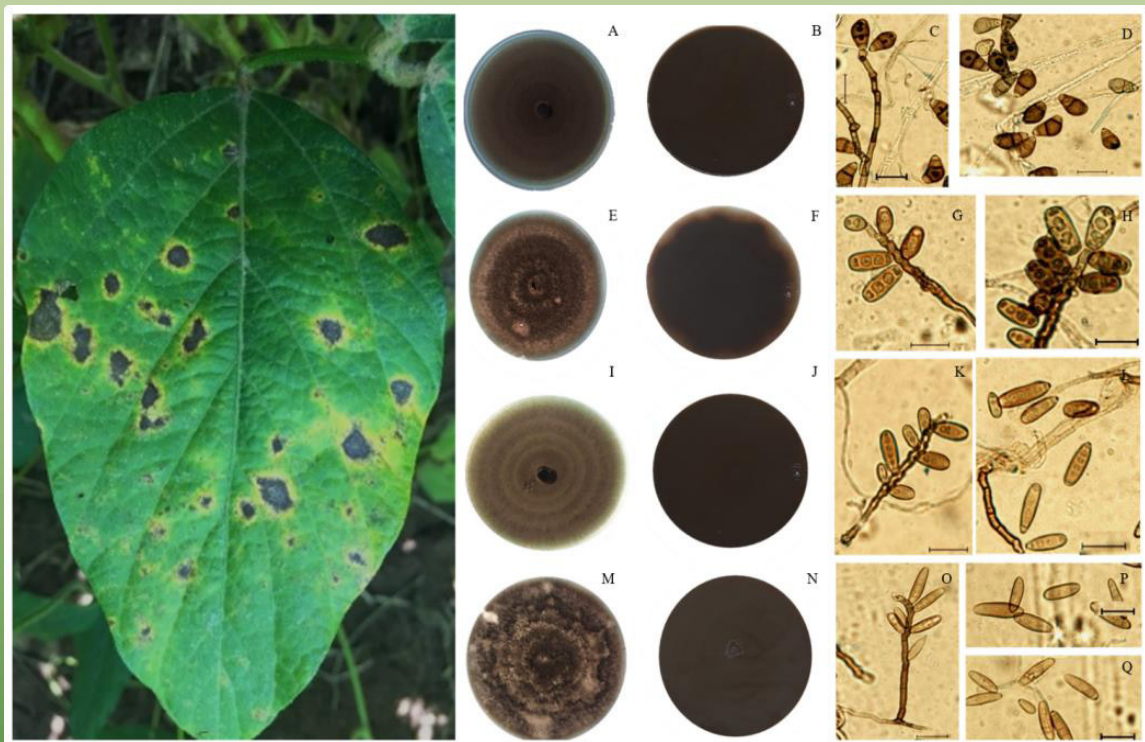


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 39, NÚMERO 3, Septiembre 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, UACH

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 AgCenter, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, UF, USA

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

Dra. Petra Andrade Hoyos, CSAEGRO

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS

Dr. Raúl Allende Molar, UV

Dr. Omar Romero Arenas, BUAP

Dr. Alberto Uc Varguez, CIATEJ

Dr. Mauricio Luna Rodríguez, UV

Dr. Mario Orozco Santos, INIFAP

Dr. Mario Rocandio Rodríguez, UAT

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP

Dr. Eduardo Molina Gayosso, UPPuebla

Dr. Sergio de los Santos Villalobos, ITSON

Dr. César del Ángel Hernández Galeno, INIFAP

Portada: Síntomas asociados a la mancha foliar en soya (izquierda). Morfología de *Curvularia* en PDA asociadas a la mancha foliar de la soya. A-D) Morfología de los aislados de *C. muehlenbeckiae*; A-B) Anverso y reverso de colonia; C-D) Conidióforos y conidios. E-H) Aislado de *C. spicifera*; E-F) Anverso y reverso de colonia; G-H) Conidióforos y conidios. I-L) Aislado de *C. ahvazensis*; I-J) Anverso y reverso de colonia; K-L) Conidióforos y conidios. M-Q) Aislados de *C. hawaiiensis*; M-N) Anverso y reverso de colonia; O-Q) Conidióforos y conidios.

Original: González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madrigal KY, Quiroz-Figueroa FR and Maldonado-Mendoza IE.
Páginas: 380 y 386.

SCIENTIFIC ARTICLES * ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in Sinaloa, Mexico** * Etiología de la mancha foliar en soya (*Glycine max*) en Sinaloa, México. 371
González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madrigal KY, Quiroz-Figueroa FR and Maldonado-Mendoza IE.
- Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes** * Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cormo en gladiolo, mediante estreptomicetos. 391
Rios-Hernández TA, Uc-Varguez A and Evangelista-Martínez Z.
- Fungicides evaluation against yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in six barley cultivars** * Evaluación de fungicidas contra roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) en seis variedades de cebada. 414
Rodríguez-García MF, González-González M, Huerta-Espino J and Solano-Hernández S.
- Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils** * Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. 435
Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruiz-Espinoza FH and Romero-Bastidas M.

SCIENTIFIC REVIEW * REVISIONES CIENTÍFICAS

- Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease** 452
* Sistemas de vigilancia epidemiológicos para interfaz web y aplicaciones en roya del café.
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, López-Buenfil A, González-Gómez R and Javier-López MA.

PHYTOPATHOLOGICAL NOTES * NOTAS FITOPATOLÓGICAS

- Strain of *Pseudomonas syringae* causes bacterial leaf spot in marigold plants (*Tagetes erecta*) in Mexico** * Cepa de *Pseudomonas syringae* causante de la mancha bacteriana en cempasúchil (*Tagetes erecta*) en México. 493
Maldonado-Bonilla LD, Hernández-Guzmán G, Martínez-Gallardo NA, Hernández-Flores JL, Délano-Frier JP and Valenzuela-Soto JH.

- Etiology of habanero pepper (*Capsicum chinense*) wilt in Tabasco, Mexico** * Etiología de la marchitez del chile habanero (*Capsicum chinense*) en Tabasco, México. 503
Moctezuma-Bautista K, Ortiz-García CF, Palma-López DJ, Cerón-Hernández LA, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G and Landero-Valenzuela N.
- In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*** * Biocontrol *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* con antagonistas. 515
Rubio-Tinajero S, Osorio-Hernández E, Estrada-Drouaillet B, Silva-Espinosa JHT, Rodríguez-Mejía MDL and Nava-Juárez RA.
- Incidence and effect on grain yield of the “monkey’s hand” disease in 29 maize genotypes** * Incidencia y efecto de la enfermedad “mano de chango” en la producción de 29 genotipos de maíz. 529
Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI and Sánchez-Pale JR.
- PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS * REPORTES FITOPATOLÓGICOS**
- CP-Tania 5, white maize variety horse’s tooth (*Claviceps gigantea*) resistant for Mexican highlands** * CP-Tania 5, variedad de maíz blanco resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México. 538
De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Márquez-Licona G and Sánchez-Pale JR.

Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in Sinaloa, Mexico

Etiología de la mancha foliar en soya (*Glycine max*) en Sinaloa, México

Iris Alejandrina González-Molotla, Rubén Félix-Gastélum*, Karla Yeriana Leyva-Madriral, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Los Mochis, Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, CP 81223, México; **Francisco Roberto Quiroz-Figueroa, Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza**, Departamento de Biotecnología Agrícola, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional-IPN, Unidad Sinaloa. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave, Sinaloa, CP 81101, México. *Autor para correspondencia: ruben.felix@uadeo.mx.

Recibido: 11 de Mayo, 2021.

Aceptado: 16 de Julio, 2021.

González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madriral KY, Quiroz-Figueroa FR and Maldonado-Mendoza IE. 2021. Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in Sinaloa, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 371-390.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2105-2>

Primera publicación DOI: 02 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 02, 2021.

Resumen. La soya es una de las leguminosas más importantes en el mundo. En años recientes en el norte de Sinaloa se ha observado incidencia de mancha foliar en la etapa de llenado de grano e inicio de la madurez. El objetivo del presente trabajo fue identificar el agente causal de esta enfermedad. Se colectaron muestras de foliolos sintomáticos en ocho lotes comerciales de soya, de los cuales se obtuvieron ocho aislados fúngicos, y se identificaron morfológica y molecularmente. Se realizaron pruebas

Abstract. Soybean is one of the most important legumes worldwide. In recent years, in the North of Sinaloa the incidence of a leaf spot has been observed at the growth stages of full seed and beginning maturity. The objective of the present study was to identify the causal agent of the disease. Symptomatic soybean leaflets were collected from eight commercial fields, from which eight fungal isolates were obtained and identified morphologically and molecularly. Pathogenicity tests were performed on soybean var. Nainari. The Koch postulates were fulfilled by the re-isolation of the original isolates from the inoculated plants. The morphological analyses determined the genus *Curvularia* associated to the soybean leaf spot. The phylogenetic analysis of the gene *gapdh* allowed the identification of *Curvularia ahvazensis*, *C. muehlenbeckiae*, *C. spicifera* and *Curvularia* sp. These species were pathogenic on soybean var. Nainari presenting variation in virulence since the area foliage diseased varied from 3 to 31%.

de patogenicidad en plantas de soya var. Nainari y se confirmaron los postulados de Koch, mediante el reaislamiento de los aislados originales. Los análisis morfológicos determinaron al género *Curvularia* asociado a la mancha foliar de la soya. El análisis filogenético del gen *gadh* permitió la identificación de *Curvularia ahvazensis*, *C. muelhenbeckiae*, *C. spicifera* y *Curvularia* sp. Estas especies resultaron patogénicas en soya var. Nainari mostrando variación en virulencia, pues el área foliar afectada varió de 3 a 31%. Los resultados abren nuevas líneas de investigación relacionadas con el impacto de la enfermedad en el rendimiento y calidad de la cosecha de la soya en Sinaloa.

Palabras clave: *Curvularia*, leguminosa, patogenicidad, *gadh*.

La soya (*Glycine max*) representa una de las leguminosas más importantes en el mundo, donde destacan como países productores Estados Unidos de Norteamérica, Brasil y Argentina, con producciones de 125 millones de toneladas y Argentina con 50 millones de t (FAO, 2020). La importancia de la soya en México radica en la aplicación de subproductos que tienen demanda en el ámbito alimenticio para la elaboración de harinas y aceites comestibles. En México se sembraron 155,000 ha en 2019, con una producción de 233, 000 t y un rendimiento promedio de 1.6 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). Sinaloa, ocupa el primer lugar en cuanto a soya cultivada en superficie de riego con 10,331 ha, con una producción de 24,718 t y un rendimiento de 2.4 t ha⁻¹ durante el ciclo primavera-verano (SIAP, 2020). La producción y calidad de soya en el mundo se ve limitada por agentes abióticos y bióticos en estos últimos sobresalen las enfermedades.

En Estados Unidos de Norteamérica las pérdidas anuales por enfermedades de la soya se estiman en

The results open new research lines regarding the impact of the disease on yield and quality of soybean in Sinaloa.

Key words: *Curvularia*, leguminous, pathogenicity, *gadh*.

The soybean (*Glycine max*) is one of the world's most important legumes, with countries such as the United States, Brazil and Argentina standing out as the largest producers, the first two of which produce around 125 million tons and the latter, 50 million (FAO, 2020). The importance of the soybean in Mexico lies in the application of sub-products that have a high demand in the food market for the production of flour and edible oils. Mexico planted 155,000 ha of the crop in 2019, with a production of 233, 000 t and an average yield of 1.6 t ha⁻¹ (SIAP, 2020). Sinaloa is the state with the most soybean planted under irrigation, with 10,331 ha, a production of 24,718 t and a yield of 2.4 t ha⁻¹ during the spring-summer cycle (SIAP, 2020). The production and quality of the soybean worldwide has been limited by abiotic and biotic agents, including, particularly, diseases.

In the United States, annual losses due to diseases are estimated in 4.5 billion dollars (Bandara *et al.*, 2020). Foliar diseases include brown spot (*Septoria glycines*), frog-eye leaf spot (*Cercospora sojina*), leaf blight and purple seed stain (*Cercospora kikuchii*), anthracnosis (*Colletotrichum truncatum*), pod and stem blight (*Phomopsis sojiae*), mildew (*Peronospora manshurica*), leaf spot by *Alternaria* (*Alternaria* spp.), ring spot (*Corynespora cassiicola*), bacterial pustule (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) and bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) (Carmona *et al.*, 2010). These diseases are known as late-season diseases (EFC), since they take place in plants in the stage of maturity, which

4.5 billones de dólares (Bandara *et al.*, 2020). Las enfermedades foliares incluyen a la mancha marrón (*Septoria glycines*), mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*), tizón de la hoja y mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*), antracnosis (*Colletotrichum truncatum*), tizón de la vaina y tallo (*Phomopsis sojiae*), mildiú (*Peronospora manshurica*), mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria* spp.), mancha anillada (*Corynespora cassiicola*), pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) y tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) (Carmona *et al.*, 2010). A estas enfermedades se les conoce como de fin de ciclo, pues ocurren en plantas en etapa de madurez, lo cual coincide con un ambiente lluvioso y cálido (Carmona *et al.*, 2015).

En Sinaloa se han consignado a *C. sojina*, *C. cassiicola*, *C. kikuchii* y *P. manshurica* como agentes causales de la mancha foliar de la soya (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019). En virtud de la alta incidencia de la enfermedad en ciclos agrícolas recientes, se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos: a) identificar al agente causal mediante estudios morfométricos y moleculares y b) determinar la patogenicidad de los hongos asociados a la enfermedad en lotes comerciales de esta fabácea durante el verano de 2018.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras y obtención de aislamientos monospóricos. La colecta de folíolos de plantas de soya con síntomas en el Valle del Carrizo y Valle del Fuerte, se llevó a cabo en los meses de septiembre y octubre de 2018 (Cuadro 1). Se obtuvieron muestras de ocho lotes comerciales de soya var. Nainari. Los predios variaron de 10 a 30 ha de cultivo, cinco en etapa de llenado de grano (R6) y tres en etapa de inicio de la madurez (R7) (Fehr y Caviness, 1977); en cada lote se utilizó el método de

coincides with a warm and rainy environment (Carmona *et al.*, 2015).

In Sinaloa, *C. sojina*, *C. cassiicola*, *C. kikuchii* and *P. manshurica* have been confirmed as causal agents of the foliar spot disease in soybean (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019). Given the high incidence of the disease in recent agricultural cycles, this investigation was performed with the following aims: a) to identify the causal agent with morphometric and molecular studies, and b) to determine the pathogenicity of the fungi related to the disease in commercial fields of this legume during the summer of 2018.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples and obtaining monosporic isolates. Symptomatic soybean plant leaflets were collected in the del Carrizo and del Fuerte valleys between September and October, 2018 (Cuadro 1). Samples were taken from eight commercial soybean var. Nainari fields. These varied between 10 and 30 ha of crops, five in the stage of grain filling (R6) and three in the stage of the beginning of maturity (R7) (Fehr and Caviness, 1977); in each lot, the sampling method used (five of gold) was to select five plants, out of which five leaflets, each with light to dark brown foliar spots surrounded by a yellow halo were taken. The isolates of fungi related to symptomatic leaflets were carried out in agar water (AA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico) following procedures described by Maraite *et al.* (1997). They were incubated at 25 ± 2 °C for 72 h, until mycelial growth was observed. To purify the isolates, hypha tips were transferred to potato-dextrose-agar (PDA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico).

The monosporic isolates were obtained by serial dilutions, which were planted in the AA at

Cuadro 1. Sitios de colecta de aislados fúngicos de folíolos de plantas de soya var. Nainari con síntomas en el Valle del Carrizo y Valle del Fuerte.
Table 1. Areas in which fungal isolates were obtained from symptomatic leaflets of soybean plants var. Nainari were collected in the del Carrizo and del Fuerte valleys.

Aislado	Localidad	Fecha	Latitud Norte	Longitud Oeste
Cv-3	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	26° 9' 56"	109° 2' 57"
Cv-4	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	26° 9' 46"	109° 2' 26"
Cv-5	Poblado 5, Ahome	01/sept/2018	26° 11' 26"	109° 3' 24"
Cv-8	Poblado 5, Ahome	01/sept/2018	26° 11' 26"	109° 3' 43"
Cv-11	Ejido Chihuahuita, Ahome	01/sept/2018	29° 9' 12"	109° 2' 57"
Cv-19	El Carrizo, Ahome	15/sept/2018	26° 18' 44.43"	108° 59' 30.27"
Cv-21	El Carrizo, Ahome	15/sept/2018	26° 18' 1.01"	109° 2' 3.81"
Cv-29	Bachoco, Guasave	02/oct/2018	25° 43' 55.83"	108° 46' 33.98"

muestreo de cinco de oros para seleccionar cinco plantas de las cuales se tomaron cinco folíolos con manchas foliares de un color café claro a oscuro rodeadas de un halo amarillento. Los aislamientos de hongos asociados a folíolos sintomáticos se realizaron en agua agar (AA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) siguiendo procedimientos descritos por Marañón *et al.* (1997). Las siembras se incubaron a 25 ± 2 °C por 72 h, hasta observar crecimiento micelial. Para la purificación de los aislados, se transfirieron puntas de hifas a papa-dextrosa-agar (PDA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México).

Los aislados monospóricos se obtuvieron mediante diluciones seriales, que se sembraron en AA al 1.6% y se incubaron durante 4 h; de ahí un conidio germinado se transfirió a medio PDA y las siembras se incubaron a 25 °C. Los aislados monospóricos se conservaron a 15 °C en tubos de ensayo con PDA inclinado, adicionados con aceite mineral (Flores-Córdova *et al.*, 2013).

Características fenotípicas de colonias miceliales. Las características fenotípicas de las colonias se determinaron en PDA. Los cultivos se incubaron por 11 días a 25 °C, con un régimen de 12 h de

1.6% and incubated for 4 h; a germinated conidium was transferred from there to a PDA medium and the plants were incubated at 25 °C. Monosporic isolates were stored at 15 °C in tilted test tubes with PDA, with added mineral oil (Flores-Córdova *et al.*, 2013).

Phenotypic characteristics of mycelial cultures.

The phenotypic characteristics of the cultures were determined with PDA. The cultures were incubated for 11 days at 25 °C, with a 12 h light-darkness regime, and the mycelial growth rate was determined (Kim *et al.*, 2005), along with the color of the culture, using standard Kelly and Judd colors (1976).

Morphometry of the conidia of isolates.

Fragments, 5 mm in diameter, were cut from the margin of the four-day-old cultures in PDA and transferred to the same medium. The shape and color of the septa, as well as the length and width of 40 conidia from each isolate were determined seven days after planting in the same medium and incubated at 25 °C. Preparations were then made with lactophenol blue to be measured in a micrometer installed in a compound microscope

luz y 12 h de oscuridad, y se determinó la tasa de crecimiento micelial (Kim *et al.*, 2005) y el color de la colonia, usando colores estándares de Kelly y Judd (1976).

Morfometría de los conidios de los aislados.

Fragmentos de 5 mm de diámetro se cortaron del margen de las colonias de cuatro días de edad en PDA y se transfirieron al mismo medio. La forma, número de septos, así como la longitud y ancho de 40 conidios de cada aislado se determinó a los siete días después de la siembra en el mismo medio e incubados a 25 °C. Posteriormente, se hicieron preparaciones con azul de lactofenol para medirse mediante un micrómetro instalado en un microscopio compuesto (Labmed; Lab America, Inc. Los Angeles, CA, USA).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 50-100 mg de micelio en cultivos en PDA de siete días, utilizando el reactivo DNAzol (Molecular Research Center Inc., Car. No. DN127, Cincinnati, OH, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN extraído se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para confirmar la identidad de los aislados, se amplificó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), utilizando los iniciadores *gpd1* (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') y *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3'), que amplifican un fragmento de aproximadamente 580 pares de bases (Berbee *et al.*, 1999). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 mL, los cuales contenían 1 mL de ADN genómico, Buffer GoTaq Flexi 1X, 1.25 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada iniciador, 0.2 mM de dNTP's y 1 U de DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Las condiciones de amplificación

(Labmed; Lab America, Inc. Los Angeles, CA, USA).

Extraction of DNA, PCR and sequencing. The extraction of genomic DNA was carried out using 50-100 mg of mycelia in seven-day-old PDA cultures, using DNAzol as a reagent (Molecular Research Center Inc., Car. No. DN127, Cincinnati, OH, USA), following the instructions by the manufacturer. The quality and concentration of the DNA extracted was determined in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). To confirm the identity of the isolates, the gene from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was amplified using primers *gpd1* (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') and *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3'), which amplify a fragment of approximately 580 pairs of bases (Berbee *et al.*, 1999). The PCR's reaction took place in a final volume of 50 mL, which contained 1 mL of genomic DNA, GoTaq Flexi 1X Buffer, 1.25 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each primer, 0.2 mM of dNTP's and 1 U of DNA polymerase GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Amplification conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 2 min, 35 denaturalization cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 1 min, an extension at 72 °C for 45 s and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide in a Chemidoc (BIO-RAD) and the bands of interest were split for their later purification using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quantification of the purified PCR products were carried out with a NanoDrop 2000c spectrophotometer. The fragments were sequenced unidirectionally with the primer *gpd1* in an AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in the genomic

fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, en un Chemidoc (BIO-RAD) y las bandas de interés fueron escindidas para su posterior purificación utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). La cuantificación de los productos de PCR purificados se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Los fragmentos se secuenciaron unidireccionalmente con el iniciador *gpd1* en un equipo AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en el laboratorio de servicios genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

Análisis filogenético. Las secuencias se editaron en el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y fueron comparadas contra otras secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BlastN. Las secuencias se alinearon junto con un set de 68 secuencias de referencia del género *Curvularia* y una secuencia de *Bipolaris maydis* como grupo externo (Madrid *et al.*, 2014; Manamgoda *et al.*, 2015; Tomaso-Peterson *et al.*, 2016; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019), utilizando el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en MegaX (Kumar *et al.*, 2018). El análisis filogenético se realizó en MegaX, empleando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), con distribución gamma (cuatro categorías) y sitios invariables. Todos los “gaps” fueron considerados en el análisis y la robustez de la topología se evaluó con 1000 réplicas bootstrap. Finalmente, el filograma se editó en el software FigTree versión 1.4.0 (Rambaut, 2014).

services lab of the National Genomic Laboratory for Biodiversity (LANGEBIO).

Phylogenetic analysis. The sequences were edited in the software BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) and compared with other sequences deposited in the GenBank data base, using the BlastN algorithm. The sequences were aligned along with a set of 68 references sequences of the genus *Curvularia* and a sequence of *Bipolaris maydis* as an external group (Madrid *et al.*, 2014; Manamgoda *et al.*, 2015; Tomaso-Peterson *et al.*, 2016; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019), using the MUSCLE aligner (Edgar, 2004) implemented in MegaX (Kumar *et al.*, 2018). The phylogenetic analysis was carried out in MegaX, using the maximum likelihood method and the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model, with a gamma distribution (four categories) and unvariable sites. All the gaps were considered in the analysis and the robustness of the topology was evaluated with 1000 bootstrap replications. Finally, the phylogram was edited using the software FigTree version 1.4.0 (Rambaut, 2014).

Pathogenicity tests in a greenhouse. To determine the pathogenicity of the eight isolates associated with the disease, soybean plants var. Nainari were used, which were planted in 5L plastic pots with a pasteurized substrate (sand 48.0, silt 19.4 and clay 32.5%, respectively and a pH of 7.0); one seed was placed in each pot. The plants were watered according to each one’s requirements and fertilized every week with Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA), following the manufacturer’s recommendations. Four replicates were used for each isolate (four pots with one plant each).

Pruebas de patogenicidad en invernadero. Para determinar la patogenicidad de los ocho aislados asociados a la enfermedad, se utilizaron plantas de soya var. Nainari, las cuales se sembraron en macetas de plástico de 5 L de capacidad con sustrato pasteurizado (arena 48.0, limo 19.4 y arcilla 32.5%, respectivamente y pH 7.0); se colocó una semilla por maceta. Las plantas se regaron según sus requerimientos hídricos y se fertilizaron semanalmente con Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se emplearon cuatro repeticiones por aislamiento (cuatro macetas con una planta).

Preparación de inóculo. Los aislados monoclonales se desarrollaron en PDA a 25 °C, con un régimen de 12 h luz y 12 h de oscuridad durante 10 días. Los conidios se obtuvieron agregando 10 mL de agua destilada estéril a cada cultivo y raspando con una espátula estéril para desprenderlos. Las suspensiones de conidios se filtraron a través de doble malla quesera para remover el micelio (Prieto *et al.*, 2016) y las concentraciones de inóculo de cada aislado se ajustaron de 5×10^4 a 7×10^4 conidios mL^{-1} mediante un hematocitómetro.

Las suspensiones conidiales se asperjaron en plantas (en etapa R6) hasta punto de escurrimiento. Las plantas testigo se asperjaron con agua destilada estéril. Posteriormente, las plantas se cubrieron durante 24 h con bolsas plásticas de 90 x 20 cm con papel absorbente saturado con agua destilada para lograr humedad relativa de 85-90% en su interior y se mantuvieron de 22 a 28 °C; posteriormente se sometieron siete días consecutivos a las mismas condiciones de humedad y temperatura durante 12 h diarias. Después, las plantas permanecieron 21 días sobre los estantes del invernadero donde la temperatura varió de 20 a 24 °C con rangos de humedad relativa de 50 a 75%. Las plantas inoculadas

Preparation of inoculum. The monoconidial isolates were developed in PDA at 25 °C, with a 12 h light-darkness regime for 10 days. The conidia were obtained by adding 10 mL of sterile distilled water to each culture and scraping with a sterilized spatula to release them. The conidial suspensions were filtered through a double cheese mesh to remove the mycelia (Prieto *et al.*, 2016) and the inoculum concentrations of each isolate were adjusted from 5×10^4 to 7×10^4 conidia mL^{-1} with a hemacytometer.

The conidial suspensions were sprayed on plants (in the R6 stage) to the point of run-off. The control plants were sprayed with sterile distilled water. The plants were then covered for 24 h with 90 x 20 cm plastic bags with paper towels saturated with distilled water to achieve a relative humidity of 85-90% in their interior and they were kept at 22 to 28 °C; they underwent the same moisture and temperature conditions for 12 h a day, every day for seven consecutive days. The plants then remained for 21 days on the greenhouse benches, where temperatures ranged from 20 to 24 °C with relative humidity ranges of 50 to 75%. The inoculated and control plants were distributed in a totally random design. The pathogenicity of the isolates was determined 30 days after inoculation. Ten leaflets were collected at random from each plant and the percentage of the leaf area affected (LAA) was determined, following procedures described Soares *et al.* (2009). To comply with Koch's postulates, after the experiments, isolates were carried out from symptomatic leaflets taken from inoculated plants. The identity of the isolates was confirmed based on the morphology of the cultures and the morphometry of twenty conidia from each isolate.

Statistical analysis. The percentages of LAA were transformed using the arcsine function (Gómez y Gómez, 1984) before performing an ANOVA. The

y testigo se distribuyeron en un arreglo completamente al azar. La patogenicidad de los aislados se determinó a los 30 días después de la inoculación. Se colectaron 10 foliolos al azar de cada planta y se determinó el porcentaje de área foliar afectada (AFA) de acuerdo a procedimientos descritos por Soares *et al.* (2009). Para cumplir con los postulados de Koch, al final de los experimentos se efectuaron aislamientos a partir de foliolos sintomáticos de las plantas inoculadas. La identidad de los aislados se confirmó con base en la morfología de las colonias y la morfometría de veinte conidios de cada aislado.

Análisis estadístico. Los porcentajes de AFA se transformaron usando la función arcoseno (Gómez y Gómez, 1984), previo al ANOVA. La comparación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Little y Hills, 1973), utilizando el paquete estadístico SAS® versión 9.4 (1999). Los experimentos se condujeron en dos ocasiones. En virtud de que los análisis estadísticos indicaron interacción significativa entre los aislados y los experimentos, se presentan los resultados de los dos experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características culturales y morfométricas de los aislados fúngicos. Las características fenotípicas de las colonias, los conidióforos y conidios de ocho aislados obtenidos durante el periodo de muestreo (cuadro 1) se determinaron en PDA después de ocho días de incubación. Esto permitió la ubicación de los aislados en el género *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015). No se encontró el teleomorfo del hongo durante el período de muestreo, aun cuando el género *Cochliobolus* se ha consignado como el teleomorfo de algunas especies de *Curvularia* (Marin-Felix *et al.*, 2020). La fenología

comparison of means was carried out with Tukey's test (Little and Hills, 1973), using the statistical package SAS® version 9.4 (1999). The experiments were held twice. Given that the statistical analyses indicated a significant interaction between isolates and the experiments, the results of both experiments are presented.

RESULTS AND DISCUSSION

Cultural and morphometric characteristics of fungal isolates. The phenotypic characteristics of the cultures, the conidiophores and conidia of eight isolates obtained during the sampling period (Table 1) were determined in PDA after eight days of incubation. This helped locate the isolates in the genus *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015) genus. No fungal teleomorph was found during the sampling period, although the genus *Cochliobolus* has been confirmed as the teleomorph of some species of *Curvularia* (Marin-Felix *et al.*, 2020). The phenology of the colonies, the characteristics of conidiophores and the morphometry of the *Curvularia* species are described below.

Isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8. Cultures with a mycelial growth rate of 3.7 – 4.4 mm/day on PDA, with a velvet-like aspect, olive-gray, with faint concentric circles (Figure 1A); reverse side of the cultures with olive-brown pigmentation (Figure 1B). Straight, dark brown septate conidiophores, geniculated in the terminal part (Figure 1C); conidia, 15.0 – 27.5 µm in length by 7.5 – 15.0 µm in width, with 2 to 4 transversal septa, the middle septum being the bulkiest one and with the most pigmentation, a pronounced curvature and a dark hilum (Table 2; Figure 1D). The morphometric characteristics of these are similar to those recorded for *C. muehlenbeckiae* (Berbee *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2014).

de las colonias, las características de los conidióforos y morfometría de conidios de las especies de *Curvularia* se describen a continuación.

Aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8. Colonias con tasa de crecimiento micelial de 3.7 – 4.4 mm/día en PDA, de aspecto aterciopelado, gris oliváceo, con anillos concéntricos tenues (Figura 1A); reverso de las colonias con pigmentación café-olivo (Figura 1B). Conidióforos café oscuro rectos, septados, geniculados en la parte terminal (Figura 1C); conidios de 15.0 – 27.5 μm de largo por 7.5 – 15.0 μm de ancho, con 2 a 4 septos transversales, con el septo medio más voluminoso y con mayor pigmentación, curvatura pronunciada e hilio oscuro (Cuadro 2; Figura 1D). Las características morfométricas de estos aislados son similares a las consignadas para *C. muehlenbeckiae* (Berbee *et al.*, 1999; Madrid *et al.*, 2014).

Aislado Cv-4. Colonias de apariencia algodonosa a gamuza suave, con tasa de crecimiento micelial de 4.0 mm/día en PDA, de color gris oscuro con tonalidades no uniformes de café a gris claro (Figura 1E) y anverso de color café oscuro dorado (Figura 1F). Conidióforos de color café claro y geniculados en la parte superior. Conidios cilíndricos, con tres a cuatro distoseptas, elipsoides, color marrón dorado (Figura 1G y H), de 10.0 – 22.5 μm de largo, por 7.5 – 10.0 μm de ancho (Cuadro 2). Las características culturales y morfométricas son similares a las de *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017; Qostal *et al.*, 2019).

Aislado Cv-11. Colonias color gris oliváceo, poco densas, con aspecto aterciopelada, con anillos concéntricos muy marcados (Figura 1I) y tasa de crecimiento micelial de 3.9 mm/día en PDA. Reverso de las colonias verde olivo a oscuro (Figura 1J). Conidióforos solitarios y geniculados en la parte

Isolate Cv-4. Cultures with a cotton- or suede-like appearance, with a mycelial growth rate of 4.0 mm/day on PDA, colored dark gray with uneven tones of brown to light gray (Figure 1E) and the front, dark golden brown in color (Figure 1F). Light-brown conidiophore and geniculated on the top part. Cylindrical conidia, with three to four distosepts, ellipsoidal, golden maroon in color (Figure 1G and H), 10.0 – 22.5 μm in length by 7.5 – 10.0 μm in width (Table 2). The cultural and morphometric characteristics are similar to those found in *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017; Qostal *et al.*, 2019).

Isolate Cv-11. Olive-gray cultures, scarcely dense, with a velvetlike aspect, very noticeable concentric rings (Figure 1I) and a mycelial growth rate of 3.9 mm/day on PDA. The reverse side of the cultures dark to olive green (Figure 1J). Isolated and geniculated conidiophore in the terminal part, without ramifications (Figure 1K). Conidia between 16.2 and 27.5 μm in length by 6.2 to 10.0 μm in width (Table 2), with a smooth wall, ellipsoidal to cylindrical, rounded tips, with 2 to 4 transversal distosepta (Figure 1L), protuberant hilum (Arrow in Figure 1L), coinciding with the characteristics described for *C. ahvazensis* (Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29. Cultures with a mycelial growth rate of 2.8 – 4.3 mm/day in PDA, with a suede-like aspect, undefined concentric rings and whitish plumes (Figure 1M), and a dark maroon to black reverse side (Figure 1N). Conidiophore are erect to flexible, septated, often geniculated (Figure 1O). Conidia are 10 to 35 μm in length by 5 to 12.5 μm in width, ellipsoidal or rounded on the tips, pale to dark maroon, 2 a 5 distosepts (generally 4), smooth conidial wall (Table 2; Figure 1P y Q). The phenotypical characteristics of the cultures, as

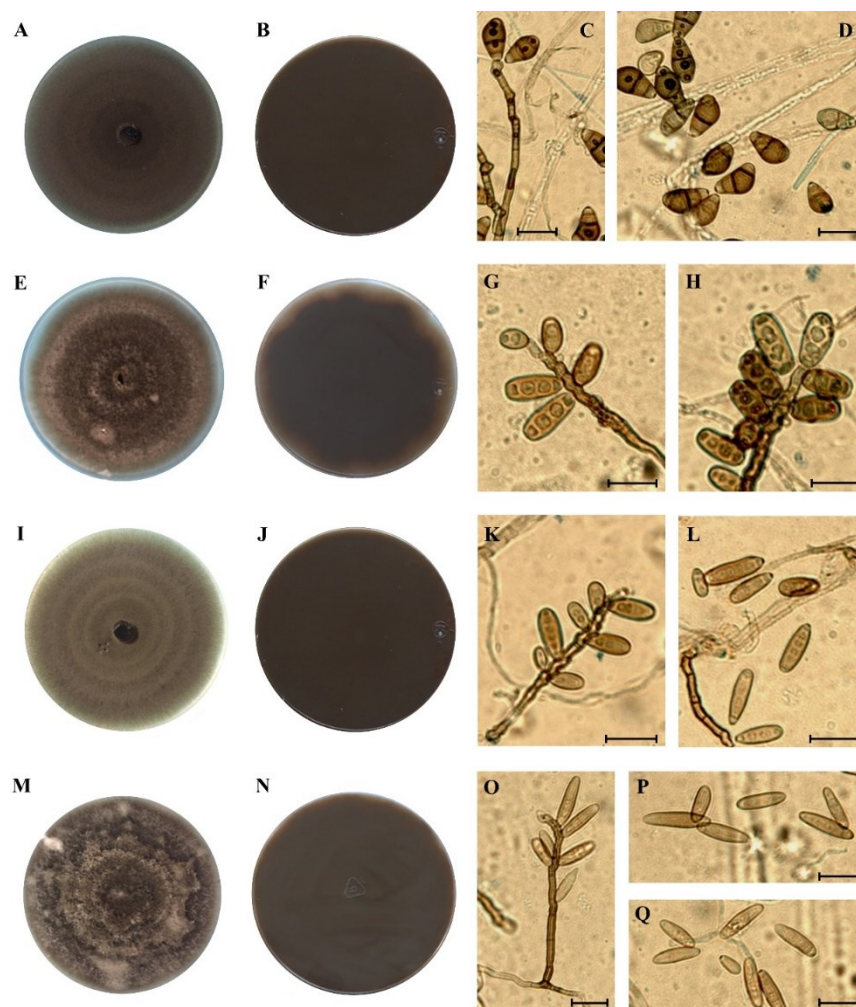


Figura 1. Morfología de especies de *Curvularia* en PDA asociadas a la mancha foliar de la soya. A-D) Morfología representativa de los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 (*C. muehlenbeckiae*); A) Anverso de colonia; B) Reverso de colonia; C-D) Conidióforos y conidios. E-H) Aislado Cv-4 (*C. spicifera*); E) Anverso de colonia; F) Reverso de colonia; G y H) Conidióforos y conidios. I-L) Aislado Cv-11 (*C. ahvazensis*); I) Anverso de colonia; J) Reverso de colonia; K-L) Conidióforos y conidios; L) Conidios. M-Q) Morfología representativa de los aislados Cv-19, Cv-21, Cv-29 (*C. hawaiiensis*); M) Anverso de colonia; N) Reverso de colonia; O-P-Q) Conidióforos y conidios. Barra de escala = 20 μ m.

Figure 1. Morphology species of *Curvularia* in PDA related to leaf spot in soybean. A-D) Representative morphology of isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8 (*C. muehlenbeckiae*); A) Front side of the culture; B) Reverse side of the culture; C-D) Conidiophores and conidia. E-H) Isolate Cv-4 (*C. spicifera*); E) Front side of the culture; F) Reverse side of the culture; G and H) Conidiophores and conidia. I-L) Isolate Cv-11 (*C. ahvazensis*); I) Front side of the culture; J) Reverse side of the culture; K-L) Conidiophores and conidia; L) Conidia. M-Q) Representative morphology of isolates Cv-19, Cv-21, Cv-29 (*C. hawaiiensis*); M) Front side of the culture; N) Reverse side of the culture; O-P-Q) Conidiophore and conidia. Scale bar=20 μ m.

Cuadro 2. Morfometría de conidios de hongos asociados a la mancha foliar de la soya var. Nainari.
Table 2. Morphometry of fungal conidia associated with leaf spot in soybean var. Nainari.

Especie/Aislado	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Relación (L/A) (µm)	Septos/Distoseptas
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-3	15.0-27.5 ^x	7.5-12.5	2.0	2.0-4.0
	21.75 ^y	11.25		3.6
	1.0 ^z	0.6		0.7
<i>C. spicifera</i> Cv-4	10.0-22.5	7.5-10.0	2.1	3.0-4.0
	18.75	9.0		3.9
	1.0	0.5		0.4
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-5	20.0-27.5	10.0-15.0	1.9	2.0-4.0
	23.25	12.0		3.6
	0.9	0.5		0.7
<i>C. muehlenbeckia</i> Cv-8	17.5-25.0	7.5-15.0	2.0	3.0-4.0
	22.0	11.0		3.6
	0.7	0.6		0.5
<i>C. ahvazensis</i> Cv-11	16.2-27.5	6.2-10.0	2.9	2.0-4.0
	22.3	7.6		4.2
	2.7	0.5		1.1
<i>Curvularia</i> sp. Cv-19	10.0-22.5	7.5-10.0	2.1	3.0-4.0
	18.75	9.0		3.9
	1.0	0.5		0.4
<i>Curvularia</i> sp. Cv-21	10.0-35.0	5.0-7.5	3.7	2.0-5.0
	20	5.5		3.8
	1.5	0.4		0.6
<i>Curvularia</i> Cv-29	17.5-27.5	7.5-12.5	2.4	2.0-5.00
	21.75	9.0		3.8
	1.1	4.0		0.7

^xEl primer renglón representa la longitud máxima y mínima de las estructuras; ^yel segundo renglón indica la media de las 40 estructuras en cada muestra; ^zel tercer renglón se refiere a la desviación estándar de los datos. / ^xThe first row represents the maximum and minimum length of the structures; ^ythe second row indicates the mean of the 40 structures in each sample; ^zthe third row refers to the standard deviation of the data.

terminal, sin ramificación (Figura 1K). Conidios de 16.2 a 27.5 µm de largo, por 6.2 a 10.0 µm de ancho (Cuadro 2), con pared lisa, elipsoides a cilíndricos, extremos redondeados, con 2 a 4 distoseptas transversales (Figura 1L), hilio protuberante (Flecha en figura 1L), coincidiendo con las características descritas para *C. ahvazensis* (Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29. Colonias con tasa de crecimiento micelial de 2.8 – 4.3 mm/día en PDA, con apariencia de gamuza suave, con anillos

well as the morphometry of the conidia are similar to those in species phylogenetically related to *C. hawaiiensis* (Manamgoda *et al.*, 2015).

Molecular identification. The partial sequences of the *gapdh* gene were deposited in the GenBank database (accession MT680146-MT680150 and MT680152-MT680154). The analyses confirmed the identity of the isolates at a genus level. In turn, the comparison of the sequences in the GenBank database displayed high percentages of similarity with diverse *Curvularia* species; isolates Cv-3,

concéntricos poco definidos y penachos blanquecinos (Figura 1M), reverso marrón oscuro a negro (Figura 1N). Los conidióforos son erectos a flexuosos, septados, a menudo geniculados (Figura 1O). Conidios de 10 a 35 µm de largo por 5 a 12.5 µm de ancho, elipsoidales o redondeados en los extremos, marrón pálido a marrón oscuro, 2 a 5 distoseptas (generalmente 4), pared conidial lisa (Cuadro 2; Figura 1P y Q). Las características fenotípicas de las colonias, así como la morfometría de los conidios son similares a las de especies filogenéticamente relacionadas a *C. hawaiiensis* (Manamgoda *et al.*, 2015).

Identificación molecular. Las secuencias parciales del gen *gapdh* fueron depositadas en la base de datos GenBank (acceso MT680146-MT680150 y MT680152-MT680154). Los análisis confirmaron la identidad de los aislados a nivel género. A su vez, la comparación de las secuencias en la base de datos del GenBank mostró altos porcentajes de similitud con diversas especies de *Curvularia*; los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 fueron similares a *C. muehlenbeckiae* cepa UTHSC 08-2905 (No. Acc. LT715807; 99% de identidad) y CBS 144.63 (No. Acc. LT715806, 100% de identidad); el aislado Cv-4 fue similar a *C. spicifera* cepa CBS 198.31 (No. Acc. LT715814.1, 99% de identidad); el aislados Cv-11 registró altos porcentajes de similitud con las especies *C. hawaiiensis* cepa CBS 173.57 (No. Acc. LT715812, 99% de identidad), *C. nodosa* cepa CPC 28812 (No. Acc. MF490840, 98.5% de identidad), *C. perotidis* cepa CBS 350.90 (No. Acc. LT715813, 97.9% de identidad) y *C. dactyloctenii* cepa BRIP 12846 (No. Acc. KJ415401, 98.5% de identidad); mientras que los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29 compartieron altos porcentajes de similitud con las especies *C. beasleyi* cepa BRIP 15854 (No. Acc. MH433639, 99.1% de identidad), *C. dactyloctenii* cepa BRIP 12846 (No. Acc.

Cv-5 and Cv-8 were similar to *C. muehlenbeckiae* strain UTHSC 08-2905 (accession LT715807; 99% identity) and CBS 144.63 (accession LT715806, 100% identity); isolate Cv-4 was similar to *C. spicifera* strain CBS 198.31 (accession LT715814.1, 99% identity); isolate Cv-11 recorded high percentages of similarity with *C. hawaiiensis* strain CBS 173.57 (accession LT715812, 99% identity), *C. nodosa* strain CPC 28812 (accession MF490840, 98.5% identity), *C. perotidis* strain CBS 350.90 (accession LT715813, 97.9% identity) and *C. dactyloctenii* strain BRIP 12846 (accession KJ415401, 98.5% identity); whereas isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29 shared high percentages of similarity with *C. beasleyi* strain BRIP 15854 (accession MH433639, 99.1% identity), *C. dactyloctenii* strain BRIP 12846 (accession KJ415401, 98.9% identity), *C. hawaiiensis* strain CBS 173.57 (accession LT715812, 98.7% identity), *C. nodosa* strain CPC 28812 (accession MF490840, 98.5% identity) and *C. perotidis* strain CBS 350.90 (accession LT715813, 97.9% identity).

Figure 2 shows the phylogram inferred from the partial sequence of gene *gapdh*. Isolates Cv-3, Cv-5 and Cv-8 were grouped, along with the *C. muehlenbeckiae* type sequence, with a high bootstrap support (90.9%), which coincides with the morphological description of these isolates for the species at hand (Figure 1A-D). Isolate Cv-4 was identified as *C. spicifera*, since it grouped with the type sequence of this species (bootstrap 94.1%) and its morphological characteristics coincide with those reported previously. Isolate Cv-11 is grouped with *C. ahvazensis* (52.1% bootstrap) and its morphological characteristics coincide with those reported for the species. The phylogram shows that isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29 are different and do not correspond to any of the species of *Curvularia* used as references in the analysis, and were therefore considered as *Curvularia* sp.

KJ415401, 98.9% de identidad), *C. hawaiiensis* cepa CBS 173.57 (No. Acc. LT715812, 98.7% de identidad), *C. nodosa* cepa CPC 28812 (No. Acc. MF490840, 98.5% de identidad) y *C. perotidis* cepa CBS 350.90 (No. Acc. LT715813, 97.9% de identidad).

La Figura 2 muestra el filograma inferido a partir de la secuencia parcial del gen *gapdh*. Los aislados Cv-3, Cv-5 y Cv-8 se agruparon junto con la secuencia tipo de *C. muehlenbeckiae*, con alto soporte bootstrap (90.9%), lo cual concuerda con la descripción morfológica de estos aislados para la especie en cuestión (Figura 1A-D). El aislado Cv-4 fue identificado como *C. spicifera* ya que se agrupó con la secuencia tipo de esta especie (bootstrap 94.1%) y sus características morfológicas coinciden con las ya reportadas. El aislado Cv-11 se agrupa con la especie *C. ahvazensis* (bootstrap de 52.1%), y sus características morfológicas coinciden con las reportadas para esta especie. El filograma muestra que los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29 son diferentes y no corresponden a ninguna de las especies de *Curvularia* utilizadas como referencia en el análisis, por lo que se designaron como *Curvularia* sp. Los tres aislados son filogenéticamente cercanos a *C. beasleyi* especie con las que comparan porcentajes de similitud de 99 – 99.2%.

Este grupo de hongos posee una alta complejidad morfológica y diversidad de especies crípticas, por lo que su taxonomía no está completamente resuelta (Manamgoda *et al.*, 2015). Actualmente, el género comprende poco más de 100 especies descritas, de las cuales solo ~80 han sido aceptadas y se ha establecido su ubicación taxonómica mediante análisis filogenético multigen (Manamgoda *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019); sin embargo, el gen *gapdh* por si solo puede resolver las especies de *Curvularia* (Manamgoda *et al.*, 2015), y es el locus con mayor información filogenética entre los loci analizados para este género

The three isolates are phylogenetically near to *C. beasleyi*, the species with which they share 99 – 99.2% similarities.

This group of fungi has a high morphological complexity and diversity of cryptic species; therefore, its taxonomy has not been entirely solved (Manamgoda *et al.*, 2015). Currently, the genus covers just over 100 described species, out of which only ~80 have been accepted and their taxonomic locations have been established through multigene phylogenetic analyses (Manamgoda *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019). However, the gene *gapdh* on its own can solve the *Curvularia* species (Manamgoda *et al.*, 2015), and it is the locus with the most phylogenetic information among the loci analyzed for this fungal genus (Ferdinandez *et al.*, 2019). For isolates Cv-19, Cv-21 and Cv-29, the identities of which could not be determined, we recommend carrying out a more detailed molecular characterization to corroborate them as a new lineage within the genus and give them a name. In order to do this, the sequencing of the ITS region and/or the translation elongation factor (TEF) gene must be included, as it has been done previously in the registration of new species of *Curvularia* (Heidari *et al.*, 2018; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Pathogenicity test. All the isolates obtained from symptomatic soybean leaflets were pathogenic in soybean var. Nainari and caused similar symptoms to those observed in the field (Figure 3). The first symptoms were found in the basal third and middle of the plants six days after inoculation, while defoliation began 15 days after inoculation; in turn, the symptoms caused by the different *Curvularia* species were similar, but with variations in the degree of virulence. In experiment 1, 30 days after inoculation, the plants inoculated with the *C. ahvazensis* (Cv-11) and *Curvularia*

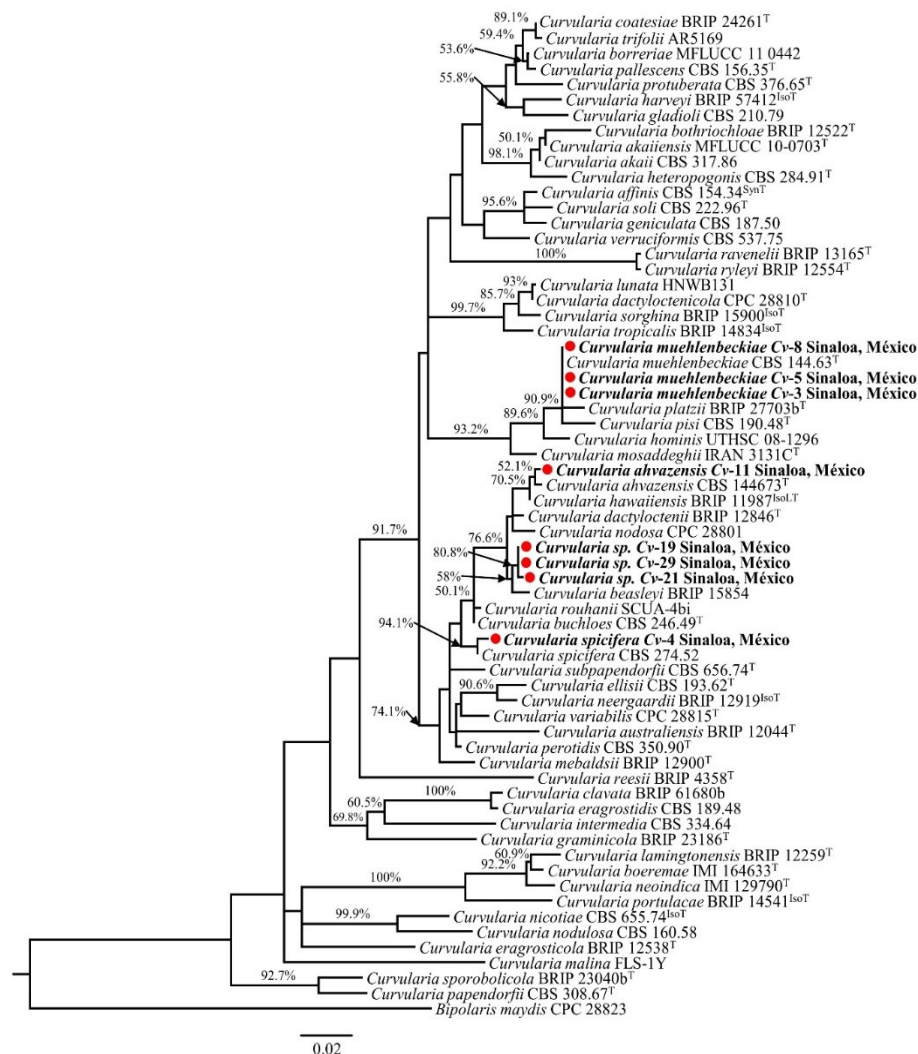


Figura 2. Árbol filogenético del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), inferido por Máxima Verosimilitud (lnL -4286.90) en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Los valores Bootstrap $\geq 70\%$ se presentan sobre las ramas, cerca de los internodos. Las especies encontradas en este estudio se muestran en negritas, precedidas de un círculo rojo. ATCC, American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP, Queensland Plant Pathology Herbarium, Brisbane, Australia; CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, the Netherlands; MFLUCC, Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Ria, Thailand; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology at the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA; CPC, Culture Collection of Pedro Crous, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakeham Lane, UK. ^{ET}, ^{Isot}, ^{IsolT}, ^{SynT} y ^T indican cepas ex-epitipo, ex-isotipo, ex-isolectotipo, ex-sintipo y ex-tipo, respectivamente.

Figure 2. Phylogenetic tree of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene, inferred by maximum likelihood (lnL -4286.90) in MEGA X. The scale represents the average of situations per site. Bootstrap values $\geq 70\%$ are presented on the branches, near the internodes. The species found in this study are shown in bold, followed by a red circle. ATCC, American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP, Queensland Plant Pathology Herbarium, Brisbane, Australia; CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, the Netherlands; MFLUCC, Mae Fah Luang University Culture Collection, Chian Ria, Thailand; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology of the University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA; CPC, Culture Collection of Pedro Crous, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Bakeham Lane, UK. ^{ET}, ^{Isot}, ^{IsolT}, ^{SynT} and ^T indicate ex-epitype, ex-isotype, ex-isolectotype, ex-syntype and ex-type strains, respectively.

fúngico (Ferdinandez *et al.*, 2019). En el caso de los aislados Cv-19, Cv-21 y Cv-29, cuya identidad no se pudo determinar, se recomienda realizar una caracterización molecular más detallada, para corroborarlos como un nuevo linaje dentro del género y asignarles un nombre. Para ello, se deberían incluir la secuenciación de la región ITS y/o el gen del factor de elongación de la traducción (TEF), como se ha realizado previamente en el registro de nuevas especies de *Curvularia* (Heidari *et al.*, 2018; Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018).

Prueba de patogenicidad. Todos los aislados obtenidos de folíolos de soya sintomáticos, resultaron patogénicos en soya var. Nainari y causaron síntomas similares a los observados en campo (Figura 3). Los primeros síntomas ocurrieron en el tercio basal y parte media de las plantas seis días después de la inoculación, mientras que la defoliación inició 15 días después de la inoculación; a su vez, los síntomas causados por las distintas especies de *Curvularia* fueron similares, pero con variación en el grado de virulencia. En el experimento 1, a los treinta días después de la inoculación, las plantas inoculadas con los aislados de *C. ahvazensis* (Cv-11) y *Curvularia* sp. (Cv-21), presentaron un AFA de 30%, sin diferencias ($F=73.3$; $P<0.0001$) entre estas especies, pero si las hubo con respecto a los aislados Cv-3 y Cv-8 de *C. muehlenbeckiae* y los aislados Cv-19 y Cv-29 de *Curvularia* sp., que causaron un AFA de 10%. Los aislados de *C. spicifera* (Cv-4) y *C. muehlenbeckiae* (Cv-3 y Cv-5), fueron los menos virulentos pues causaron un AFA de 3 a 9% (Cuadro 3). En el experimento 2 el porcentaje de AFA causado por los aislados de *C. ahvazensis* (Cv-11) y *Curvularia* sp. (Cv-21) fue de 24.0 y 19.0%, respectivamente, con diferencias ($F=27.0$; $P<0.0001$) entre estos aislados y el resto de ellos pertenecientes a diversas especies de *Curvularia*, las cuales causaron de 5.0 a 15.0% de AFA. En los

sp. (Cv-21) isolates presented an LAA of 30%, without differences ($F=73.3$; $P<0.0001$) between these species, although there were differences with isolates Cv-3 and Cv-8 from *C. muehlenbeckiae* and isolates Cv-19 and Cv-29 of *Curvularia* sp., which caused an AFA of 10%. The isolates of *C. spicifera* (Cv-4) and *C. muehlenbeckiae* (Cv-3 and Cv-5) were the least virulent, since they caused an AFA of 3 to 9% (Table 3). In experiment 2, the percentages of AFA caused by isolates of *C. ahvazensis* (Cv-11) and *Curvularia* sp. (Cv-21) were 24.0 and 19.0%, respectively, with differences ($F=27.0$; $P<0.0001$) between these isolates, and the rest belonged to diverse species of *Curvularia*, which caused between 5.0 and 15.0% of LAA. In both experiments, the control plants sprayed with distilled water remained asymptomatic throughout the investigation (Figure 1B).

To comply with Koch's standards, the inoculated *Curvularia* species were re-isolated from the symptomatic plants and their identity was confirmed by comparing the phenotypical characteristics of the cultures and morphometry of 20 conidia with the original isolates.

The species of *Curvularia* mentioned previously were proven to cause leaf spot in soybean plants, which contrasts with reports in Sinaloa in which *Corynespora asiicola*, *Cercospora sojina* and *Cercospora kikushii* are mentioned as causal agents of the disease (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019), as well as in Brazil (Teramoto *et al.*, 2017), the United States (Sumabat *et al.*, 2018) and Argentina (Reznikov *et al.*, 2018). Although the symptoms caused by the *Curvularia* species in our study are similar to those caused by other fungi (Stewart and Rodríguez, 2016; Mwase and Kapooria, 2000), these were not found in the sampling period of our investigation. Fungal foliar diseases in soybean that occur in the stage of grain filling are called late-season diseases (LSD), since they take place

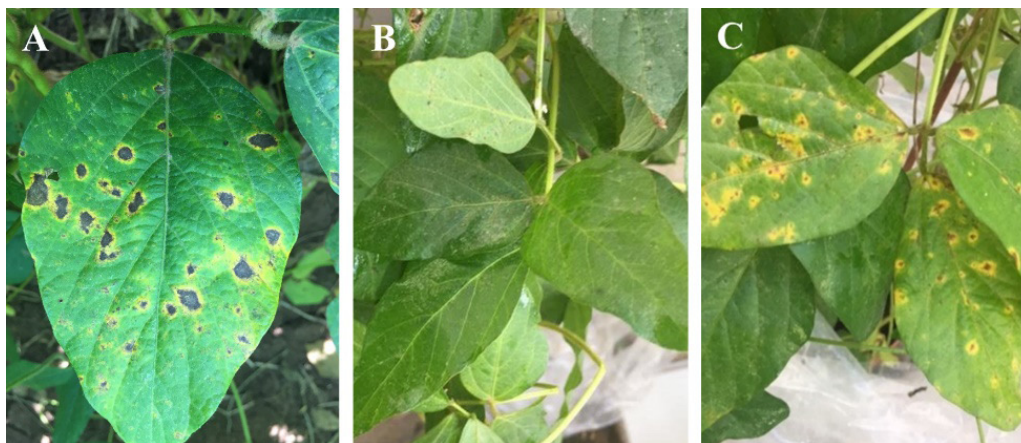


Figura 3. A) Síntomas de mancha foliar en foliolo de planta de soya a partir de infecciones naturales en campo; B) Foliolos de planta testigo sin inocular; C) Foliolo con síntomas, característicos de la mancha foliar de la soya, causados por especies de *Curvularia* (aislado Cv-11) en inoculaciones en el invernadero.

Figure 3. A) Symptoms of foliar spot in leaflets of soybean plants from natural infections in the field; B) Non-inoculated control plant leaflets; C) Leaflets with symptoms, typical of leaf spot in soybean plants, caused by species of *Curvularia* (isolate Cv-11) in greenhouse inoculations.

Cuadro 3. Porcentaje de área foliar afectada en plantas de soya variedad Nainari, inoculadas con aislados de diferentes especies de *Curvularia*.

Table 3. Percentage of foliar area affected in soybean plants, variety Nainari, inoculated with different species of *Curvularia*.

Especie/Aislado ^x	Experimento 1	Experimento 2
<i>C. ahvazensis</i> Cv-11	30.0 a ^z	24.0 a ^z
<i>Curvularia</i> sp. Cv-21	30.0 a	19.0 ab
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-8	21.0 b	15.0 bc
<i>Curvularia</i> sp. Cv-19	10.0 c	8.0 d
<i>Curvularia</i> sp. Cv-29	10.0 c	11.0 cd
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-3	9.0 c	9.0 cd
<i>C. spicifera</i> Cv-4	9.0 c	10.0 cd
<i>C. muehlenbeckiae</i> Cv-5	3.0 d	5.0 de
Testigo sin inoculación	0.0 d	0.0 e
CV	29.8	39.2

^xLa patogenicidad de los aislados se evaluó a los 30 días después de la inoculación. / ^xThe pathogenicity of the isolates was evaluated 30 days after inoculation.

^zMedias con la misma letra en cada columna no son diferentes en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). / ^zMeans with the same letter in each column are not different in Tukey's test ($p \leq 0.05$).

dos experimentos las plantas testigo asperjadas con agua destilada permanecieron asintomáticas durante el desarrollo del trabajo (Figura 1B).

Para cumplir con los postulados de Koch, las especies de *Curvularia* inoculadas se re-aislaron de las plantas sintomáticas y su identidad se confirmó mediante la comparación de las características fenotípicas de las colonias y morfometría de 20 conidios con los aislados originales.

Se demostró que las especies de *Curvularia* antes señaladas causan la mancha foliar de la soya, lo cual contrasta con reportes en Sinaloa, donde se mencionan a *Corynespora asiicola*, *Cercospora sojina* y *Cercospora kikushii* como agentes causales de la enfermedad (Rodríguez-Cota *et al.*, 2019), al igual que en Brasil (Teramoto *et al.*, 2017), Estados Unidos de Norteamérica (Sumabat *et al.*, 2018) y Argentina (Reznikov *et al.*, 2018). Aun cuando los síntomas causados por las especies de *Curvularia* en el presente estudio son similares a los causados por otros hongos (Stewart y Rodríguez, 2016; Mwase y Kapooria, 2000), éstos no se encontraron durante el periodo de muestreo en el presente trabajo. A las enfermedades foliares de origen fungoso en la soya, que ocurren en la etapa de llenado de grano se les denomina enfermedades de fin de ciclo (EFC), pues se presentan en estadios intermedios a avanzados del cultivo (De Lisi *et al.*, 2015). En virtud de que la mancha foliar de la soya causada por *C. spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* y *Curvularia* spp. en Sinaloa se presenta a partir del llenado de grano, también deben ubicarse como EFC. Esta enfermedad ocurrió durante septiembre y octubre, cuando la precipitación varió de 321 a 373 mm en la región y la temperatura osciló entre 26 y 39 °C (Estación Meteorológica, Junta Local del Valle del Carrizo, Sinaloa, 2019). En otras regiones productoras de soya se han registrado como agentes causales de EFC a *Colletotrichum truncatum*, *Septoria glycines*, *Phomopsis sojae*,

in plants in intermediate to advanced crop stages of maturity (De Lisi *et al.*, 2015). Given that foliar spot in soybean caused by *C. spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* and *Curvularia* spp. in Sinaloa appears in the grain-filling stage, it must also be considered an LSD. This disease appeared in September and October, when rainfalls varied between 321 and 373 mm in the region and the temperature fluctuated between 26 and 39 °C (Junta Local del Valle del Carrizo weather station, Sinaloa, 2019). In other soybean-producing regions, *Colletotrichum truncatum*, *Septoria glycines*, *Phomopsis sojae*, *Peronospora manshurica* and *Alternaria* spp. have been registered as LSD causal agents (Carmona *et al.*, 2015), yet these pathogens were not found at the time the present investigation was being carried out. Studies in Argentina indicate that LSD reduce crop yield by 8 to 10%, and a maximum of up to 30% (Carmona *et al.*, 2004); in this sense, the investigations carried out in Sinaloa to determine the impact of the disease in crop yield and quality are justifiable, in the same way the implantation of strategies for their control would be, if needed.

CONCLUSIONS

The fungi *Curvularia spicifera*, *C. muehlenbeckiae*, *C. ahavensis* and *Curvularia* sp. were implicated in foliar spot in soybean, which began in the stage of grain filling (R6). The species were identified with the analysis of its morphometric characteristics and phylogenetic reconstruction, based on a fragment of the gene *gapdh*. The *Curvularia* species were found to be pathogenic in soybean var. Nainari and they displayed different degrees of virulence. This is the first report in Mexico involving species of *Curvularia* in the etiology of leaf spot in soybean.

Peronospora manshurica y *Alternaria* spp. (Carmona *et al.*, 2015), pero estos patógenos no se detectaron durante el desarrollo del presente trabajo. Estudios en Argentina indican que las EFC reducen de 8 a 10% el rendimiento de la cosecha, con un máximo de hasta 30% (Carmona *et al.*, 2004); en este sentido, se justifica el desarrollo de investigación en Sinaloa para determinar el impacto de la enfermedad en el rendimiento y calidad de la cosecha, y de ser necesario implementar estrategias para su control.

CONCLUSIONES

Los hongos *Curvularia spicifera*, *C. muelhenbeckiae*, *C. ahvazensis* y *Curvularia* spp., se encontraron asociados a la mancha foliar de la soya la cual ocurrió a partir de la etapa de llenado de grano (R6). La identidad de las especies se realizó mediante el análisis de sus características morfológicas y reconstrucción filogenética basada en un fragmento del gen *gapdh*. Las especies de *Curvularia* resultaron patogénicas en soya var. Nainari y mostraron diferentes grados de virulencia. Este es el primer reporte en México implicando especies de *Curvularia* en la etiología de la mancha foliar de la soya.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento parcial para la realización del presente estudio por parte del PFECE-SES-SEP, convocatoria 2017.

LITERATURA CITADA

Ayoubi N, Javad M, Zare R and Zafari D. 2017. First report of *Curvularia inaequalis* and *C. spicifera* causing leaf blight and fruit rot of strawberry in Iran. *Nova Hedwigia* 105(1-2): 75-85. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2017/0402

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the partial funding of the present study by PFECE-SES-SEP, 2017.

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

- Bandara AY, Weerasooriya DK, Bradley CA, Allen TW and Esker PD. 2020. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS ONE* 15: e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>
- Berbee M, Pirseyedi M and Hubbard S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977. <https://doi.org/10.2307/3761627>
- Carmona M, Sautua F, Perelman S, Gally M and Reis EM. 2015. Development and validation of a fungicide scoring system for management of late season soybean diseases in Argentina. *Crop Protection* 70: 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.019>
- Carmona M, Moschini R, Cazenave G y Sautua F. 2010. Relación entre la precipitación registrada en estados productivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikushii*. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 71-78. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000200001>
- Carmona M, Gally M, Grijalba P, Sugia V and Jaeggi E. 2004. Frequency and chemical control of causal pathogens of soybean late season diseases in the Pampeana Region. 7<sup>th</sup> World Soybean Research Conference, 4<sup>th</sup> International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congreso Mundial de Soja, 29 de febrero al 5 de marzo de 2004. Foz de Iguazú, Brasil. 159p.
- De Lisi V, Reznikov S, Aguaysol NC, Martínez CV, Claps MP, Bernal ML, Gomez EN, Martinez-Monteros MJ, Villafañe P, Escobar M, Gonzalez V y Ploper LD. 2015. Enfermedades presentes en la campaña de soja 2014/2015 en el NOA. *Publicación Especial EEAOC* 51: 112-118. <http://hdl.handle.net/11336/15007>
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. *Statistical Yearbook. World Food and Agriculture*. 366p. <https://doi.org/10.4060/cb1329en>. (Consulta junio 2021).
- Fehr WR and Caviness CE. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University. *Special Report* 87. 13p. <http://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>
- Ferdinandez RSKHS, Udayanga D, Deshapriya N, Munasinghe MLAMS and Manamgoda DS. 2019. Species limits in



- Curvularia*: Updated backbone phylogeny and fresh collections from Sri Lanka. International Research Conference of UWU-2019. <http://www.erepo.lib.uwu.ac.lk/bitstream/handle/123456789/65/24.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Flores-Córdova MA, Martínez-Damián MT, Nieto-Ángel D, Rodríguez-Pérez JE, Colinas-León MT y Martínez-Solis J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 180-190. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509009>
- Gómez KA and Gómez AA. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and sons Inc. New York, USA. 680p.
- 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.
- Heidari K, Mehrabi-Koushki M and Farokhinejad R. 2018. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov., a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere* 9(4): 635-646. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/4/2>
- Kelly KL and Judd DE. 1976. *Color Universal language and dictionary of names*. National Bureau of standards (U.S.). Special publication 440. 184p.
- Kim YK, Xiao CK and Rogers JD. 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphareopsis pyripitrescens*. *Mycologia* 97(1): 25-32. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.25>
- Kiss N, Homa M, Manikandan P, Mythili A, Krizsán K, Revathi R., Varga M, Papp T, Vágvölgyi C, Kredics L and Kocsubé S. 2019. New species of the genus *Curvularia*: *C. tamilnaduensis* and *C. coimbatorensis* from fungal keratitis cases in South India. *Pathogens* 9(1):9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010009>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology Evolution* 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Little TM and Hills FJ. 1973. *Agricultural Experimentation and Analysis*. John Wiley and Sons. New York, USA. 350p.
- Madrid H, Da Cunha KC, Gené J, Dijksterhuis J, Cano J, Sutton DA, Guarro J and Crous PW. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33(1): 48-60. <https://doi.org/10.3767/003158514X683538>
- Manamgoda DS, Rossman AY and Castlebury LA. 2015. A taxonomic and phylogenetic reappraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 212(3): 175-198. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.3.1>
- Maraite M, Zinno TD, Longree H, Daumerie V and Duveiller E. 1997. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. In: Duveiller E, Duvin HJ, Reeves J, and MacNab A (eds). *Helminthosporium* blight of wheat: Spot blotch and tan spot. CIMMYT. 293-300p.
- Marin-Felix Y, Hernández-Restrepo M and Crous PW. 2020. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress* 19(6):559-588. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>
- Mehrabi-Koushki M, Pooladi P, Eisvand P and Babaahmadi G. 2018. *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhani* spp. nov. from Iran. *Mycosphere* 9(6):1173-1186. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/9/6/7>
- Mwase WF and Kapoora RG. 2000. Incidence and severity of frogeye leaf spot and associated yield losses in soybeans in agroecological zone II of Zambia. *Mycopathologia* 149(2):73-78. <https://doi.org/10.1023/A:1007126225457>
- Prieto KR, de Medeiros LS, Isidoro MM, Toffano L, da Silva MFGF, Fernandes JB, Vieira PC, Forim MR, Rodrigues-Filho E, Stuart RM and Machadob MA. 2016. Rapid determination of ACTG-and AK-toxins in *Alternaria alternata* by LC-ESI-MS/MS Analysis and antifungal properties of citrus compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27(8):1493-1505. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160195>
- Qostal S, Kribel S, Chliyah M, Selmaoui K, Ouazzani A, Serghat S, Zaarati H, Benkirane R and Douira A. 2019. *Curvularia spicifera*, a parasite of the fungal complex of root rot of wheat and barley in Morocco. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 20(9-10):354-365. <https://www.ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/4627>
- Rambaut A. 2014. FigTree v1.4.2, A Graphical Viewer of Phylogenetic Trees. Available from <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>.
- Reznikov S, de Lisi V, Escobar M, Claps MP, Bleckwedel J, Gutierrez H, Daniel F, Gonzalez V, Ledesma F, Devani MR and Ploper LD. 2018. Panorama sanitario del cultivo de la soja en el noroeste argentino durante la campaña 2017/2018. *Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes; Soja en el NOA; 54(9):1-5* <http://hdl.handle.net/11336/95779>
- Rodríguez-Cota FG, Cortez-Mondaca E, Saucedo-Cota RH, Valenzuela-Herrera V y Macías-Cervantes J. 2019. Tecnología para producir soja en Sinaloa. *Campo Experimental Valle del Fuerte, INIFAP, Folleto Técnico No. 45*. Juan José Ríos, Sin., México. 48p.
- SAS, Institute Inc. 1999. *SAS user's guide: Statistics*. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo "Modalidad riego + temporal, Primavera-verano". SAGARPA, D.F. México. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenDelegacion.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. *Panorama Agroalimentario 2020*. Ciudad de México. 200p. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2020/11/Atlas-Agroalimentario-2020.pdf>
- Soares RM, Godoy CV y Oliveira MCN. 2009. Diagrammatic scale for severity evaluation of soybean target spot. *Tropical Plant Pathology* 34(5): 333-338. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000500007>
- Stewart S y Rodríguez M. 2016. *Manual de identificación de enfermedades de la soja*. 2a edición ampliada y corregida



- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay. Boletín de Divulgación No 4. 74p.
- Sumabat LG, Kemerait RC, Kim DK, Mehta YR and Brewer MT. 2018. Clonality and geographic structure of host-specialized populations of *Corynespora cassiicola* causing emerging target spot epidemics in the southeastern United States. PLoS ONE 13: e0205849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205849>.
- Tan YP, Crous PW and Shivas RG. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. MycoKeys 35: 1-25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>
- Teramoto A, Meyer MC, Suassuna ND and Cunha MG. 2017. *In vitro* sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. Summa Phytopathologica 43(4): 281-289. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2195>
- Tomaso-Peterson M, Jo YK, Vines PL and Hoffmann FG. 2016. *Curvularia malina* sp. nov. incites a new disease of warm-season turfgrasses in the southeastern United States. Mycologia 108(5): 915-924. <https://doi.org/10.3852/15-238>

# Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes

## Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cormo en gladiolo, mediante estreptomicetos

Tania Ameyally Rios-Hernández, Alberto Uc-Varguez\*, Zahaed Evangelista-Martínez, Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. Subsede sureste. Tablaje catastral 31264 km 5.5. carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. Parque Científico y Tecnológico de Yucatán. C.P. 97302. Mérida, Yucatán, México. \*Autor de correspondencia: auc@ciatej.mx

Recibido: 31 de Mayo, 2021.

Aceptado: 03 de Agosto, 2021.

Rios-Hernández TA, Uc-Varguez A and Evangelista-Martínez Z. 2021. Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 391-413.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2105-3>

Primera publicación DOI: 19 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 19, 2021.

**Resumen.** *Fusarium oxysporum* causa la pudrición del cormo en gladiolo provocando pérdidas de hasta el 100%. Se seleccionaron aislados de *Fusarium* a partir de cormos infectados, se identificó morfológica y molecularmente y se seleccionó un aislado a partir de prueba de patogenicidad. Se seleccionó entre 22 aislados de estreptomicetos una cepa que presentó una actividad antagonista del 40% contra *Fusarium*. Se obtuvo el Extracto Bioactivo (EB) mediante Fermentación en Fase Sólida

**Abstract.** *Fusarium oxysporum* causes gladiolus corm rot and production damage could reach up to 100%. *Fusarium* isolates were selected from infected corms, one of them was morphologically and molecularly identified, and was selected from pathogenicity testing. One strain from 22 streptomycetes isolates that showed a 40% antagonist activity against *Fusarium* was selected. Bioactive extract (BE) was obtained by Solid Phase Fermentation and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) were determined by the microdilution method. A MIC of 0.19 mg mL<sup>-1</sup> and an MLC of 0.38 mg mL<sup>-1</sup> were obtained, which was confirmed with a conidia germination test at 8 h, which showed inhibition percentage of 17 and 98% for ¼ and ½ of the MIC. The effect of BE was evaluated at 1 and 2 MIC's concentration against corm rot in infected gladiolus corm, obtaining a protective effect of gladiolus corms and maintaining their hardness after 15 days, in comparison with

y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima letal (MLC) por el método de microdilución. Se obtuvo una MIC para el EB de 0.19 mg mL<sup>-1</sup> y una MLC de 0.38 mg mL<sup>-1</sup>, que se confirmó con un ensayo de germinación de microconidios a 8 h, mostrando un porcentaje de inhibición del 17 y 98% para ¼ y ½ de la MIC. Se evaluó el efecto del EB a 1 y 2 MIC's de concentración contra la pudrición en cormos de gladiolo infectados, obteniendo un efecto protector en los cormos al mantener su dureza después de 15 días, en comparación con el fungicida Carbendazim. Los resultados indican a *Streptomyces* sp., como un potencial agente de control biológico contra *F. oxysporum*.

**Palabras clave:** *Gladiolus grandiflorus*, Actinobacterias, actividad antifúngica, cormos, efecto protector.

En México, el cultivo de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*) es considerado el tercer cultivo ornamental por su importancia económica, con un valor de producción de 1,136 360.17 miles de pesos durante el 2020 (SIAP, 2020). Sin embargo, diversos factores pueden disminuir el volumen y calidad de la producción del gladiolo, entre los que sobresalen problemas fitosanitarios ocasionados por hongos, bacterias y virus (Elmer y Kamo, 2018).

La pudrición del cormo, inducida por *Fusarium oxysporum* f sp. *gladioli*, es una de las enfermedades más importantes del gladiolo, al provocar la marchitez y amarillamiento de hojas y una pudrición seca en la base del cormo que afecta la calidad de la vara floral (Khan *et al.*, 2017). La pudrición del cormo se observa como un cambio en la coloración que va, de marrón claro a marrón oscuro a negro y finaliza con la momificación del cormo. Cuando la infección ocurre en los cormos almacenados en

the fungicide Carbendazim. These results indicate *Streptomyces* sp., as a potential biological control agent against *F. oxysporum*.

**Key words:** *Gladiolus grandiflorus*, Actinobacterias, fungal activity, corms, protective effect.

In Mexico, the gladiolus crop (*Gladiolus grandiflorus*) is considered the third most economically important ornamental crop, with a production value of over 1.1 billion pesos in 2020 (SIAP, 2020). However, several factors may reduce the volume and quality of the gladiolus production, including phytosanitary problems caused by fungi, bacteria and viruses (Elmer and Kamo, 2018).

Corm rot, induced by *Fusarium oxysporum* f sp. *gladioli*, is one of the most important disease in the gladiolus, since it causes the wilting and yellowing of leaves and a dry rot in the base of the corm that affects the quality of the floral rod (Khan *et al.*, 2017). The appearance of the corm rot is a change in coloring which goes from light maroon to dark maroon to black and ends with the mummification of the corm. When the infection takes place in refrigerated corms, it causes a severe infection which may lead to the death of the plant and/or economic losses of 60 to 100% of the production (Khan *et al.*, 2017; Elmer y Kamo, 2018).

*Fusarium oxysporum* is a cosmopolitan fungus that can survive for years in the soil without the presence of the host. On the other hand, the use of fungicides based on benzimidazoles and azoles is the commonly used control method. Considering that the persistence of the pathogen increases the use of agrochemicals for the phytosanitary control of the crops, another series of problems arises, such as the selection of strains of the pathogen that resist these products, the increase in production costs, and

refrigeración, ocasiona una infección severa que puede llevar a la muerte de la planta y/o pérdidas económicas del 60 al 100% de la producción (Khan *et al.*, 2017; Elmer y Kamo, 2018).

*Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que puede sobrevivir por años en el suelo sin la presencia del hospedante. Por otra parte, el uso de fungicidas a base de bencimidazoles y azoles es el método de control utilizado generalmente. Considerando que la persistencia del patógeno incrementa la aplicación de agroquímicos para el control fitosanitario de los cultivos, se genera otra serie de problemas como: la selección de cepas del patógeno resistente a estos productos, el incremento de costos de producción, además los riesgos de daño al ambiente y la salud humana, los cuales son cada vez mayores (Al-Hatmi *et al.*, 2019; Marx-Stoelting *et al.*, 2020).

Considerando lo anterior, es necesario llevar a cabo la búsqueda de alternativas económicas y ecológicamente viables para el manejo de este patógeno (Alizadeh *et al.*, 2020). Entre las alternativas económica y ambientalmente sustentables, se encuentra el uso de microorganismos para el control de diversos hongos y bacterias fitopatógenas (Goredema *et al.*, 2020). Al respecto, se han reportado bacterias del género *Streptomyces* como antagonistas a diversos hongos patógenos. El antagonismo de los estreptomicetos se debe a la producción de metabolitos secundarios con actividad fungicida en combinación con enzimas extracelulares del tipo quitinasas y pectinasas (Pedroza *et al.*, 2019; Danial *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). La cepa CACIS-1.16CA (*Streptomyces* sp.) es una especie que produce una mezcla de metabolitos de color amarillo solubles en agua, que

the risk of damages to the environment and human health, which are increasingly larger (Al-Hatmi *et al.*, 2019; Marx-Stoelting *et al.*, 2020).

Considering this, it is crucial to search for cheap and ecologically viable alternatives for the control of this pathogen (Alizadeh *et al.*, 2020). One of the cheap and environmentally sustainable alternatives is the use of microorganisms to control diverse fungi and phytopathogenic bacteria (Goredema *et al.*, 2020). In this regard, bacteria of the genus *Streptomyces* have been reported as antagonists to several pathogenic fungi. The antagonism of the streptomycetes is due to the production of secondary metabolites with fungicidal activity in combination with extracellular enzymes of the type of chitinases and pectinases (Pedroza *et al.*, 2019; Danial *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). The strain CACIS-1.16CA (*Streptomyces* sp.) is a species that produces a mixture of yellow metabolites, which are soluble in water and have an inhibiting effect on the growth of phytopathogenic fungi in the genera *Curvularia*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* and *Rhizoctonia* (Evangelista-Martínez, 2014). In the biopesticide market there are two commercial products that are based on *Streptomyces* species, such as *S. lydicus* WYEC108 and *S. griseoviridis* K61, both of which control species of *Fusarium* spp. in different crops (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020; Shrestha *et al.*, 2020). The aim of this investigation was to select antagonistic streptomycetes against *F. oxysporum* and to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the inhibiting activity of the bioactive extract of *Streptomyces* sp. isolations to control the rotting of corms in gladiolus.

ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de los géneros *Curvularia*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia* (Evangelista-Martínez, 2014). En el mercado de los biopesticidas, existen dos productos comerciales que se basan en especies de *Streptomyces*, tal como *S. lydicus* WYEC108 y *S. griseoviridis* K61, ambas controlan especies de *Fusarium* spp., en diferentes cultivos (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020; Shrestha *et al.*, 2020). El objetivo de este trabajo fue seleccionar estreptomicetos antagonistas contra *F. oxysporum* y evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad inhibitoria del extracto bioactivo de aislados de *Streptomyces* sp., para controlar el desarrollo de pudrición en cormos de gladiolo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento y caracterización del hongo patógeno.** A partir de un lote de 60 cormos de gladiolo de la variedad borrega blanca, provenientes del Estado de México y con síntomas de pudrición del cormo (Figura 1), se seleccionaron seis cormos a partir de los cuales se aisló y purificó a tres aislados del hongo *Fusarium* sp. (GL1, GL2 y GL3). Se obtuvieron cultivos monospóricos siguiendo el protocolo reportado por González-Pérez *et al.* (2009) y se mantuvieron en cajas de Petri con medio de cultivo agar, dextrosa y papa (PDA), incubados en oscuridad a una temperatura de 27 °C.

La caracterización morfológica de los hongos aislados se realizó de acuerdo con caracteres descritos por Leslie *et al.* (2006). La identificación a nivel de género se realizó comparando las características morfológicas de la colonia (forma y color de la colonia, tipo de hifas, presencia de clamidosporas, macro y microconidios) y se registraron la forma, longitud y ancho de 50 macroconidios y 50 microconidios seleccionados al azar.

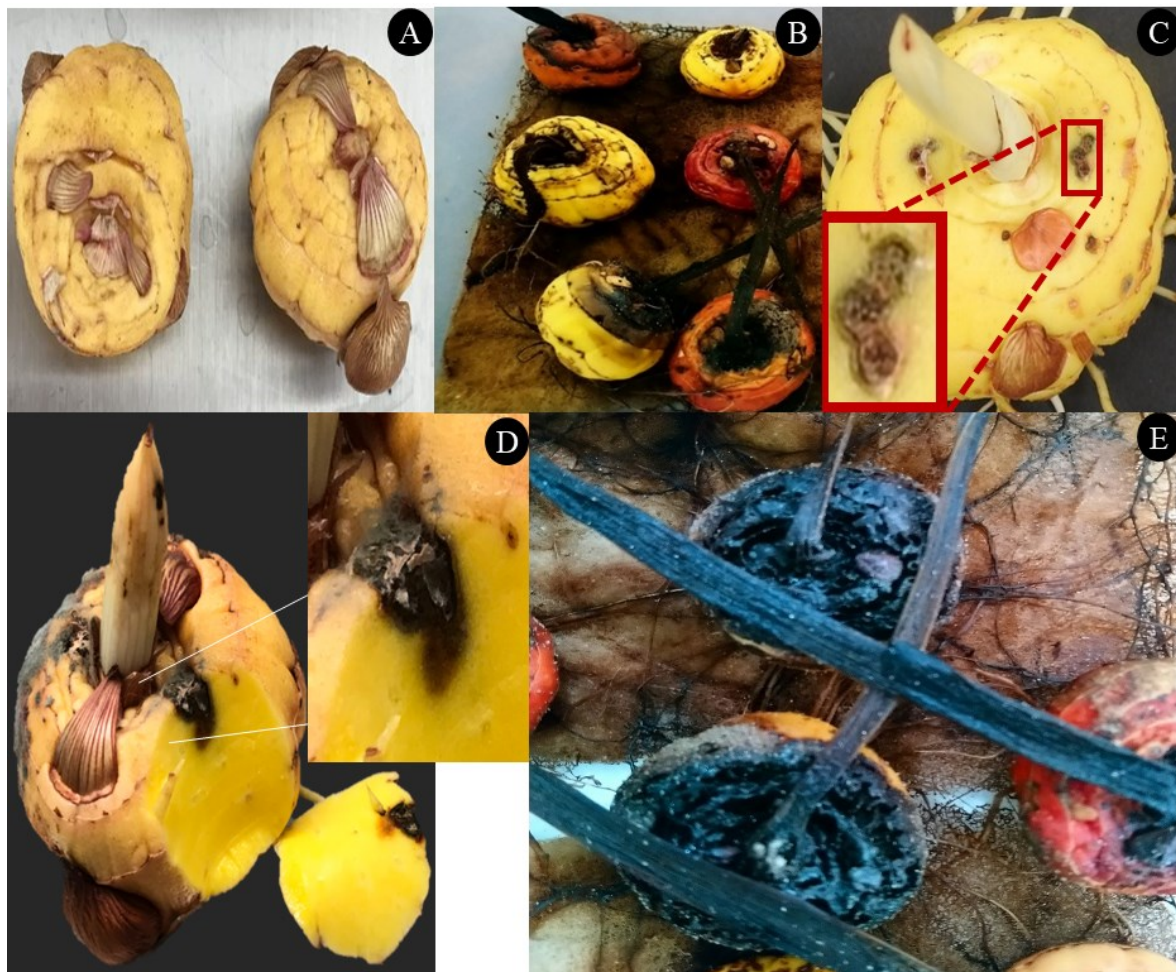
## MATERIALS AND METHODS

**Isolation and characterization of the pathogenic fungus.** From a plot of 60 gladiolus corms of the borrega blanca variety from the State of Mexico and with symptoms of corm rot (Figure 1), six corms were chosen, out of which three isolations of the fungus *Fusarium* sp. were isolated and purified (GL1, GL2 y GL3). Monosporic cultures were obtained, following the protocol reported by González-Pérez *et al.* (2009). They were then stored in Petri dishes with a potato, dextrose and agar (PDA) culture medium, and incubated in the dark at a temperature of 27 °C.

The morphological characterization of the fungi was carried out according to the characteristics described by Leslie *et al.* (2006). The identification at a genus level was carried out by comparing the morphological characteristics of the culture (shape and color of the culture, type of hyphae, presence of chlamidospores, macro and microconidia) and the shape, length and width of 50 macroconidia and 50 microconidia, chosen at random, were registered.

**Molecular identification.** Out of one of the three *Fusarium* spp. isolations, one monosporic culture of the isolation GL1 was chosen for its pathogenicity and growth rate *in vitro*. The molecular identification of the fungus was carried out with DNA extraction, following the extraction protocol with DNazol (Life Technologies), with some modifications. The amplification by PCR of the fragments of the gene that codifies for  $\beta$ -Tubulin was carried out with oligonucleotides T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and T2 (5'-TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3') (O'Donnell and Cigelnik, 1997), Histone 3 with oligonucleotides H3-1b (5'-CGCGGCGAGACTGGATGTCCTT-3'), H3-1a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') (He *et al.*, 2017), elongation factor 1 $\alpha$  with oligonucleotides EF-1





**Figura 1.** Cormos de gladiolo asintomáticos de la variedad borrega blanca (A). Cormos con síntomas de pudrición donde se aisló a *F. oxysporum* (B), los cuales fueron reproducidos mediante dos heridas realizadas con tres punciones y deposición de una solución de 5  $\mu\text{L}$  de conidios a una concentración de  $2.4 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *F. oxysporum* GL1 (C). El corte perpendicular en el sitio de las heridas, muestra que a los 20 días después de la inoculación, la pudrición avanza en el interior del cormo (D) y después de tres a cuatro meses el cormo presenta una pudrición seca y oscura (E).

**Figure 1.** Corms from asymptomatic gladiolus of the variety borrega blanca (A). Corms with symptoms of rotting where *F. oxysporum* was isolated (B), which were reproduced with two cuts made with three punctures and the addition of 5  $\mu\text{L}$  of a conidia solution at a concentration of  $2.4 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of *F. oxysporum* GL1 (C). The perpendicular cut in the place of the wounds shows that 20 days after inoculation, rotting progresses inside the corm (D) and after three to four months, the corm displays a dry and dark rot (E).

**Identificación molecular.** A partir de uno de los tres aislados de *Fusarium* spp., se seleccionó por su patogenicidad y velocidad de crecimiento *in vitro*, una colonia monoesporica del aislado GL1. La identificación molecular del hongo se realizó mediante

(5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATG TT-3') (Herkert *et al.*, 2019), and finally, region ITS, using the universal oligonucleotides ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5

la extracción de ADN, siguiendo el protocolo de extracción con DNazol (Life Technologies), con algunas modificaciones. La amplificación por PCR de los fragmentos del gen que codifica para la  $\beta$ -Tubulina se realizó con los oligonucleótidos T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') y T2 (5'-TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3') (O'Donnell & Cigelnik, 1997), Histona 3 con los oligonucleótidos H3-1b (5'-CGCGGCGAGACTGGATGTCCTT-3'), H3-1a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') (He *et al.*, 2017), factor de elongación-1 $\alpha$  con los oligonucleótidos EF-1 (5'-ATGGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (Herkert *et al.*, 2019) y finalmente la región ITS utilizando oligonucleótidos universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') siguiendo el protocolo y condiciones de amplificación reportados previamente (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012; Uc-Varguez *et al.*, 2018). Los fragmentos amplificados fueron purificados y enviados para su secuenciación a MACROGEN en Korea. La secuencia resultante, fue editada con el programa edit sequence (DNASTAR) y posteriormente se compararon con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, con ayuda del algoritmo de BLAST disponible en Internet.

**Preparación del inóculo.** La suspensión de conidios empleada para obtener la MIC, MLC y para los experimentos de infección de los cormos, se preparó a partir de un cultivo del hongo crecido por 11 días en cajas Petri con medio PDA. A una caja Petri con el hongo, se le agregó 5 mL de agua destilada estéril para remover la masa de conidios. La suspensión se filtró a través de varias capas de gasa y algodón para descartar residuos de micelio. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm/10 min a 25 °C. El precipitado de conidios se lavó dos veces

(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), following the protocol and amplification conditions reported earlier (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012; Uc-Varguez *et al.*, 2018). The amplified fragments were purified and sent for sequencing to MACROGEN in Korea. The resulting sequence was edited using a sequence editing program (DNASTAR) and later compared with sequences reported in the NCBI data base, using the BLAST algorithm available on the Internet.

**Preparation of the inoculant.** The conidial suspension used to obtain the MIC, MLC and for the corm infection experiments was prepared from a culture of the fungus grown for 11 days in Petri dishes with PDA medium. One Petri dish with the fungus was added 5 mL of sterile distilled water to remove the mass of conidia. The suspension was filtered through several layers of gauze and cotton to discard mycelial residues. The suspension was centrifuged at 6000 rpm/10 min at 25 °C. The conidial precipitate was washed twice with sterile distilled water, then resuspended and, using a Neubauer chamber, the concentration was adjusted to  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> or  $2.4 \times 10^6$ , according to the activity to be carried out *in vitro* or *in vivo*, respectively.

**Pathogenicity test of the *Fusarium* sp. isolation.** The pathogenicity of the fungus isolations was verified by inoculating 30 gladiolus corms. All corms were disinfected by submersion into a 0.3% NaOCl solution for 2 min, rinsed with sterile distilled water for 1 min, followed by submersion in 70% ethanol for 2 min and rinsed with sterile distilled water for 1 min. Finally, the excess moisture was eliminated using sterile paper towels (González-Pérez *et al.*, 2009).

The disinfected corms were inoculated experimentally, with two cuts made in the upper

con agua destilada estéril, luego se resuspendió y con ayuda de la cámara de Neubauer se ajustó la concentración a  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  o  $2.4 \times 10^6$  según la actividad a realizar *in vitro* o *in vivo* respectivamente.

**Prueba de patogenicidad del aislado de *Fusarium* sp.** La patogenicidad de los aislados del hongo se verificó mediante inoculación de 30 cormos de gladiolo. Todos los cormos fueron desinfectados por inmersión en una solución de NaOCl al 0.3%/2 min, enjuagados con agua destilada estéril/1 min, seguido por una inmersión en etanol al 70%/2 min, y enjuagados con agua destilada estéril/1 min. Al final, el exceso de humedad se eliminó con papel absorbente estéril (González-Pérez *et al.*, 2009).

Los cormos desinfectados fueron inoculados experimentalmente, mediante dos heridas hechas en la parte superior del cormo con tres punciones (por herida) realizadas con un palillo estéril. Posteriormente, en cada herida se depositó 5  $\mu\text{L}$  de una solución de  $2.4 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *F. oxysporum*, obtenidos de una colonia con 11 días de crecimiento en medio PDA. Todos los cormos incluyendo controles inoculados con agua destilada estéril, fueron incubados en condiciones de oscuridad en una cámara bioclimática a 25 °C y 70% de humedad. El registro sintomatológico se realizó a intervalos de cinco días durante 30 días. Finalmente, los cormos se mantuvieron por cuatro meses bajo las mismas condiciones y solo se registró el síntoma final (González-Pérez *et al.*, 2009).

**Crecimiento de *Streptomyces* spp.** Cultivos de 22 cepas de *Streptomyces* se obtuvieron del banco de germoplasma de Actinomicetos conservado en la Subsección Sureste del CIATEJ, provenientes de suelos de Aguascalientes, Campeche, Hidalgo y Yucatán. Adicionalmente, en los ensayos se utilizó como cepa control a *Streptomyces lydicus* WYEC

part of the corm with three punctures (per cut) with a sterile toothpick. Later, in each cut, we placed 5  $\mu\text{L}$  of a solution of  $2.4 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of *F. oxysporum*, obtained from a culture with 11 days of growth in a PDA medium. All corms, including the controls inoculated with sterile distilled water, were incubated in the dark in a bioclimatic chamber at 25 °C and 70% humidity. Symptoms were recorded in intervals of five days for 30 days. Finally, the corms were kept for four months under the same conditions and only the final symptom was recorded (González-Pérez *et al.*, 2009).

**Growth of *Streptomyces* spp.** Cultures of 22 strains of *Streptomyces* were obtained from the Actinomycetes germplasm bank in the CIATEJ of the southeast, taken from soils from the states Aguascalientes, Campeche, Hidalgo and Yucatan. Additionally, in the trials, *Streptomyces lydicus* WYEC 108 was used as a control strain. All strains were grown in an International Streptomyces Project 2 (ISP 2) agar medium, at a temperature of 29 °C for 14 days. For the antagonism experiments, a general inoculant (GI) was prepared, consisting of spores from each strain at a concentration of  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Evangelista-Martínez, 2014).

**Antagonistic evaluation of streptomycetes against *F. oxysporum*.** The antagonistic activity of the 22 *Streptomyces* strains was carried out by dual confrontation tests in an ISP2 medium (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). We inoculated 3 mL of the GI on the edge of the Petri dish with the ISP 2 medium, and in the middle of the dish, we placed an agar disk with active mycelia from a *F. oxysporum* culture with an 11-day growth in PDA. The cultures were kept at 29 °C for 11 days and the growth of the fungus was measured, in the direction of a streptomycete, using a digital caliper (Caldi-6MP Truper). The percentage of



108. Todas las cepas se crecieron en medio agar International Streptomyces Project 2 (ISP 2) a una temperatura de 29 °C durante 14 días. Para los experimentos de antagonismo se preparó un inóculo general (IG) que consistió de esporas de cada cepa a una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Evangelista-Martínez, 2014).

**Evaluación antagonica de estreptomicetos contra *F. oxysporum*.** La actividad antagonica de las 22 cepas de *Streptomyces* se realizó mediante ensayos de confrontación dual en medio ISP2 (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). Se inocularon 3 mL del IG en el borde de la caja Petri con el medio ISP 2 y al centro de la caja se depositó un disco de agar con micelio activo de un cultivo de *F. oxysporum* de 11 días de crecimiento en PDA. Los cultivos se mantuvieron a 29 °C durante 11 días y se midió el crecimiento del hongo en dirección del estreptomiceto mediante un vernier digital (Caldi-6MP Truper). El porcentaje de inhibición (PI) se calculó a partir de la fórmula:  $PI (\%) = \frac{(FR - AR)}{FR * 100}$  en donde “FR” representa el radio de crecimiento (mm) del hongo en la caja control y “AR” es el radio de crecimiento del hongo en dirección al crecimiento de *Streptomyces* (Dikhoba *et al.*, 2019).

**Obtención del extracto bioactivo (EB) de *Streptomyces* sp.** El extracto bioactivo de los dos aislados con mayor actividad antagonica (*Streptomyces* sp. GCAL-9 y CACIS 1.6 CA), se obtuvo mediante una fermentación en fase sólida (FES) empleando espuma de poliuretano (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). El soporte tenía una dimensión de 12 x 10 x 2.5 cm, al cual se le agregó 70 mL de caldo ISP2 inoculado con una suspensión de esporas de cada uno de los estreptomicetos, ajustando la turbidez a una DO<sub>450</sub> de aproximadamente 1.0. La FES se realizó en recipientes de plástico estéril

inhibición (PI) was calculated using the formula  $PI (\%) = \frac{(FR - AR)}{FR * 100}$ , where “FR” represents the growth radius (mm) of the fungus in the control dish and “AR” is the radius of the fungal growth in the direction of the growth of *Streptomyces* (Dikhoba *et al.*, 2019).

**Obtaining the Bioactive extract (BE) of *Streptomyces* sp.** The bioactive extract of the two isolations with the greatest antagonistic activity (*Streptomyces* sp. GCAL-9 and CACIS 1.6 CA) was obtained by fermentation in a solid phase (FES), using polyurethane foam (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). The support measured 12 x 10 x 2.5 cm, and 70 mL of ISP2 broth, inoculated with a suspension of spores from each one of the streptomycetes was added, adjusting the turbidity to a DO<sub>450</sub> of approximately 1.0. The FES was carried out in sterile plastic containers for the *in vitro* cultivation of plants. The ISP2 broth was inoculated. The dishes were then closed and incubated in the dark at 29 °C for 21 days. The BE produced was separated from the cells by a series of filtrations, starting with Whatman No 3. Filter paper, followed by Whatman No. 1, 0.65 µm micropore filter, and ending in a 0.22 µm Micropore filter. The extract was stored at 4 °C until use (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020).

**MIC and MLC with the method of microdilution.** The minimum inhibiting concentration of the bioactive extract was carried out using 96 well plates in the potato dextrose broth medium (PDB) as per the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). The MIC tests were carried out in sterile microplates with 96 wells containing 100 µL of PDB broth. Later, the samples to be evaluated were added in each well of the first column, ending with a volume of 200 µL. The wells

para cultivo *in vitro* de plantas. El caldo ISP2 se inoculó. Posteriormente, las cajas se cerraron e incubaron en condiciones de oscuridad a 29 °C por 21 días. El EB producido se separó de las células mediante filtraciones en serie, iniciando con papel filtro Whatman No 3., seguido de papel Whatman No. 1, filtro micropore de 0.65 µm hasta terminar con un filtro Micropore de 0.22 µm. El extracto se almacenó a 4 °C hasta su uso (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020).

#### **MIC y MLC por el método de microdilución.**

La concentración mínima inhibitoria del extracto bioactivo se realizó empleando placas de 96 pozos en el medio caldo papa dextrosa (PDB) de acuerdo a la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Las pruebas MICs se realizaron en microplacas estériles de 96 pozos conteniendo 100 µL de caldo PDB. Posteriormente, a cada pozo ubicado en la primera columna se le adicionaron las muestras a evaluar, finalizando con un volumen de 200 µL. Los pozos de la primera columna con las diferentes muestras, se homogenizaron y tomaron 100 µL de cada pozo y colocaron en los pozos de la segunda columna y así sucesivamente, de manera que la concentración en el primer pozo quedó a la mitad respecto a la concentración en la solución (two-fold dilutions). Una vez terminadas las diluciones, a cada pozo se le agregó 100 µL de conidios ajustados a  $1 \times 10^5$  conidios mL<sup>-1</sup>, se mezclaron y mantuvieron en incubación a 29 °C. La inhibición del crecimiento del hongo se determinó a las 24, 48 y 72 h mediante adición de resazurina (Barua *et al.*, 2017). La resazurina se empleó como indicador de crecimiento del hongo, cuando la solución fue de color azul se consideró inhibición del crecimiento, mientras que la coloración rosa indicó crecimiento o ausencia de inhibición. La MIC se definió como la menor concentración del EB que inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*.

of the first column with the different samples were homogenized and 100 µL were taken from each well and placed in the wells of the second column, and so on, so the concentration in the first well is half of that of the concentration of the solution (two-fold dilutions). After finishing the dilutions, 100 µL of conidia were added, adjusted to  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>; they were mixed and incubated at 29 °C. The inhibition of the fungal growth was determined after 24, 48 and 72 h by adding resazurin (Barua *et al.*, 2017). The resazurin was used as a fungal growth indicator, and when the solution turned blue, it indicated growth inhibition, whereas when it was pink, it indicated growth or the absence of inhibition. The MIC was defined as the lowest concentration of the BE that inhibited the growth of *F. oxysporum*.

The value of the minimum lethal concentration (MLC) was determined when subcultivating directly from the plate used to calculate the MIC, 5 µL for the cell mass of the fungus of each well in the microplate with PDB broth. The cultures were kept at 29 °C for three days until mycelial growth was observed. The fungal growth after this period indicated fungistatic control, whereas the absence of growth indicated fungicidal activity of the BE. The MLC was defined as the lowest concentration in which there was no growth of the fungus. The BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9 and CACIS 1.6 CA was analyzed in duplicate in two independent experiments. As the growth control, the product carbendazim (Syngenta) was used, prepared at a concentration of 72.8 mg mL<sup>-1</sup>.

**Effect of the BE on the germination of microconidia.** The inhibiting activity of the BE was evaluated with a test of the inhibition of the germination of the conidia. The test was carried out on a slide with a well with a final volume of 40 µL containing 20 µL of PDB broth mixed with



El valor de la concentración mínima letal (MLC) se determinó al subcultivar directamente de la placa usada para el cálculo de la MIC, 5 mL de la masa celular del hongo de cada pozo en microplaca con caldo PDB. Los cultivos se mantuvieron a 29 °C por tres días hasta observar crecimiento micelial. El crecimiento del hongo después de este periodo fue indicativo de control fungistático, mientras que la ausencia de crecimiento indicó actividad fungicida del EB. La MLC se definió como la menor concentración en la que no existió crecimiento del hongo. El EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9 y CACIS 1.6 CA, se analizó por duplicado en dos experimentos independientes. Como control de crecimiento se empleó el producto carbendazim (Syngenta) preparado a una concentración de 72.8 mg mL<sup>-1</sup>.

**Efecto del EB sobre la germinación de microconidios.** La actividad inhibitoria del EB se evaluó mediante un ensayo de inhibición de la germinación de los conidios. El ensayo se realizó en portaobjetos con cavidad en 40 µL de volumen final que contenía 20 µL de caldo PDB mezclado con 10 µL de la suspensión de conidios de *F. oxysporum* (10<sup>5</sup> conidios mL<sup>-1</sup>) más 10 µL de la solución del EB a diferentes concentraciones. Las concentraciones evaluadas fueron a ¼, ½, 1, 4, 6 y 8 MIC's (0.0475, 0.095, 0.19, 0.38, 1.14, 1.52 mg mL<sup>-1</sup>). Enseguida se colocó un cubreobjetos y se mantuvieron en una cámara húmeda a 29 °C en oscuridad. Como control se usó agua destilada estéril. El efecto sobre la germinación se determinó cada hora durante 8 horas de crecimiento, empleando un microscopio invertido (modelo Olympus), contabilizando 100 conidios al azar, separando los conidios germinados de los que aún no lo estaban (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). El experimento se llevó a cabo por triplicado y la evaluación se basó en la presencia del tubo de germinación. Un conidio se consideró germinado, si el tubo de germinación alcanzó el doble

10 µL of the suspension of *F. oxysporum* conidia (10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) plus 10 µL of the BE solution at different concentrations. The concentrations evaluated were ¼, ½, 1, 4, 6 and 8 MIC's (0.0475, 0.095, 0.19, 0.38, 1.14, 1.52 mg mL<sup>-1</sup>). A slide was then placed and kept in a humid chamber at 29 °C in the dark. Sterile distilled water was used as a control. The effect on germination was determined every hour for 8 hours of growth, using an inverted microscope (Olympus), counting 100 conidia at random, separating the germinated conidia from the yet ungerminated ones (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). The experiment was carried out in triplicate and the evaluation was based on the presence of the germination tube. A conidium was considered germinated if the germination tube reached a diameter twice that of the diameter of the conidium. Results were expressed as the percentage of germinated conidia (PG) in comparison with the control, based on the following formula (Zhang *et al.*, 2020):

$$\text{Percentage of germinated} = \left( \frac{\text{Number of germinated conidia}}{\text{Number of total conidia}} \right) \times 100$$

**Fungicidal activity of the BE.** The fungicidal potential of the BE on *F. oxysporum* was evaluated by carrying out spore germination tests at different concentrations and following up on different times of contact with the conidia. The experiments were carried out using the microdilution method described earlier. The concentrations of the BE were 1, 2 and 3 MIC's. Carbendazim at 72.8 mg mL<sup>-1</sup> was used as a positive control. After mixing the PDB broth and the BE, 100 µL of the conidia suspension were added and homogenized. Every hour for 4 h, 5 µL of the suspension were taken from each mixture and placed in Petri dishes with

del diámetro del conidio. Los resultados se expresaron como el porcentaje de conidios germinados (PG) comparado al control, con base a la siguiente fórmula (Zhang *et al.*, 2020):

$$\text{Porcentaje de germinación} = \left( \frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Número total de conidios}} \right) \times 100$$

**Actividad fungicida del EB.** El potencial fungicida del EB sobre *F. oxysporum* se evaluó realizando ensayos de germinación de esporas a diferentes concentraciones y dando seguimiento a diferentes tiempos de contacto con los conidios. Los experimentos se realizaron por el método de microdilución previamente descrito. Las concentraciones del EB fueron 1, 2 y 3 MIC's. Como control positivo se empleó Carbendazim a 72.8 mg mL<sup>-1</sup>. Después de realizar las mezclas del caldo PDB y el EB, se agregó 100 µL de la suspensión de conidios y homogenizó. Durante cada hora y hasta completar 4 h, de cada mezcla se tomaron 5 µL de la suspensión y depositó en cajas Petri con medio PDA y se incubó a 29 °C durante tres días. Se determinó el tiempo de contacto óptimo para ejercer el efecto fungicida, en aquellas muestras donde no se presentó crecimiento.

#### **Efecto protector del EB en cormos de gladiolo.**

La evaluación del efecto del EB para el control de la pudrición en cormos de gladiolo, se realizó empleando 50 cormos de gladiolo de la variedad Red Beauty por cada tratamiento. El proceso de desinfección de los cormos y de la inoculación con la suspensión de conidios de *F. oxysporum*, se realizó como se describió previamente.

Los tratamientos evaluados fueron: a) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con agua; b) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados

a PDA medium and incubated at 29 °C for three days. The optimal time of contact for the fungicidal effect was determined in the samples where no growth was observed.

#### **Protective effect of the BE on gladiolus corms.**

The evaluation of the effect of the BE for the control of rot in gladiolus corms was carried out using 50 gladiolus corms of the Red Beauty variety for each treatment. The disinfection process of the corms and of the inoculation with the *F. oxysporum* conidia suspension was carried out as described earlier.

The treatments evaluated were a) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with water; b) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with Carbendazim (72.8 mg mL<sup>-1</sup>); c) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with BE MIC (0.19 mg mL<sup>-1</sup>) and d) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with BE and double the MIC (0.38 mg mL<sup>-1</sup>). Later, the corms in all treatments were stored in the dark in a bioclimatic chamber at 25 °C and 70% humidity.

The symptoms were registered every 5 days from time zero until 20 days after inoculation, in five corms per treatment. The variable hardness or firmness of the corms was the parameter used to determine the protective effect of the BE on the inoculated corms, using a Shimadzu® EZ-SX digital texturometer with a needle, 5 mm in diameter, on a standard base table. The compression test was carried out at a speed of 3mm/s at a depth of 0.5mm. The firmness of the corms was registered in Newtons (Morales-Pérez *et al.*, 2014).

**Data analysis.** The data registered for the PG were analyzed statistically using a multifactorial ANOVA and a test of separation of means using LSD. The data registered for corm firmness were analyzed statistically using a simple ANOVA and

con Carbendazim ( $72.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ); c) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con EB MIC ( $0.19 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y d) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con EB al doble de la MIC ( $0.38 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Posteriormente, los cormos de todos los tratamientos fueron almacenados en condiciones de oscuridad en una cámara bioclimática a  $25 \text{ °C}$  y 70% de humedad.

Los síntomas fueron registrados, cada cinco días a partir del tiempo cero hasta veinte días después de la inoculación, en cinco cormos por cada tratamiento. La variable dureza o firmeza de los cormos, fue el parámetro empleado para determinar el efecto protector del EB en los cormos inoculados, utilizando un Texturómetro digital Shimadzu® EZ-SX con una aguja de 5mm de diámetro en una mesa base estándar. La prueba de compresión se realizó a una velocidad de 3mm/s y una profundidad de 0.5mm. La dureza de los cormos se registró en Newtons (Morales-Pérez *et al.*, 2014).

**Análisis de datos.** Los datos registrados para el PG fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA multifactorial y mediante una prueba de separación de medias por LSD. Los datos registrados para la dureza del cormo fueron analizados estadísticamente mediante una ANOVA simple y una prueba de separación de medias por Tukey, con ayuda del programa Statgraphics centurión XVIII.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aislamiento y caracterización del patógeno.** A partir de cormos de gladiolo con síntomas de pudrición asociado a la presencia de *Fusarium* spp., se obtuvieron tres aislados (GL1, GL2 y GL3) con características morfológicas del género. A partir de los tres aislados de *Fusarium*, se generaron cepas monospóricas que se caracterizaron por desarrollar un micelio aéreo con tonalidades blanquecinas a

a Tukey test of separation of means, using the program Statgraphics centurión XVIII.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolation and characterization of the pathogen.

Three isolations (GL1, GL2 and GL3) with morphological characteristics of the genus were taken from gladiolus corms with symptoms of rotting related to the presence of *Fusarium* spp. From the three *Fusarium* isolations, monosporic strains were produced, characterized by the development of an aerial mycelium with whitish to orange colors, without curled hyphae. Fusiform and slightly curved macroconidia were also found, with a conical apical cell and an oval-shaped base cell, with one to three septa; the microconidia presented an oval morphology and without septa (Table 1). These characteristics coincide with those reported for *F. oxysporum* (González-Pérez *et al.*, 2009; Hafizi *et al.*, 2013; Leslie *et al.*, 2006).

### Molecular identification of the fungus isolated from corms with rot.

The analysis of the sequence of the ITS fragments (584 pb) of the *Fusarium oxysporum* GL1 isolation showed, when comparing with sequences registered in the GenBank, a similarity of 96% with ITS sequences of the genus *F. oxysporum*. The same result was obtained when analyzing the sequences of the genes that codify  $\beta$ -Tubulin (549 pb, 95% similarity), histone 3 (458 pb, 94% similarity) and elongation factor of 1 $\alpha$  (300 pb, 98% similarity). Considering the morphological characteristics and the close molecular similarity with species of the *Fusarium* genus, isolation GL1, isolated from corms with rot, belongs to *F. oxysporum*.

**Pathogenicity test of the isolation of *F. oxysporum*.** Isolation GL1 induced the appearance

naranjas, sin la presencia de hifas enrolladas. También se detectó la presencia de macroconidios fusiformes y ligeramente curvos con la célula apical cónica y la basal ovalada, entre uno y tres septos; los microconidios presentaron morfología ovalada y sin septos (Cuadro 1). Estas características coinciden con las reportadas para *F. oxysporum* (González-Pérez *et al.*, 2009; Hafizi *et al.*, 2013; Leslie *et al.*, 2006).

**Identificación molecular del hongo aislado de cormos con pudrición.** El análisis de la secuencia de los fragmentos de ITS (584 pb) del aislado *Fusarium oxysporum* GL1 mostró, al comparar con secuencias registradas en el genbank, una similitud del 96% con secuencias ITS del género *F. oxysporum*. El mismo resultado se obtuvo al analizar las secuencias de los genes que codifican a la  $\beta$ -Tubulina (549 pb, 95% de similitud), histona 3 (458 pb, 94% de similitud) y factor de elongación-1 $\alpha$  (300 pb, 98% de similitud). Considerando las

of symptoms, therefore molecular identification, as well as the *in vitro* and *in vivo* trials described were carried out using this strain. The inoculated corms presented an initial symptom after 15 days (Figure 1), which was characterized by a brown color inside the corm, as well as a loss of turgidity; superficially, the symptom was imperceptible (Figure 1C), but when the corm was cut perpendicularly, the color changed from the place of inoculation (Figure 1D). The corms dried three to four months after inoculation, becoming dark brown (Figure 1E). This corresponds with the symptoms described for the rot of gladiolus corms caused by *Fusarium* (González-Pérez *et al.*, 2009; Michel-Aceves *et al.*, 2014; Pedroza *et al.*, 2019).

**Antagonistic activity *in vitro*.** The antagonistic activity of the 22 strains of streptomycetes against the isolation of *F. oxysporum* GL1 is shown in Table 2, where we can also see, for the streptomycetes in the soil of the states of Hidalgo and Aguascalientes,

**Cuadro 1. Características macroscópicas y microscópicas registrados de la colonia monospórica de *F. oxysporum* GL1 aislada a partir de cormos de gladiolo con síntomas de pudrición.**

**Table 1. Registered macroscopic and microscopic characteristics of the monosporic culture of *F. oxysporum* GL1 isolated from gladiolus corms with symptoms of rot.**

| Características morfológicas       | <sup>2</sup> Descripción                      |
|------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Color de la colonia                | Tonalidades naranjas y blancas, micelio aéreo |
| Morfología del macroconidio        | Fusiforme, ligeramente curvo                  |
| Morfología de la célula apical     | Cónica y curva                                |
| Morfología de la célula de la base | Ovalada                                       |
| Largo de macroconidios ( $\mu$ m)  | 52.9                                          |
| Ancho de macroconidios ( $\mu$ m)  | 7.4                                           |
| Número de septos                   | 3                                             |
| Morfología del microconidio        | Ovalada                                       |
| Largo de microconidio ( $\mu$ m)   | 20.4                                          |
| Ancho de microconidios ( $\mu$ m)  | 7.3                                           |

<sup>2</sup>Las mediciones y registros al microscopio se realizaron mediante la observación directa y medición de 50 macroconidios y 50 microconidios de la colonia monospórica del hongo a 40x. / <sup>2</sup>The measurements and records under the microscope were carried out by direct observation and measurements of 50 macroconidia and 50 microconidia of the monosporic culture of the fungus at 40x.

características morfológicas y la estrecha similitud molecular con especies del género *Fusarium*, se sugiere que el aislado GL1 aislado de cormos con pudrición pertenece a *F. oxysporum*.

**Prueba de patogenicidad del aislado de *F. oxysporum*.** El aislado GL1 indujo la aparición de síntomas, por lo que la identificación molecular, así como los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos se realizaron utilizando esta cepa. Los cormos inoculados presentaron un síntoma inicial a los 15 días (Figura 1), que se caracterizó por una coloración café en el interior del cormo, así como una pérdida de turgencia; superficialmente el síntoma fue imperceptible (Figura 1C), pero cuando se realizó un corte perpendicular del cormo se observó el cambio de color a partir del sitio de inoculación (Figura 1D). Los cormos tres a cuatro meses después de la inoculación, se secaron adquiriendo una coloración café oscura (Figura 1E). Lo anterior concuerda con la sintomatología descrita para la pudrición de cormos de gladiolo debidas a *Fusarium* (González-Pérez *et al.*, 2009; Michel-Aceves *et al.*, 2014; Pedroza *et al.*, 2019).

**Actividad antagonica *in vitro*.** La actividad antagonica de las 22 cepas de estreptomicetos contra el aislado de *F. oxysporum* GL1 se presentó en el Cuadro 2. En ella se observa, para los estreptomicetos de suelo del Estado de Hidalgo y del Estado de Aguascalientes un PI menor al 20%, mientras que para los estreptomicetos que provienen de suelos de los Petenes, en dos se observa un PI ligeramente superior al 30% y solo para *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA un PI mayor al 40%. Para el caso de *Streptomyces* sp., GCAL-9, se observó un PI de 40.4. Resultados similares se observaron con la cepa control *S. lydicus* WYEC 108 (PI= 41.1%). En general no se observaron diferencias en el PI de *S. lydicus* y los estreptomicetos CACIS-1.16CA y GCAL-9. Con base a estos resultados se seleccionaron estos

a PI lower than 20%, whereas for the streptomycetes from the soils of the Petenes, in two, the PI is slightly higher than 30%, and only for *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA is the PI higher than 40%. In the case of *Streptomyces* sp., GCAL-9, a PI of 40.4 was observed. Similar results were observed with control strain *S. lydicus* WYEC 108 (PI= 41.1%). In general, no differences were observed in the PI of *S. lydicus* and the streptomycetes CACIS-1.16CA and GCAL-9. Based on these results, these isolations were chosen to evaluate the corresponding BE. The PIs obtained with *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA and *Streptomyces* sp. GCAL-9 are near to the results reported for other actinomycetes on *F. oxysporum* (PI de 58.1%), which confirms the capacity of some species of the genus *Streptomyces* to inhibit *F. oxysporum* (Goredema *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020). Earlier results with *Streptomyces* sp. CACIS 1.16CA showed antagonistic activity against other species of *Fusarium*, leading the fungal growth inhibition to fluctuate between 40 and 70% (Evangalista-Martinez, 2014).

**Determination of the MIC and MLC of the BE against *F. oxysporum*.** The bioactive extract (BE) of *Streptomyces* sp. GCAL-9, produced with a solid fermentation, as described in materials and methods, was used to obtain a minimum inhibiting concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) on *F. oxysporum*. The MIC obtained was 0.19 mg mL<sup>-1</sup>, while the MLC was 0.38 mg mL<sup>-1</sup>. The MIC obtained in the investigation is similar to that reported for other strains of *Streptomyces*, considered to have an outstanding microbial effect on different species of bacteria and fungi, including *F. oxysporum* (Hima-Bindu *et al.*, 2017; Pérez-Rojas *et al.*, 2015).

**Effect of the BE on the germination of *F. oxysporum* conidia.** The bioactive extract of



**Cuadro 2. Actividad antagonista de 22 Estreptomicetos sobre *Fusarium oxysporum*, determinada mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en dirección del actinomiceto en ensayos de antagonismo dual.****Table 2. Antagonistic activity of 22 streptomycetes on *Fusarium oxysporum*, determined with the percentage of inhibition of the fungal growth rate in the direction of the actinomycete in dual antagonism trials.**

| Cepa                                                        | PI (%) | Cepa                                              | PI (%) |
|-------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------|--------|
| Suelos del Parque Nacional El Chico, Hidalgo                |        |                                                   |        |
| CACIA 1.3 HGO                                               | 17.1   | CACIA 1.5                                         | 10.1   |
| CACIA 1.33 HGO                                              | 14.1   | CACIA 1.7                                         | 14.1   |
| Suelos de la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche   |        |                                                   |        |
| CACIS 1.16 CA                                               | 43.4   | CACIS 2.30 CA                                     | 19.1   |
| CACIS 2.16 CA                                               | 30.3   | CACIS 2.3 CA                                      | 24.2   |
| CACIS 2.17 CA                                               | 32.3   | CACIS 2.5 CA                                      | 19.1   |
| CACIS 2.26 CA                                               | 20.2   |                                                   |        |
| Suelos de campo de cultivo de chile serrano, Aguascalientes |        |                                                   |        |
| AGS 4                                                       | 28.2   | AGS 13                                            | 32.3   |
| AGS 6                                                       | 24.2   | AGS 32                                            | 15.1   |
| AGS 9                                                       | 25.2   | AGS 44                                            | 26.2   |
| AGS 10                                                      | 35.10  | AGS 50                                            | 29.2   |
| AGS12                                                       | 23.2   | AGS 58                                            | 31.7   |
| Suelos de Yucatán                                           |        |                                                   |        |
| GCAL 9                                                      | 40     | <i>Streptomyces lydicus</i> wyec 108 <sup>z</sup> | 41.1   |

<sup>z</sup>Cepa comercial utilizada como referencia. / <sup>z</sup>Commercial strain used as a reference.

aislados para evaluar el EB correspondiente. Los PI obtenidos con *Streptomyces* sp. CACIS-1.16 CA y *Streptomyces* sp. GCAL-9 son cercanos a los resultados reportados para otros actinomicetos sobre *F. oxysporum* (PI de 58.1%), lo que confirma la capacidad de algunas especies del género *Streptomyces* para inhibir a *F. oxysporum* (Goredema *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020). Resultados previos con *Streptomyces* sp. CACIS 1.16CA mostraron actividad antagonista contra otras especies de *Fusarium*, fluctuando entre 40 al 70% la inhibición en el crecimiento del hongo (Evangelista-Martinez, 2014).

**Determinación de la MIC y MLC del EB contra *F. oxysporum*.** El extracto bioactivo (EB) de

the isolation CACIS 1.16 CA did not inhibit the germination of the *Fusarium* sp. GL1 conidia, suggesting that the antagonism it presented in the dual antagonism trials (Table 2) may be due to direct competition, and not to the production of extracellular compounds with antagonistic activity (Alizadeh *et al.*, 2020). Considering this, subsequent trials were performed only with the BE of the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9.

The results of the evaluation of the effects of five concentrations of the BE of the *Streptomyces* sp. GCAL-9 strain on the germination of *F. oxysporum* conidia display significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in the percentage from applying  $\frac{1}{2}$  MIC, with a value of around 90% in comparison with the control. Higher BE concentrations completely inhibited

*Streptomyces* sp. GCAL-9, producido mediante una fermentación sólida, tal como se describió en materiales y métodos, se utilizó para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima letal (MLC) sobre *F. oxysporum*. Se obtuvo una MIC de 0.19 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que la MLC fue del 0.38 mg mL<sup>-1</sup>. La MIC obtenida en el trabajo es similar a los reportados para otras cepas de *Streptomyces*, consideradas con efecto antimicrobiano sobresaliente sobre diferentes especies de bacterias y hongos, incluyendo *F. oxysporum* (Hima-Bindu *et al.*, 2017; Pérez-Rojas *et al.*, 2015).

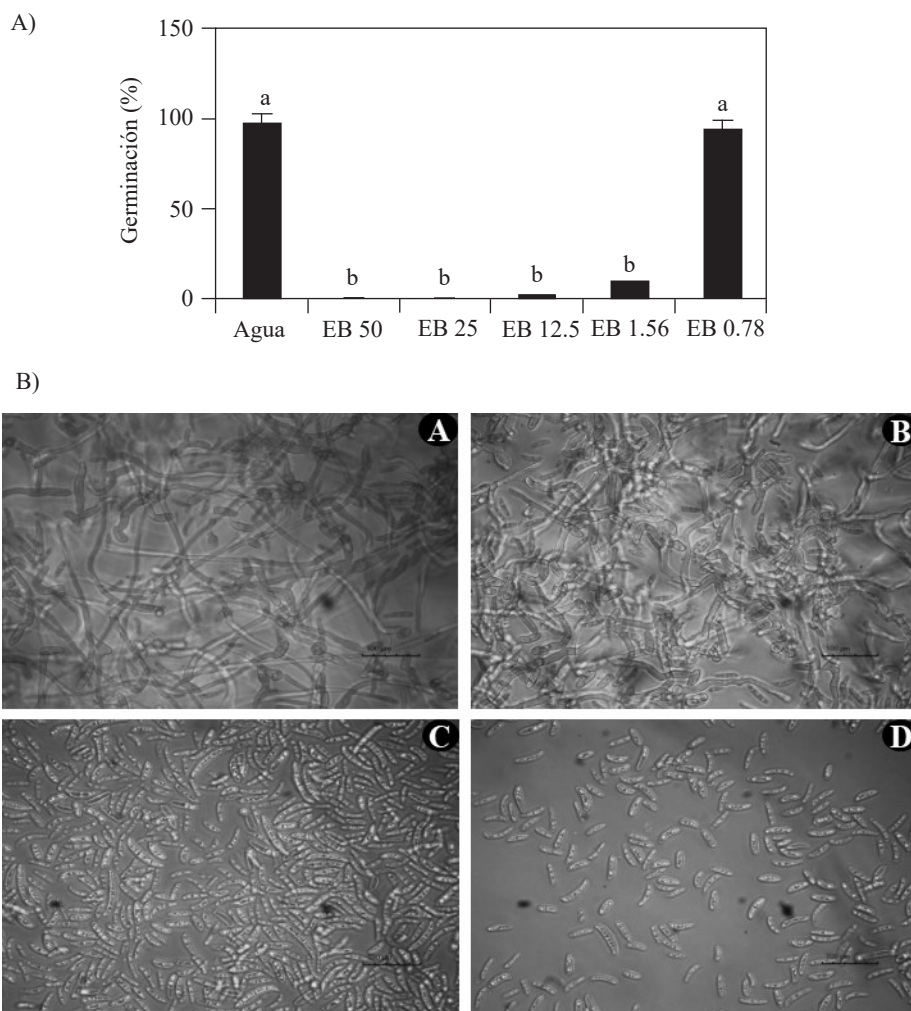
**Efecto del EB sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*.** El extracto bioactivo del aislado CACIS 1.16 CA, no inhibió la germinación de los conidios de *Fusarium* sp. GL1, sugiriendo que el antagonismo que presentó en los ensayos de antagonismo dual (Cuadro 2), se debe posiblemente a competencia directa y no necesariamente debido a la producción de compuestos extracelulares con actividad antagonica (Alizadeh *et al.*, 2020). Considerando lo anterior, los ensayos subsecuentes se realizaron únicamente con el EB de la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9.

Los resultados de la evaluación del efecto de cinco concentraciones del EB de la cepa *Streptomyces* sp. GCAL-9 sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*, muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición de la germinación a partir de la aplicación de ½ MIC, con un valor de alrededor del 90 % respecto al control. Concentraciones mayores del EB inhibieron completamente la germinación (Figura 2A). A nivel morfológico, se observaron cambios estructurales en los conidios con el EB a ½, 1 y 2 MIC's en comparación con los conidios en fase de germinación (Figura 2B). Se observa una evidente disrupción de la fase de transición hacia la formación del tubo de germinación y a medida que se incrementa

germinación (Figure 2A). At a morphological level, structural changes were found in the conidia with the BE at ½, 1 and 2 MIC's in comparison with the conidia in the germination phase (Figure 2B). There is a clear disruption of the transition phase towards the formation of the germination tube, and as the concentration of the BE increases, the size of the conidia decreases, the elongated shape of the macroconidia changes to round and swollen, an excess of vacuoles forms in the cytoplasm, the septa are no longer visible, and an excess of vacuoles forms. These characteristics have been observed in other investigations (Cordova-Albores *et al.*, 2016), particularly in the evaluation of the *Jatropha curcas* oil and other derived oils on the germination of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* conidia; the authors report some morphological effects on the conidia, such as irregular or swollen edges, few to no organelles and, in the germinated conidia, there was scarce growth of hyphae and the appearance of a high number of vacuoles in the cytoplasm.

Other authors reported that extracellular compounds from *Streptomyces blastmyceticus* affect the germination of *Colletotrichum acutatum* and *F. oxysporum* conidia, highlighting effects on the conidial membrane permeability, as well as changes in their morphology with a reduction in their size and the presence of a wrinkly surface in conidia and hyphae, in comparison with the smooth surface of not conidia not exposed to the compounds (Kim *et al.*, 2019).

The optimum time for the fungicidal effect of the BE is determined by evaluating, for three days, the ability of germination of the conidia and the growth of the *F. oxysporum* mycelia after being exposed to different concentrations (1, 2 and 3 MIC's) and times (0, 1, 2, 3 and 4 h) of exposure to the BE (Figure 3). The results show that the concentration of 1 MIC (0.19 mg mL<sup>-1</sup>), 2 MIC (0.38 mg mL<sup>-1</sup>) and 3 MIC (0.57 mg mL<sup>-1</sup>) inhibited the germination and



**Figura 2.** Efecto del extracto bioactivo (EB) sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*. 2A) Porcentaje de germinación de conidios después de 8 h de tratamiento con cinco concentraciones de EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ ); 2B) La germinación de los conidios de *F. oxysporum* en agua como control A), fue similar a la que ocurrió al 0.78% B) del EB, mientras que concentraciones como 25% C) y 12.5% D) inhibieron el 100% la germinación de los conidios del hongo.

**Figure 2.** Effect of the bioactive extract (BE) on the germination of *F. oxysporum* conidia. 2A) Percentage of germination of conidia after 8 h of treatment with five concentrations of BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9. Columns with the same letter are not statistically different, according to the LSD test ( $p \leq 0.05$ ); 2B) Germination of the *F. oxysporum* conidia in water as a control A), was similar to the one that took place in 0.78% B) of the EB, while concentrations such as 25% C) and 12.5% D) inhibited the germination of the fungal conidia by 100%.

la concentración del EB, se presenta una reducción en el tamaño de los conidios, un cambio de la forma alargada de los macroconidios a redondeada e hinchada, formación excesiva de vacuolas en el

growth of the mycelia of the fungus after on hour of being in contact with the BE of GCAL-9, and this effect was observed for the three days in which the subcultures were kept at 29 °C. Meanwhile,

citoplasma, dejan de ser evidentes los septos, y formación excesiva de vacuolas. Estas características se han observado en otros trabajos (Cordova-Albore *et al.*, 2016), en particular en la evaluación del aceite de *Jatropha curcas* y algunos aceites derivados sobre la germinación en conidios de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*; los autores reportaron algunos efectos morfológicos en los conidios como bordes irregulares, hinchados, poca o nula presencia de organelos, y en los conidios germinados se presentó poco crecimiento de hifas y aparición de un número elevado de vacuolas en el citoplasma.

Otros autores reportaron que, compuestos extracelulares de *Streptomyces blastmyceticus* afectan la germinación de conidios de *Colletotrichum acutatum* y *F. oxysporum*, destacando efectos sobre la permeabilidad de la membrana de los conidios, además de cambios en su morfología con una reducción de su tamaño y presencia de una superficie arrugada en los conidios e hifas, en comparación a la superficie lisa de los conidios no expuestos a los compuestos (Kim *et al.*, 2019).

El tiempo óptimo del efecto fungicida del EB se determinó evaluando durante tres días la capacidad de germinación de los conidios y crecimiento del micelio de *F. oxysporum* después de estar expuesto a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 MIC's) y tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 h) de exposición al EB (Figura 3). Los resultados muestran que la concentración de 1 MIC (0.19 mg mL<sup>-1</sup>), 2 MIC (0.38 mg mL<sup>-1</sup>) y 3 MIC (0.57 mg mL<sup>-1</sup>) inhibieron la germinación y crecimiento de micelio del hongo con una hora de contacto con el EB de GCAL-9, este efecto se observó durante los tres días en los que se mantuvieron los subcultivos en condiciones de 29 °C. Mientras que el Carbendazim a la dosis evaluada (72.8 mg mL<sup>-1</sup>), permitió la reactivación del conidio y, por tanto, el crecimiento del micelio al ser transferidos a medio PDA (Figura 3). Estos resultados confirman el potencial antimicrobiano de los

the Carbendazim in the evaluated doses (72.8 mg mL<sup>-1</sup>) helped reactivate the conidia and, therefore, the growth of the mycelia when transferred to the PDA medium (Figure 3). These results confirm the antimicrobial potential of the extracellular compounds released by the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9. On the other hand, they differ from the report by Albuquerque and Gusqui (2018), who mention that Carbendazim was 100% effective to inhibit the development of *F. oxysporum* 72 h after the treatment under *in vitro* conditions.

**Control of rot in corms with the BE.** The corms inoculated with *F. oxysporum* and protected with different concentrations of bioactive extracts did not show any differences in external symptoms in relation with the corms protected with Carbendazim the first 20 days after inoculation. On the other hand, the inoculated and unprotected corms displayed slight external symptoms, such as small dark brown spots in the inoculated areas, with creamy-white mycelia: These symptoms are similar to those reported for corm rot by *Fusarium* sp. (Pedroza *et al.*, 2019; González-Pérez *et al.*, 2009). Cuts of the inoculated corms displayed that the dark brown spot moved and expanded inside the corm (Figure 1). This suggests that there are differences between treatments after 15 days, but its estimation requires alternative methods to the symptom record used (González-Pérez *et al.*, 2009).

Measurements of firmness taken with the Shimadzu digital texturometer showed that the corms inoculated with *F. oxysporum* and protected with the *Streptomyces* sp. G-CAL9 bioactive extract at 0.19 and 0.38 mg mL<sup>-1</sup> were initially similar to the firmness of the control corms in the first 10 days after the treatment. However, the firmness of the corms treated with EB 15 (2MIC) and 20 days (1 MIC) after the treatment was greater in comparison with the controls treated with water and commercial



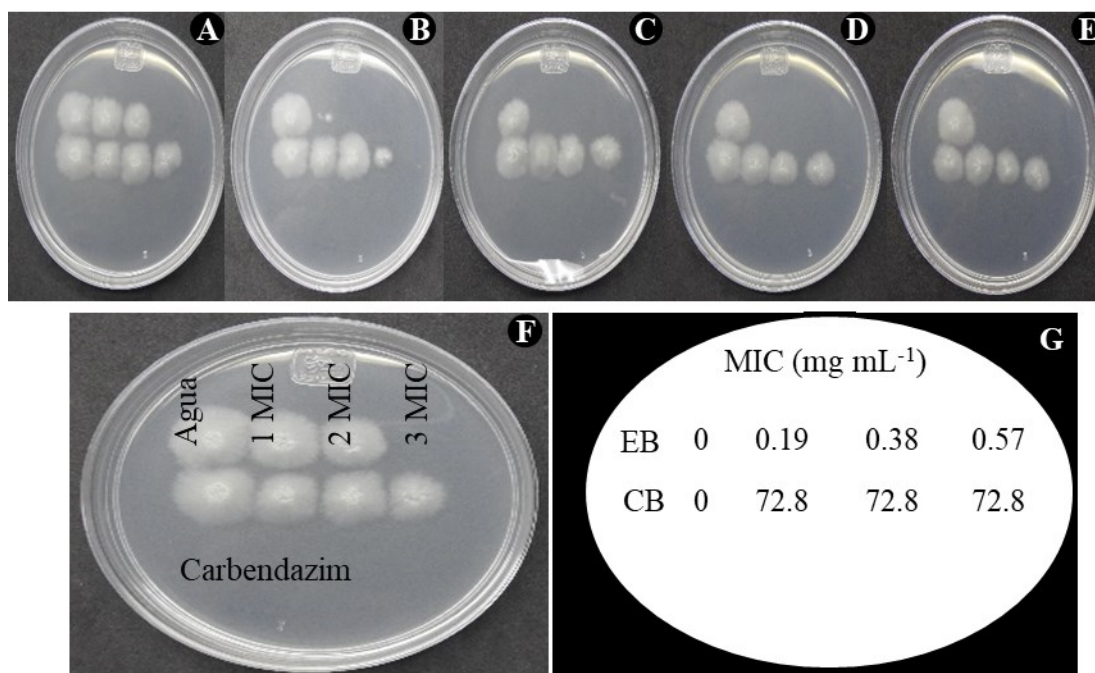


Figura 3. Tiempo óptimo del efecto fungicida del EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9. Crecimiento micelial en caja Petri con medio PDA después de tres días de subcultivo de la solución de conidios de *F. oxysporum* proveniente de la microdilución en placa con el EB a 1, 2 y 3 MICs F y G), después de 0 A), 1 B), 2 C), 3 D) y 4 E) horas de tratamiento con el EB.

Figure 3. Optimum time for the effect fungicidal of the BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9. Mycelial growth in a Petri dish with a PDA medium after three days of subculture of the solution of *F. oxysporum* conidia from the microdilution on a plate with BE at 1, 2 and 3 MICs F and G), after 0 A), 1 B), 2 C), 3 D) and 4 E) hours in treatment with the BE.

compuestos extracelulares liberados por la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9. Por otra parte, difieren del reporte de Alburquerque y Gusqui (2018), quienes mencionan que Carbendazim fue 100% efectivo para inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* a las 72 h después del tratamiento bajo condiciones *in vitro*.

#### Control de la pudrición en cormos con el EB.

Los cormos inoculados con *F. oxysporum* y protegidos con diferentes concentraciones de extracto bioactivo, no mostraron diferencias en síntomas externos con relación a cormos protegidos con Carbendazim, los primeros 20 días después de la inoculación. Por otro lado, cormos inoculados y sin ninguna protección, presentaron ligeros síntomas

fungicide ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 4), suggesting that the BE protected the corms from deterioration of the corms caused by the development of the pathogen inoculated (González-Pérez *et al.*, 2009). The differences observed regarding the effectiveness in time of both concentrations of the BE may be due to factors such as differences in absorption, permanence and translocation of the BE, also influenced by differences in the surfaces of the corms used, as described by Mirabent (2012) as the main factors that exert an influence on the efficiency of the fungicides. Taking this into account, future evaluations will have to consider the use of coadjuvants that improve absorption, adherence, mobility, and therefore the efficiency of the BE.



externos, tales como pequeñas manchas café oscuras en los sitios inoculados, con presencia de micelio blanco cremoso, estos síntomas son similares a los reportados para la pudrición del cormo por *Fusarium* sp. (Pedroza *et al.*, 2019; González-Pérez *et al.*, 2009). Cortes de los cormos inoculados mostraron que la mancha café oscuro avanzó y extendió en el interior del cormo (Figura 1). Lo anterior sugiere que existen diferencias entre tratamientos después de 15 días, pero su estimación requiere de métodos alternativos al registro sintomatológico utilizado (González-Pérez *et al.*, 2009).

La dureza medida con el texturómetro digital Shimadzu, mostró que los cormos inoculados con *F. oxysporum* y protegidos con el extracto bioactivo de *Streptomyces* sp. G-CAL9 a 0.19 y 0.38 mg mL<sup>-1</sup>, fueron inicialmente similares con la dureza de los cormos control en los primeros 10 días después del tratamiento. Sin embargo, la firmeza de los cormos tratados con EB 15 (2MIC) y 20 días (1 MIC) después del tratamiento fue mayor con relación a los controles tratados con agua y fungicida comercial ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 4), sugiriendo que el EB protegió el deterioro de los cormos debidos al desarrollo del patógeno inoculado (González-Pérez *et al.*, 2009). Las diferencias observadas respecto a la efectividad en el tiempo de las dos concentraciones del EB probablemente se deban a factores tales como diferencias en la absorción, permanencia y translocación del EB, influenciada además por diferencias superficiales en los cormos utilizados, según lo describe Mirabent (2012) como los principales factores que influyen en la eficacia de los fungicidas. Tomando en cuenta lo anterior, evaluaciones futuras deberán considerar el uso de coadyuvantes que mejoren la absorción, adherencia, movilidad y por ende la eficacia del EB.

Por otro lado, los cormos tratados con el fungicida comercial a base de Carbendazim presentaron una dureza similar a la que presentaron los cormos

On the other hand, the corms treated with the commercial Carbendazim-based fungicide displayed a similar firmness to that presented by the corms in the control treatment, suggesting that the commercial fungicide in the dose applied in the present study did not hinder the development of the fungus in the inoculated corms, since Carbendazim has an effect on the germination of the fungal conidia by inhibiting the assembly of the Beta-tubulin in mitosis and inhibiting the formation of the appressorium, the development of the mycelia of fungi (FRAC, 2019) as verified in the inhibition trials in microplates.

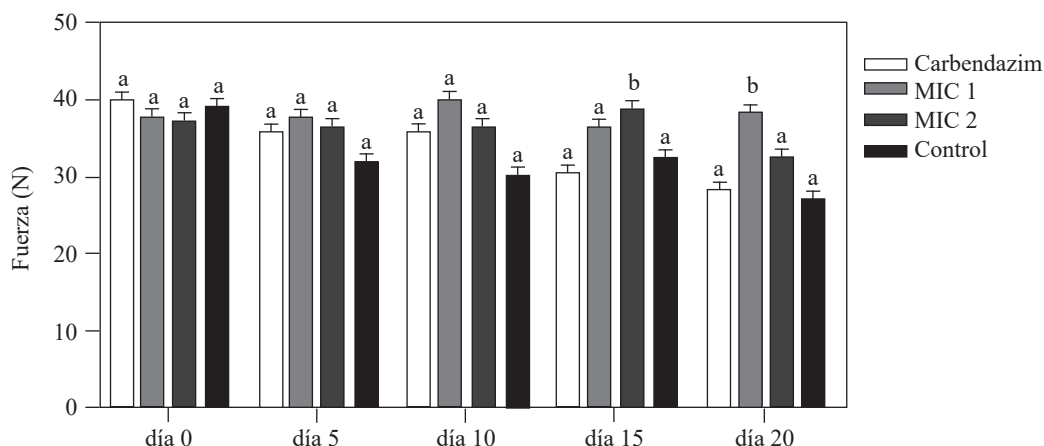
## CONCLUSIONS

The study proved the antifungal potential of the bioactive extract obtained by fermentation in a solid phase of the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9, by inhibiting the total germination of conidia and the mycelial growth of *F. oxysporum* at a dose of 0.19 and 0.38 mg mL<sup>-1</sup>, and due to its protective effect, since it maintained the firmness of gladiolus corms inoculated with conidia of the fungus for 15 and 20 days, under controlled *in vivo* conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the project “Desarrollo de un producto con metabolitos bioactivos producidos por bacterias *Streptomyces* para el control biológico de hongos patógenos que afectan frutos tropicales en la etapa de postcosecha” (Development of a product with bioactive metabolites produced by *Streptomyces* bacteria for the biological control of pathogenic fungi that affect tropical fruits in the postharvest stage). To the CONACYT FOINS-Problemas Nacionales NO. 2016-2900 fund for financing the article.

To the CONACYT through the scholarship for postgraduate studies granted to Tania Ameyally Rios Hernández for the



**Figura 4.** Firmeza de cormos de gladiolo inoculados experimentalmente con una solución de 5  $\mu$ L de conidios de *F. oxysporum* a  $2 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y protegidos con EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9 con uno (0.19  $\text{mg mL}^{-1}$ ) y dos (0.38  $\text{mg mL}^{-1}$ ) veces la concentración MIC; registrados a los 0, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación con un texturómetro digital Shimadzu. Los controles del ensayo fueron, cormos inoculados con el hongo y protegidos con carbendazim a 72.8  $\text{mg mL}^{-1}$  y agua. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 4.** Firmness of gladiolus corms experimentally inoculated with a solution of 5  $\mu$ L of *F. oxysporum* conidia at  $2 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and protected with *Streptomyces* sp., GCAL-9 BE with one (0.19  $\text{mg mL}^{-1}$ ) and two (0.38  $\text{mg mL}^{-1}$ ) times the MIC concentration; registered 0, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation with a Shimadzu digital texturometer. The test controls were corms inoculated with the fungus and protected with carbendazim at 72.8  $\text{mg mL}^{-1}$  and water. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

del tratamiento control, sugiriendo que el fungicida comercial a la dosis aplicada en este trabajo, no impidió el desarrollo del hongo en los cormos inoculados, ya que el Carbendazim tiene un efecto sobre la germinación de conidios de los hongos al inhibir el ensamblaje de la Beta-tubulina en la mitosis e inhibir la formación del apresorio, el crecimiento y desarrollo del micelio de los hongos (FRAC, 2019) tal como se corroboró en los ensayos de inhibición en microplaca.

## CONCLUSIONES

El estudio demostró el potencial antifúngico del extracto bioactivo obtenido por fermentación en fase sólida de la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9, al inhibir la germinación total de conidios y el

study of her Master's Degree in Floriculture Science in the CIATEJ of the Southeast.

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

crecimiento micelial de *F. oxysporum* a una dosis de 0.19 y 0.38 mg mL^{-1} , y por su efecto protector, al mantener durante 15 y 20 días la firmeza de cormos de gladiolo inoculados con conidios del hongo, bajo condiciones controladas *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto "Desarrollo de un producto con metabolitos bioactivos producidos por bacterias *Streptomyces* para el control biológico de hongos patógenos que afectan frutos tropicales en la etapa de postcosecha". Fondo CONACYT FOINS-Problemas Nacionales NO. 2016-2900. Por financiar el artículo.

Al CONACYT través de la Beca de posgrado otorgado a Tania Ameyally Ríos Hernández para sus estudios de Maestría en Ciencias de la Floricultura en el CIATEJ subsele Sureste.

LITERATURA CITADA

- Alizadeh M, Vasebi Y and Safaie N. 2020. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. *Open Agriculture* 5(1): 404-440. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0031>
- Al-Hatmi AMS, de Hoog GS and Meis JF. 2019. Multiresistant *Fusarium* pathogens on plants and humans: solutions in (from) the antifungal pipeline? *Infection and drug resistance* 12: 3727-3737. <https://doi.org/10.2147/IDR.S180912>
- Alburquerque D y Gusqui R. 2018. Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa* 25(2): 489-498. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Barua P, You MP, Bayliss K, Lanoiselet V and Barbetti MJ. 2017. A rapid and miniaturized system using Alamar blue to assess fungal spore viability: implications for biosecurity. *European journal of plant pathology* 148:139-150. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1077-5>
- Betancourt-Resendes I, Velázquez-Monreal JJ, Montero-Castro JC, Fernández-Pavía SP, Lozoya-Saldaña H y Rodríguez-Alvarado G. 2012. *Fusarium mexicanum* Agente causal de la malformación del mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:115-127. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230188002>
- Cordova-Albores LC, Zapotitla ES, Ríos MY, Barrera-Necha LL, Hernández-Lopez M y Bautista-Baños S. 2016. Microscopic study of the morphology and metabolic activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* treated with *Jatropha curcas* oil and derivatives. *Journal of Microscopy and ultrastructure* 4: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.10.004>
- CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Clinical and laboratory standards institute; Wayne, Pennsylvania USA. 282p. <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi%202017.pdf>
- Danial AM, Medina A, Sulyok M and Magan N. 2020. Efficacy of metabolites of a *Streptomyces* strain (AS1) to control growth and mycotoxin production by *Penicillium verrucosum*, *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* in culture. *Mycotoxin Research* 36: 225-234. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00388-7>
- Dikhoba P, Mongalo N, Elgorashi and Makhafola T. 2019. Antifungal and anti-mycotoxigenic activity of select South African medicinal plant species. *Heliyon* 5(10): <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02668>
- Elmer WH and Kamo KK. 2018. Diseases of *Gladiolus*. Pp. 1289-1311 *In*: McGovern R., Elmer W. (eds) *Handbook of Florists' Crops Diseases*. *Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5-47>
- Evangelista-Martínez Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Evangelista-Martínez Z, Contreras-Leal EA, Corona-Pedraza LF and Gastelum-Martínez E. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30: 117. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9>
- FRAC. 2019. FRAC Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. Primera edición, España. <https://www.syngenta.es/sites/g/files/zhg516/f/2019/04/clasificacion-fungicidas-bactericidas-segun-modo-accion.pdf>
- González-Pérez E, Yáñez-Morales MJ, Ortega-Escobar HM and Velázquez-Mendoza J. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1): 45-52. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414006>
- Goredema N, Ndowora T, Shoko T and Ngadze E. 2020. *In vitro* suppression of pathogenic fungi by *Streptomyces* spp. *African crop science Journal* 28(2): 141-149. <https://doi.org/10.4314/acsj.v28i2.1>
- Hafizi R, Salleh B and Lattifah Z. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3): 959-968. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300047>
- He M-H, Li D-L, Zhu W, Wu E-J, Yang L-N, Wang YP, Waheed A and Zhan J. 2017. Slow and temperature-mediated pathogen adaptation to a nonspecific fungicide in agricultural ecosystem. *Wiley Evolutionary Applications*. <https://doi.org/10.1111/eva.12526>
- Herkert P, Al-Hatmi A, Salvador G, Muro M, Pinheiro R, Nucchi M, Queiros-Telles F, Hoog G. and Meis J. 2019. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium oxysporum* species from Brazil. *Frontiers in Microbiology* 10: 737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00737>
- Hima-Bindu BSSN, Muvva V, Munaganti RK, Naragani K, Konda S and Dorigondla KR. 2017. Production of antimicrobial metabolites by *Streptomyces lavendulicolor* VHB-9 Isolated from Granite Mines. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160385>
- Khan MR, Shahid S, Mohidin FA and Mustafa U. 2017. Interaction of *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* on gladiolus cultivars and its management through corm treatment with biopesticides and pesticides. *Biological Control* 115: 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.09.010>
- Leslie JF, Summerell BA and Bullock S. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. First edition. Ed. Blackwell Publishing Iowa, USA. 388p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Marx-Stoelting P, Knebel C and Braeuning A. 2020. The connection of Azole fungicides with xeno-sensing nuclear receptors, drug metabolism and hepatotoxicity. *Cells* 9(5): 1192. <https://doi.org/10.3390/cells9051192>

- Michel-Aceves AC, Ariza-Flores R, Otero-Sánchez MO, Barrios-Ayala A y Quiroz-Millán AM. 2014. Efectividad *in vitro* e *in situ* de fungicidas químicos y biológicos en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* en gladiola. AP Agroproductividad 7: 3-11. <https://core.ac.uk/download/pdf/249320317.pdf>
- Mirabent R. 2012. Adyuvantes para Fungicidas. Phytoma España: La Revista profesional de Sanidad Vegetal 240: 64-65. https://www.phytoma.com/images/240empresasfungicidas_croda.pdf
- Morales-Pérez AA, Franco-Mora O, Castañeda-Vildozola A and Morales-Rosales EJ. 2014. The anti-senescence effect of resveratrol reduces postharvest softening rate in chirimoya fruit. Scientia Agropecuaria 5: 35-44. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.04>
- Nguyen PA, Strub C, Lagrée M, Bertrand-Michel J, Schorr-Galindo S and Fontana A. 2020. Study of *in vitro* interaction between *Fusarium verticillioides* and *Streptomyces* sp. using metabolomics. Folia Microbiológica 65: 303-314. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00725-z>
- O'Donell K and Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS₂ types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular phylogenetics and Evolution 7(1): 103-116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Pedroza RR, Ribeiro WS, Silva SM, Finger FL, Zanuncio JC, Correa EB, Fugate KK, Bezerra da Costa F and Araujo RH. 2019. Healing of *Gladiolus grandiflora* corms under refrigeration and *Fusarium oxysporum* infection. Plant Signaling & Behavior 14(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1652520>
- Pérez-Rojas F, León-Quispe 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.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145001>
- SIAP (Servicio de Información agrícola y pesquera), 2020. Anuario estadístico de la producción agrícola 2020. <https://www.gob.mx/siap>. Julio 2021
- Tlemsani M, Fortas Z, Dib S and Bellahcen M. 2020. *In vitro* antagonism between actinomycete isolates and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*: The causative agent of chickpea vascular wilt. South Asian Journal of Experimental Biology 10(4): 255-267. [https://doi.org/10.38150/sajeb.10\(4\).p255-267](https://doi.org/10.38150/sajeb.10(4).p255-267)
- Uc-Varguez A, López-Puc G, Góngora-Canul C, Martínez-Sebastián M and Aguilera-Cauich EA. 2018. Spatio-temporal spread of foot rot (*Lasiodiplodia theobromae*) in *Jatropha curcas* L. plantations in Yucatán, México. European Journal plant pathology 150: 991-1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1338-y>
- Kim YJ, Kim JH and Rho JY. 2019. Antifungal activities of *Streptomyces blastmyceticus* strain 12-6 against plant pathogenic fungi. Mycobiology 47(3): 329-334. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1635425>
- Shrestha U, Dee ME, Piya S, Ownley BH, and Butler DM. 2020. Soil inoculation with *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* or *Streptomyces griseoviridis* prior to anaerobic soil disinfestation (ASD) does not increase ASD efficacy against *Sclerotium rolfsii* germination. Applied soil ecology 147: 103383. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103383>
- Zhang X, Wang H, Zhu W, Li W and Wang F. 2020. Transcriptome analysis reveals the effects of chinese chive (*Allium tuberosum* R.) extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* spore germination. Current Microbiology 77: 855-864. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01875-x>

Fungicides evaluation against yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in six barley cultivars

Evaluación de fungicidas contra roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) en seis variedades de cebada

María Florencia Rodríguez-García, Miguel González-González*, Julio Huerta-Espino, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco km 13.5 Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, CP 56250, México; Salomón Solano-Hernández, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, CP 38110, México. *Autor para correspondencia: gonzalez.miguel@inifap.gob.mx

Recibido: 29 de Junio, 2021.

Aceptado: 12 de Agosto, 2021.

Rodríguez-García MF, González-González M, Huerta-Espino J and Solano-Hernández S. 2021. Fungicides evaluation against yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in six barley cultivars. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 414-434.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-5>

Primera publicación DOI: 26 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 26, 2021.

Resumen. La roya amarilla (RA) en cebada ha incrementado su importancia en los últimos ciclos de producción en México. Durante el ciclo primavera-verano 2018 se evaluó la efectividad biológica de los fungicidas Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% y Tebuconazole 25% en las variedades Apizaco, Esmeralda, Maravilla, Doña Josefa, AC Metcalfe y ABI Voyager en el control de RA y su efecto en el rendimiento en tres ambientes de temporal. Las variables medidas fueron:

Abstract. Yellow rust (YR) in barley has increased its importance in recent production seasons in Mexico. During the spring-summer 2018 cycle, the biological effectiveness of the fungicides Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% and Tebuconazole 25% was evaluated on cultivars Apizaco, Esmeralda, Maravilla, Doña Josefa, AC Metcalfe, and ABI Voyager for control of YR, as well as their effect on grain yield under three rainfed environments. The variables measured were: days to heading and maturity, plant height, test weight, grain yield, final disease severity, and area under the disease progress curve. The analysis of variance showed significant variation for cultivars, final disease severity, fungicides, and localities ($p \leq 0.01$). The most effective product was Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%. The highest grain yield was recorded in Doña Josefa (3,567 kg ha⁻¹) with the application of Azoxystrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%. Yield losses reached 53% due to the rust effect. A higher grain yield and

días a espigamiento y madurez, altura de planta, peso hectolítrico, rendimiento de grano, severidad final de la enfermedad y área bajo la curva del progreso de la enfermedad. El análisis de varianza mostró variación significativa para variedades, severidad final de la enfermedad, fungicidas y localidades ($p \leq 0.01$). El producto con mayor eficacia fue Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%. El mayor rendimiento de grano se registró en Doña Josefa (3,567 kg ha⁻¹) al aplicar Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%. Las pérdidas en el rendimiento alcanzaron 53% por efecto de la roya. Con la aplicación de cualquiera de los dos fungicidas evaluados se obtuvo mayor rendimiento y peso hectolítrico del grano; sin embargo, las variedades respondieron de forma diferente a la aplicación de los productos.

Palabras clave: resistencia, rendimiento, variedades, eficacia, *Hordeum vulgare*.

La cebada (*Hordeum vulgare*), uno de los cereales más importantes a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar en producción después del maíz, trigo y arroz (FAO, 2020). En México, la superficie sembrada de cebada en el año 2019 fue de 366,553 ha, de las que se cosecharon 323,132 ha, con una producción de 905,962 t y rendimiento promedio nacional de 2.80 t ha⁻¹. El 79% de la superficie sembrada se estableció bajo condiciones de temporal en el ciclo primavera-verano y el 21% bajo condiciones de riego durante el ciclo otoño-invierno. En condiciones de temporal se cosecharon 249,590 ha y se obtuvieron 496,790 t con rendimiento medio de 1.99 t ha⁻¹. De acuerdo con el SIAP (2020), el 86% de la superficie cultivada bajo estas condiciones se realiza en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Estado de México y aportan el 90% de la producción de temporal.

test weight were obtained with the application of any of the two fungicides evaluated; however, cultivars responded differently to the application of the products.

Key words: resistance, yield, cultivars, efficacy, *Hordeum vulgare*.

Barley (*Hordeum vulgare*), one of the world's most important cereals, is the fourth most widely produced, after maize, wheat and rice (FAO, 2020). In Mexico, the area used to plant barley in 2019 was 366,553 ha, out of which 323,132 ha were harvested, giving a production of 905,962 t and a national average yield of 2.80 t ha⁻¹. Out of the total area harvested, 79% was established under rainfed conditions during the spring-summer cycle, and 21%, under irrigated conditions during the autumn-winter cycle. In rainfed conditions, 249,590 ha were harvested, and 496,790 t were obtained, with a mean yield of 1.99 t ha⁻¹. According to the SIAP (2020), 86% of the area planted under these conditions is found in the states of Hidalgo, Puebla, Tlaxcala and the State of Mexico, and they contribute with 90% of the rainfed production.

The importance of barley is based mainly on the production of alcohol (particularly in the brewing industry) and for animal feed. Although barley has the potential to be used for human food due to its high content of beta-glucans, its use for this purpose is currently limited (Newton *et al.*, 2011; Walters *et al.*, 2012). In Mexico, this grain is used mostly by the brewing industry.

Barley grain yield, in Mexico and on a global scale, has been reduced by abiotic factors, especially drought, early frost and excess rainfalls (González-González *et al.*, 2016). On the other hand, and no less important, are the biotic factors, where the incidence of diseases stands out; among

La importancia de la cebada se basa principalmente en la producción de alcohol (especialmente en la industria cervecera) y en la alimentación animal. Aunque la cebada tiene potencial para usarse en la alimentación humana por su alto contenido de beta-glucanos, su uso para este fin en la actualidad es limitada (Newton *et al.*, 2011; Walters *et al.*, 2012). En México, este cereal está destinado básicamente para la industria maltera-cervecera.

El rendimiento de grano de cebada tanto en México como a nivel mundial se ve disminuido por factores abióticos, de los cuales la sequía, heladas tempranas y exceso de lluvias son los principales (González-González *et al.*, 2016). Por otra parte, y no menos importantes, se encuentran los factores bióticos, donde destaca la incidencia de enfermedades; dentro de éstos, las royas causadas por hongos del género *Puccinia* (roya de la hoja, roya amarilla y la roya del tallo) son las enfermedades de cebada de gran importancia a nivel mundial (Gangwar *et al.*, 2018). La roya amarilla (RA) causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, es una enfermedad muy importante en regiones productoras de cebada en el mundo y una de las más destructivas en Europa y América (Brown *et al.*, 2001). Line (2002) indica que la RA es la enfermedad más importante de la cebada en el oeste de los Estados Unidos. Devlash *et al.* (2015) indican que es la enfermedad de la cebada más importante en la India. Por otra parte, Gangwar *et al.* (2018) mencionan que es una enfermedad foliar de gran importancia en el norte de la India, y ha devastado durante mucho tiempo el sur de Asia, África Oriental, Europa Occidental y Oriente Medio. Roelfs *et al.* (1992) identificaron la enfermedad por primera vez en el sur de Texas en los Estados Unidos. Para 1988, se extendió en toda la Mesa Central y afectó de forma drástica a más del 50% de la superficie cultivada en esa región, constituyéndose en la enfermedad más importante. La roya amarilla de la cebada no existía en México

these, rusts caused by the genus *Puccinia* (leaf rust, yellow rust and stem rust) are the most important barley diseases worldwide (Gangwar *et al.*, 2018). Yellow rust (YR), caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, is a very important disease in barley-producing regions in the world, and is one of the most destructive in Europe and the Americas (Brown *et al.*, 2001). Line (2002) points out that YR is the most important disease in western United States. Devlash *et al.* (2015) indicate that this barley disease is the most important one in India. On the other hand, Gangwar *et al.* (2018) mention that YR is a highly important foliar disease in northern India, and it has devastated southern Asia, East Africa, Western Europe and the Middle East for a long time. Roelfs *et al.* (1992) identified the disease for the first time in southern Texas, in the USA. By 1988, it extended across the central highlands and drastically affected more than 50% of the surface planted in that region, becoming the most important disease. Barley yellow rust did not exist in Mexico before 1986, and according to Calhoun *et al.* (1988) and Sandoval-Islas *et al.* (1999), in the summer of 1987, this disease was found in the Valles Altos area of the Mexican central highlands, and in the winter of the same year, it was found in El Bajío, an area made up by the states of Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Jalisco and San Luis Potosí.

On the other hand, Rodríguez-García *et al.* (2019) mentioned that in Mexico, this rust has been found more frequently in recent years. This is partly due to climate change, to the evolution to new biotypes or physiological races of the pathogen, a lack of resistance in the varieties planted and to the introduction of varieties that are not adapted to the barley-producing regions of the country.

When *P. striiformis* f. sp. *hordei* affects the barley crop, it reduces the grain yield, which may lead to substantial losses. Marshall and Sutton (1995) reported losses caused by YR of 72% in

hasta antes de 1986 y de acuerdo con Calhoun *et al.* (1988) y Sandoval-Islas *et al.* (1999), durante el verano de 1987, esta enfermedad se detectó en los Valles Altos de la Mesa Central de México y en el invierno de ese mismo año se presentó en El Bajío, área conformada por parte de los estados de Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Jalisco y San Luis Potosí.

Por otra parte, Rodríguez-García *et al.* (2019) mencionan que en México esta roya se ha observado con mayor frecuencia en los últimos años; esto debido en parte, al cambio climático, a la evolución hacia nuevos biotipos o razas fisiológicas del patógeno, a la falta de resistencia en las variedades sembradas y a la introducción de variedades no adaptadas a las regiones productoras de cebada del país.

Cuando *P. striiformis* f. sp. *hordei* afecta al cultivo de cebada disminuye el rendimiento de grano cuyas mermas pueden ser cuantiosas. Marshall y Sutton (1995) reportan pérdidas por RA de 72% en la variedad susceptible Perkins, mientras que, Dubin y Stubbs (1986) del 30 a 70% en los países andinos. Vaish *et al.* (2011) reportan una disminución en el rendimiento del 66% en la región de Ladakh en la India durante 2004-2005.

En México, la RA se puede presentar desde etapas de plántula y planta adulta, cuando las condiciones climáticas y la variedad sembrada favorecen su incidencia, causando disminución del rendimiento y afectando la calidad del grano, lo cual limita su aprovechamiento ya que de acuerdo con González-González *et al.* (2013), alrededor del 80% de la producción nacional se destina a la transformación en malta, siendo la calidad física del grano indispensable para su comercialización y uso en la industria cervecera.

Dentro de las medidas más utilizadas para el control de esta enfermedad se encuentra el químico, cuyo uso debería ser principalmente en caso emergente cuando el patógeno es difícil de controlar, ya

the susceptible variety Perkins, whereas Dubin and Stubbs (1986) reported losses between 30 and 70% in Andean countries. Vaish *et al.* (2011) reported a 66% yield reduction in the region of Ladakh in India during 2004-2005.

In Mexico, YR can present itself in the stages of seedling and adult plant, when weather conditions and the variety planted favor its incidence, causing a reduction in the yield and affecting the quality of the grain, which limits its use, since, according to González-González *et al.* (2013), around 80% of the country's production is converted into malt, therefore the physical quality of the grain is crucial for its marketing and its use in the brewing industry.

Chemicals are among the most widely used measures for the control of this disease, and they should be used in case of an emergency, when the pathogen is difficult to control because it has already been spread in most production areas, or because there is a lack of resistant varieties, since the irrational use and inadequate doses harm the environment, as mentioned by Sandoval-Islas *et al.* (1999), who indicate that YR can be controlled by spraying fungicides, although this increases the cost of the crop, along with the damages it can cause on the environment.

In Mexico, the currently recommended barley varieties do not have satisfactory levels of genetic resistance and chemical control is required as a complementary measure to genetic control. Therefore, the aim of this research was to determine the biological effectiveness of the fungicides Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% and Tebuconazole 25% for the control of YR and its effect on the yield of commercial varieties of barley produced under rainfed conditions.

MATERIALS AND METHODS

Location. The experiments were established in the 2018 spring-summer cycle in three regions that are

que se encuentra diseminado en la mayoría de las zonas productoras, o en su caso, porque se carece de variedades resistentes, ya que el uso irracional y las dosis no adecuadas perjudican al ambiente como lo mencionan Sandoval-Islas *et al.* (1999); quienes indican que la RA se puede controlar con aspersiones de fungicidas, pero esto incrementa los costos del cultivo aunado a los daños que puede provocar al ambiente.

En México, las variedades de cebada recomendadas actualmente no poseen niveles de resistencia genética satisfactoria y se tiene que recurrir al control químico como medida complementaria al control genético. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad biológica de los fungicidas Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% y Tebuconazole 25%, para el control de RA y su efecto en el rendimiento en variedades comerciales de cebada producidas bajo condiciones de temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. Los experimentos se establecieron durante el ciclo primavera-verano del 2018 en tres regiones representativas de la zona productora de cebada de temporal de los Valles Altos de la Mesa Central de México: 1) Relinas, Axapusco, Estado de México, ubicado en el paralelo 19° 50' 33.32" de LN y 98° 53' 36.73" de LO y una altitud de 2322 msnm, el suelo predominate es el tipo Feozem; 2) Moxolahuac, Tlahuapan, Puebla, a 19° 26' 31.37" LN, 98° 32' 31.60" LO y una altura de 2763 msnm, el tipo de suelo predominante es el Andosol son suelos de origen volcánico, ricos en materia orgánica y alta capacidad de retención de agua así como de intercambio catiónico; 3) Soltepec, Tlaxco, Tlaxcala, a 19° 35' 40.07" LN, 98° 18' 36.48" LO a 2 532 msnm; el suelo predominate es del tipo

representative of the rainfed barley producing area of the Mexican highlands: 1) Relinas, Axapusco, State of Mexico, located 19° 50' 33.32" LN and 98° 53' 36.73" LW and at an altitude of 2322 masl, where the predominant soil was Feozem; 2) Moxolahuac, Tlahuapan, Puebla, 19° 26' 31.37" LN, 98° 32' 31.60" LW and an altitude of 2763 masl, where the predominant soil is Andosol, of volcanic origin, rich in organic matter, a high water retention and cationic exchange; 3) Soltepec, Tlaxco, Tlaxcala, 19° 35' 40.07" LN, 98° 18' 36.48" LW at 2532 masl; the predominant soil type is Feozem, which is porous and rich in organic matter.

Experimental design. The experimental design was a randomized complete blocks with a factorial arrangement (6 x 3) resulted in 18 treatments and four repetitions, for a total of 72 experimental units or plots for each location. The experimental unit consisted of four furrows, each one 3 m in length and with a space of 30 cm between them, corresponding to an area of 3.6 m², considered a useful plot.

Germplasm. Six barley varieties were evaluated: Apizaco, Esmeralda and Maravilla, released by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); Doña Josefa, released by the ICAMEX, and AC Metcalfe and ABI Voyager, varieties from Canada and the USA, recently introduced into Mexico. The first four varieties are of six rows, while the latter two are of two rows. These varieties are malting varieties, except for Maravilla and Doña Josefa, which are forage grain varieties. The level of resistance to YR in the varieties released by INIFAP indicate that Esmeralda is resistant (Zamora *et al.*, 1997), Maravilla is cataloged as tolerant (Zamora-Díaz *et al.*, 2017) and Apizaco, as susceptible (Cuéllar-Zambrano *et al.*, 2015), whereas Doña Josefa is

Feozem, estos suelos son porosos y ricos en materia orgánica.

Diseño experimental. El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar con arreglo factorial (6 x 3) originando 18 tratamiento y cuatro repeticiones, dando un total de 72 unidades experimentales o parcelas por cada localidad. La unidad experimental fue de cuatro surcos de tres metros de largo y espaciado a 30 cm, que corresponde a una superficie de 3.6 m², considerada como parcela útil.

Germoplasma. Se evaluaron seis variedades de cebada: Apizaco, Esmeralda y Maravilla liberadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); Doña Josefa liberada por el ICAMEX, y AC Metcalfe y ABI Voyager, variedades de Canadá y EUA de reciente introducción a México. Las cuatro primeras variedades son de seis hileras, mientras que las dos últimas son de dos hileras. Estas variedades son malteras, excepto Maravilla y Doña Josefa que son variedades de grano forrajero. El nivel de resistencia a RA en las variedades liberadas por INIFAP indican que Esmeralda es resistente (Zamora *et al.*, 1997), Maravilla catalogada como tolerante (Zamora-Díaz *et al.*, 2017) y Apizaco como susceptible (Cuéllar-Zambrano *et al.*, 2015). Por su parte, Doña Josefa es resistente (Guzmán-Ortíz *et al.*, 2019). No existen datos publicados para México que indiquen el nivel de resistencia de las variedades AC Metcalfe y ABI Voyager.

Fungicidas. Los fungicidas probados fueron Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (Azimut[®] 320 SC) y Tebuconazole 25% (Folicur[®] 25 EW); se aplicó la dosis recomendada por el fabricante (0.7 L ha⁻¹ para Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% y 0.5 L ha⁻¹ para Tebuconazole 25%). Los 18 tratamientos consistieron de todas las

resistant (Guzmán-Ortíz *et al.*, 2019). There are no data published for Mexico indicating the level of resistance of varieties AC Metcalfe and ABI Voyager.

Fungicidas. The fungicides tested were Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (Azimut[®] 320 SC) and Tebuconazole 25% (Folicur[®] 25 EW) and the dose used was the one recommended by the manufacturer (0.7 L ha⁻¹ for Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% and 0.5 L ha⁻¹ for Tebuconazole 25%). The 18 treatments consisted of all the varieties without fungicide, all varieties with Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% and all varieties with Tebuconazole 25%. In all treatments we used the coadjuvant polyether polymethylsiloxane copolymer (Break Thru[®]) at a dose of 0.25 L ha⁻¹. The fungicides were applied using a SWISSMEX knapsack compression sprayer (15 L) with a flat TeeJet ASJ 11003 spray tip. Fungicides were applied twice: the first was 50 days after planting, when plants were in development stage 41-49 according to the scale proposed by Zadoks *et al.* (1974) and observing a severity of 1 to 5% in the susceptible variety Apizaco, and the second one was 20 days after the first application.

Inoculum. The incidence of yellow rust appeared naturally, from the growth stage of booting (development stage 41-49; Zadoks *et al.*, 1974), since the three locations display favorable weather conditions for the development of the disease, such as cold to temperate temperatures (5 to 18 °C) and the formation of dew.

Variables. The following variables were recorded: days to heading (DE – days between planting and the moment in which 50% of plants displayed visible spikes), days to physiological maturity (DM – days between harvest and the moment in which

variedades sin fungicida, todas las variedades con la aplicación de Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% y de todas las variedades con la aplicación de Tebuconazole 25%. En todos los tratamientos se utilizó el coadyuvante poliéter polimetilsiloxano copolímero (Break Thru®) a una dosis de 0.25 L ha⁻¹. Los fungicidas fueron aplicados utilizando una bomba de mochila marca SWISSMEX (15 L de capacidad) con boquilla abanico plano TeeJet ASJ 11003. La aplicación se realizó en dos ocasiones, la primera a los 50 días después de la siembra cuando las plantas se encontraban en la etapa de desarrollo 41-49 según la escala propuesta por Zadoks *et al.* (1974) y observando en la variedad susceptible Apizaco una severidad de 1 al 5%; y la segunda 20 días después de la primera aplicación.

Inóculo. La incidencia de la roya amarilla se presentó de forma natural, a partir de la etapa de embuche (etapa de desarrollo 41-49; Zadoks *et al.*, 1974), ya que las tres localidades presentan condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad, como temperaturas de frías a templadas (5 a 18 °C) y la formación de rocío.

Variables. Se registraron las variables días a espigamiento (DE): días transcurridos desde la siembra hasta el momento en que el 50% de las plantas presentaban espigas visibles; días a madurez fisiológica (DM): días transcurridos desde la siembra hasta el momento en que el pedúnculo de la espiga cambió a un color amarillo paja; altura de planta (AP): altura en centímetros desde la superficie del suelo hasta la punta de la espiguilla terminal de la espiga principal o superior; rendimiento de grano (REND): peso de grano producido por todas las espigas de cada parcela útil, registrado en gramos, la cual posteriormente se transformó en kg ha⁻¹; peso hectolítrico (PH): peso del grano por unidad de volumen (kg hL⁻¹); severidad final de la enfermedad

the spike's peduncle turned hay yellow), plant height (AP – height in centimeters from the surface of the soil to the tip of the terminal or higher spike), grain yield (REND – the weight of grain produced by all the spikes of all useful plots, registered in grams, which was later converted into kg ha⁻¹), test weight (PH – weight of the grain per volume unit (kg hL⁻¹)) final disease severity (SFE – highest level of damaged foliar area, registered as a percentage and using the scale modified by Cobb) (Peterson *et al.*, 1948). The first reading of yellow rust was carried out just before the products were applied for the first time, and was followed by three more, once every 10 days. With the readings of severity (four) taken in time intervals, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated using the equation described by Bjarko and Line (1988).

Statistical analysis. The data of the variables obtained in the three locations were analyzed statistically in a joint manner using the program SAS 9.3 (SAS Institute®, USA) and comparisons of averages were carried out for the variables under study using the DMS test ($p=0.01$).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of variance: The joint analysis of variance of the three evaluated locations found highly significant differences for most of the variables evaluated. The fungicides showed a highly significant difference for days to maturity (DM), test weight (PH), grain yield (REND), final disease severity (SFE) and area under the disease progress curve (AUDPC). Meanwhile, in the variety*fungicide interactions it was the same case for PH, SFE and AUDPC, whereas in location*fungicide, significant differences were

(SFE): nivel máximo del área foliar dañada, registrada en porcentaje y utilizando la escala modificada de Cobb (Peterson *et al.*, 1948). La primera lectura de roya amarilla se realizó justo antes de que se llevara a cabo la primera aplicación de los productos; y otras tres, cada 10 días. Con las lecturas de severidad (cuatro) tomadas en intervalos de tiempo se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) utilizando la ecuación descrita por Bjarko y Line (1988).

Análisis estadístico. Los datos de las variables obtenidas en las tres localidades fueron analizados estadísticamente de manera conjunta con el programa SAS 9.3 (SAS Institute®, EUA) y se realizaron comparaciones de medias para las variables en estudio mediante la prueba DMS ($p=0.01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de varianza: El análisis de varianza conjunto de las tres localidades evaluadas detectó diferencias altamente significativas para la mayoría de las variables evaluadas. Los fungicidas mostraron significancia estadística alta para días a madurez (DM), peso hectolítrico (PH), rendimiento de grano (REND), severidad final de la enfermedad (SFE) y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE); mientras que en las interacciones variedad*fungicida lo fueron para PH, SFE y ABCPE, en tanto que en localidad*fungicida se observaron diferencias significativas para DM, PH y ABCPE. Estos resultados indican un comportamiento diferente entre las variedades en donde las localidades tienen un papel fundamental en la expresión y comportamiento de los materiales genéticos como lo menciona González-González *et al.* (2016); resultados similares fueron reportados por Rodríguez-García *et al.* (2020) en el cultivo

found for DM, PH and AUDPC. These results indicate a different behavior between varieties, where the locations play an important part in the expression and behavior of the genetic materials, as mentioned by González-González *et al.* (2016); similar results were reported by Rodríguez-García *et al.* (2020) for wheat. The application of fungicides shows that there is a positive response of the varieties in the control of the disease, the crop cycle and yield-related variables, based on the product applied, which is conditioned by the environment. For variables DE and AP, no significant effects of the chemicals were observed, therefore the behavior of these variables depend on the variety and the environment.

Comparison of means for fungicides, locations and varieties. The average values (Table 1) show that there are no statistical differences for variables DE and AP, with and without fungicides. For the remaining variables (DM, PH, REND, SFE and AUDPC), there is a response between the application of fungicides and the control without fungicide. However, when analyzing the information of the products applied, no significant statistical differences are observed between them. The application of fungicides for the control of YR affects the value of most of the evaluated variables in a positive way, with the most notorious increases in PH and REND. Devlash *et al.* (2015) reported similar behaviors in the application of several fungicides for the control of YR in barley, and point out that applying fungicide, regardless of the product, significantly reduces SFE and increases the yield in comparison with the control without fungicide.

In the average values per location (Table 2), locations played a crucial part in the expression of the values of each one of the variables evaluated. For DE, the locations of Relinas and Soltepec displayed

de trigo. La aplicación de fungicidas muestra que existe una respuesta positiva de las variedades en el control de la enfermedad, ciclo de cultivo y variables relacionadas con rendimiento en función del producto aplicado, la cual está condicionada por el ambiente. Para las variables DE y AP no se observó efecto significativo de los productos por lo que el comportamiento de estas variables dependerá de la variedad y del ambiente.

Comparaciones de medias para fungicidas, localidades y variedades. Los valores promedio (Cuadro 1) muestran que no existen diferencias estadísticas para las variables DE y AP con y sin aplicación de fungicidas. Para las demás variables (DM, PH, REND, SFE y ABCPE), existe una respuesta entre la aplicación de fungicidas y el testigo sin aplicar. Sin embargo, al analizar la información de los dos productos aplicados, se aprecia que no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos. La aplicación de fungicidas para el control de la RA, afecta positivamente el valor de la mayoría de las variables evaluadas, siendo más notorio el incremento en el PH y REND. Devlash *et al.* (2015) reportan comportamientos similares en

a similar behavior when reaching this stage 60 days after planting (dds). In Moxolahuac, the cycle was later, requiring 10 additional days. A similar behavior was observed in DM, with Moxolahuac being the location with the longest cycle (143 dds). Plant height varied between locations, with lower heights observed in Relinas (48 cm), whereas plants in Soltepec and Moxolahuac surpassed the height of 70 cm. The grain test weight (PH) was greater in Soltepec (62.16 kg hL⁻¹), followed by Moxolahuac and Relinas. Grain yield was higher than 3 t ha⁻¹ in the locations of Soltepec and Moxolahuac, whereas in Relinas, the average yield hardly surpassed 1 t ha⁻¹. This behavior may be due to the availability of water during the crop cycle, since Soltepec and Moxolahuac had 428 and 417 mm of rain respectively during the crop cycle, yet the location of Relinas had 286 mm (data registered by the Barley Genetic Breeding Program of INIFAP- Valle de México Experimental Field), causing the low yields observed. The highest incidence of YR was registered in the locations of Relinas and Soltepec, in comparison to those found in Moxolahuac.

The behavior of the varieties (Table 3) displayed significant differences between them. The earliest

Cuadro 1. Comparación de medias en la aplicación de fungicidas en seis variedades de cebada, en tres localidades durante el ciclo Primavera-Verano, 2018.

Table 1. Comparison of means in the use of fungicides in six varieties of barley in three locations during the 2018 Spring-Summer cycle.

| Fungicida | DE | DM | AP | PH | REND | SFE | ABCPE |
|--|---------|----------|---------|---------|-----------|---------|----------|
| Azoxistrobin 11.1% +
Tebuconazole 18.4% | 63.86 a | 130.12 a | 67.98 a | 61.32 a | 2886.43 a | 3.19 b | 46.38 b |
| Tebuconazole 25% | 63.90 a | 129.86 a | 66.72 a | 61.15 a | 2731.47 a | 4.91 b | 52.04 b |
| Sin fungicida | 63.77 a | 126.77 b | 66.43 a | 59.68 b | 2409.47 b | 22.86 a | 181.67 a |
| Media | 63.84 | 128.92 | 67.04 | 60.72 | 2675.79 | 10.32 | 93.36 |
| DMS | 0.56 | 1.23 | 2.06 | 0.70 | 204.86 | 3.48 | 26.11 |

Valores con la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente diferentes (DMS, $p \leq 0.01$). DE= días a espigamiento; DM= días a madurez fisiológica; AP= altura de planta; PH= peso por hectolitro (kg hL⁻¹); REND= rendimiento de grano (kg ha⁻¹); SFE= severidad final de la enfermedad; ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad. / Values with the same letter in each column are not statistically different (DMS, $p \leq 0.01$). DE= days to heading; DM= days to physiological maturity; AP= plant height; PH= test weight (kg hL⁻¹); REND= grain yield (kg ha⁻¹); SFE= final disease severity; AUDPC= area under the disease progress curve.

la aplicación de diversos fungicidas para el control de la RA en cebada e indican que, al aplicar fungicida sin importar el tipo de producto, se reduce significativamente la SFE y aumenta el rendimiento en comparación con el testigo sin aplicación de fungicida.

En los valores promedio por localidad (Cuadro 2), se observó que las localidades tienen un papel fundamental en la expresión de los valores de cada una de las variables evaluadas. Para DE, las localidades de Relinas y Soltepec tuvieron un comportamiento similar al llegar a esta etapa a los 60 días después de la siembra (dds). En Moxolahuac, el ciclo fue más tardío requiriendo 10 días adicionales. Un comportamiento similar se presentó en DM, siendo Moxolahuac la localidad de ciclo más largo (143 dds). Los portes de planta variaron entre las localidades observándose menor altura en Relinas (48 cm), mientras que en Soltepec y Moxolahuac las plantas superaron los 70 cm de altura. El peso hectolítrico del grano (PH) fue mayor en Soltepec (62.16 kg hL⁻¹), seguido de Moxolahuac y Relinas. El rendimiento de grano fue superior a las 3 t ha⁻¹ en las localidades de Soltepec y Moxolahuac; por otra parte, en Relinas el rendimiento promedio apenas superó 1 t ha⁻¹. Este comportamiento puede

materials (DE and DM) were, in general terms, the six-row varieties, whereas the two-row varieties were late. Esmeralda was the early variety, reaching heading and maturity at 54 and 121 dds, respectively. The variety ABI Voyager and AC Metcalfe were the latest, reaching maturity at 140 and 137 dds, respectively. The height of plants was distributed in a range of 64 to 72 cm, with the two-row varieties being taller than the six-row ones. PH was numerically higher in the Esmeralda variety (62.04 kg hL⁻¹), although similar statistically to the values obtained in AC Metcalfe and Doña Josefa; Apizaco was the variety with the lowest PH, with 58.5 kg hL⁻¹. In grain yield, Doña Josefa (3234.5 kg ha⁻¹) statistically surpassed all other varieties. Esmeralda and Maravilla had statistically similar results to AC Metcalfe and ABI Voyager, whereas Apizaco was the lowest yielding (2337 kg ha⁻¹). A similar behavior was observed in locations and genotypes by González-González *et al.* (2016) and Jalata *et al.* (2011), who mention that the environmental variation between locations and the genetic variability have an influence on the expression and the potential of the genotypes.

The average response of SFE and ABCPE indicate that Apizaco was the variety with

Cuadro 2. Comparación de medias por localidad para las variables DE, DM, AP, PH, REND y SFE de tres localidades y seis variedades de cebada, durante el ciclo Primavera-Verano, 2018.

Table 2. Comparison of means by location for the variables DE, DM, AP, PH, REND and SFE of three locations and six barley varieties during the 2018 spring-summer cycle.

| Localidades | DE | DM | AP | PH | REND | SFE | ABCPE |
|-------------|---------|----------|---------|---------|-----------|---------|----------|
| Relinas | 60.34 b | 121.37 b | 48.01 c | 58.98 c | 1028.4 c | 12.50 a | 161.29 a |
| Soltepec | 60.09 b | 122.06 b | 79.45 a | 62.16 a | 3775.52 a | 11.12 a | 57.38 b |
| Moxolahuac | 71.09 a | 143.31 a | 73.66 b | 61.02 b | 3223.38 b | 7.34 b | 61.42 b |
| Media | 63.84 | 128.92 | 67.04 | 60.72 | 2675.79 | 10.32 | 93.36 |
| DMS | 0.56 | 1.23 | 2.06 | 0.70 | 204.86 | 3.48 | 26.11 |

DE= días a espigamiento; DM= días a madurez fisiológica; AP= altura de planta; PH= peso por hectolitro (kg hL⁻¹); REND= rendimiento de grano (kg ha⁻¹); SFE= Severidad final de la enfermedad; ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Medias con la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente diferentes (DMS, $p \leq 0.01$). / DE= days to heading; DM= days to physiological maturity; AP= plant height; PH= test weight (kg hL⁻¹); REND= grain yield (kg ha⁻¹); SFE= final disease severity; AUDPC= area under the disease progress curve. Means with the same letter in a column are not statistically different (DMS, $p \leq 0.01$).

ser atribuido a la disponibilidad de agua durante el ciclo de cultivo, pues mientras que en Soltepec y Moxolahuac tuvieron 428 y 417 mm de lluvia respectivamente durante el ciclo de cultivo, en la localidad de Relinas la disponibilidad de agua fue de 286 mm (datos registrados por el Programa de Mejoramiento Genético de Cebada del INIFAP-Campo Experimental Valle de México), ocasionando los rendimientos bajos observados. La mayor incidencia de RA se registró en las localidades de Relinas y Soltepec, en comparación con las observadas en Moxolahuac.

El comportamiento de las variedades (Cuadro 3), mostró diferencias estadísticas entre ellas. Los materiales más precoces (DE y DM) fueron en general las variedades de seis hileras, mientras que las de dos fueron más tardías. Esmeralda fue la variedad más precoz llegando a espigamiento y madurez a los 54 y 121 dds, respectivamente. La variedad ABI Voyager y AC Metcalfe fueron las más tardías alcanzando madurez a los 140 y 137 dds, respectivamente. La altura de plantas se distribuyó en un rango de 64 a 72 cm, siendo las variedades de dos

the greatest YR infection levels, which is a susceptibility response of this genotype, since it is one of the old varieties released by the INIFAP and has no effective resistance genes for the current races of this pathogen or due to its release before the pathogen was established in Mexico. The three remaining six-row varieties (Esmeralda, Maravilla and Doña Josefa), were statistically similar, and the ones with the highest levels of resistance to the disease. The two-row varieties, AC Metcalfe and ABI Voyager, were, along with Apizaco, the most susceptible to YR. These results show a clear superiority in resistance of the varieties released by INIFAP (Esmeralda and Maravilla), in comparison with the two-row varieties recently introduced into Mexico for their use in the brewing industry. When comparing the yields of AC Metcalfe, ABI Voyager and Esmeralda, these are observed to have statistically similar values. However, Esmeralda tolerated best the presence of the pathogen, since it is a variety that, when released, it was described by Zamora *et al.* (1997) as the first barley variety developed in Mexico for rainfed conditions with

Cuadro 3. Comparación de medias por variedad para las variables DE, DM, AP, PH, REND, SFE y ABCPE de tres localidades y seis variedades de cebada, durante el ciclo Primavera-Verano, 2018.

Table 3. Comparison of means by variety for the variables DE, DM, AP, PH, REND, SFE and ABCPE for three locations and six barley varieties during the 2018 Spring-Summer cycle.

| Variedad | DE | DM | AP | PH | REND | SFE | ABCPE |
|-------------|---------|----------|----------|----------|------------|---------|----------|
| Apizaco | 60.36 c | 126.08 c | 64.13 c | 58.50 d | 2336.7 d | 26.25 a | 245.97 a |
| ABI-Voyager | 72.25 a | 139.66 a | 69.50 ab | 60.90 bc | 2748.3 bc | 20.44 b | 181.42 b |
| AC-Metcalfe | 71.97 a | 137.22 b | 71.77 a | 61.58 ab | 2497.5 bcd | 12.25 c | 104.81 c |
| Esmeralda | 54.52 d | 121.36 e | 63.83 c | 62.04 a | 2469.8 cd | 2.44 d | 18.31 d |
| Maravilla | 60.25 c | 123.38 d | 68.30 b | 59.93 c | 2767.9 b | 0.27 d | 3.69 d |
| Doña Josefa | 63.72 b | 125.80c | 64.72 c | 61.37 ab | 3234.5 a | 0.27 d | 5.97 d |
| Media | 63.84 | 128.92 | 67.04 | 60.72 | 2675.79 | 10.32 | 93.36 |
| DMS | 0.80 | 1.74 | 2.91 | 0.99 | 289.72 | 4.93 | 36.93 |

DE= días a espigamiento; DM= días a madurez fisiológica; AP= altura de planta; PH= peso por hectolitro (kg hL⁻¹); REND= rendimiento de grano (kg ha⁻¹); SFE= Severidad final de la enfermedad; ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Medias con la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente diferentes (DMS, $p \leq 0.01$). / DE= days to heading; DM= days to physiological maturity; AP= plant height; PH= test weight (kg hL⁻¹); REND= grain yield (kg ha⁻¹); SFE= final disease severity; AUDPC= area under the disease progress curve. Means with the same letter in a column are not statistically different (DMS, $p \leq 0.01$).

hileras más altas que las de seis hileras. El PH fue superior numéricamente en la variedad Esmeralda (62.04 kg hL^{-1}), aunque similar estadísticamente a los valores obtenidos en AC Metcalfe y Doña Josefa; Apizaco fue la variedad con menor PH con 58.5 kg hL^{-1} . En rendimiento de grano, Doña Josefa ($3234.5 \text{ kg ha}^{-1}$) superó estadísticamente a todas las variedades. Esmeralda y Maravilla, tuvieron rendimientos estadísticamente similares a AC Metcalfe y ABI Voyager; mientras que Apizaco fue la de menor rendimiento (2337 kg ha^{-1}). Comportamientos similares en localidades y genotipos fueron observados por González-González *et al.* (2016) y Jalata *et al.* (2011), quienes mencionan que la variación ambiental entre localidades y la variabilidad genética influyen en la expresión y el potencial de los genotipos.

La respuesta promedio de SFE y ABCPE indican que Apizaco fue la variedad con mayores niveles de infección a RA, lo cual es una respuesta de susceptibilidad de este genotipo, ya que es una de las variedades antiguas liberadas por el INIFAP y no tiene genes de resistencia efectivos para las razas actuales de este patógeno o por su liberación antes de que el patógeno se estableciera en México. Las restantes tres variedades de seis hileras (Esmeralda, Maravilla y Doña Josefa), fueron estadísticamente similares y las que tuvieron los niveles de resistencia mayores a la enfermedad. Las variedades de dos hileras, AC Metcalfe y ABI Voyager fueron junto con Apizaco, las más susceptibles a RA. Estos resultados muestran una clara superioridad en resistencia de las variedades liberadas por el INIFAP (Esmeralda y Maravilla), en comparación con las variedades de dos hileras recientemente introducidas en México para su aprovechamiento en la industria maltera-cervecera. Al comparar los rendimientos de AC Metcalfe, ABI Voyager y Esmeralda, se observa que éstos tienen valores estadísticamente similares; sin embargo, Esmeralda tolera

a certain level of resistance to yellow rust. This variety keeps its resistance until now.

Effect of the fungicides and agronomic behavior of the varieties.

The originated treatments of the combination of varieties with the fungicides applied (Table 4) show the behavior of each one of the varieties under the effect of the product. The fungicides affected the behavior of the varieties for the variables evaluated, except for DE and AP. The Esmeralda variety was the earliest in all its treatments for DM, whereas the two-row varieties were the latest; a tendency to increase cycle duration was observed when applying a product, as opposed to when it is not applied. The results obtained show that Esmeralda was the earliest genotype when no fungicide was applied (Esmeralda-Sf) and the combination of ABI-Voyager-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% was the latest. In general terms, the treatments without fungicide were the earliest in each variety, and when Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% was applied, the behavior of the varieties Esmeralda, Maravilla and ABI-Voyager was to delay leaf senescence, whereas with Tebuconazole 25%, it was the varieties Apizaco, Doña Josefa and AC-Metcalfe. Bertelsen *et al.* (2001) reported that the fungicide Azoxistrobin causes a delay in the senescence of leaves, although this does not necessarily mean that there is an increase in biomass or in grain yield.

For the variable PH, a greater test weight can be found within each variety when a fungicide is applied than when it is not applied (Table 4), except in the combination Maravilla-Az+Teb. Also, a numerical superiority is observed when applying Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% over Tebuconazole 25% in all varieties except in Maravilla, in which Tebuconazole 25% was superior to Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 25%. The average PH values obtained in each

mejor la presencia del patógeno, ya que es una variedad que, al momento de su liberación, Zamora *et al.* (1997) la describe como la primera variedad de cebada desarrollada en México para condiciones de temporal que tiene cierto nivel de resistencia a roya amarilla. Dicha variedad, sigue conservando su resistencia.

Efecto de los fungicidas y comportamiento agronómico de las variedades. Los tratamientos originados de la combinación de variedades con los fungicidas aplicados (Cuadro 4), muestran el comportamiento de cada una de las variedades por efecto del producto. Los fungicidas afectaron el comportamiento de las variedades para las

treatment, except for Apizaco without fungicide, comply with the values specified in the Mexican norm NMX-FF-043-SCFI-2003 for the marketing of barley, as indicated by González-González *et al.* (2016). The highest PH values were obtained in the combinations of AC Metcalfe-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (62.56 kg hL⁻¹) and Doña Josefa-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (62.53 kg hL⁻¹).

Grain yield (REND) increased in every variety when fungicides were applied. The varieties where Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% were applied gave higher yields than those with Tebuconazole 25%, except Maravilla and AC-Metcalfe, where Tebuconazole 25% was

Cuadro 4. Comportamiento promedio de seis variedades de cebada con y sin aplicación de fungicidas, evaluadas en tres localidades durante el ciclo Primavera-Verano, 2018.

Table 4. Average behavior of six varieties of barley with and without the use of fungicides, evaluated in three locations during the 2018 Spring-Summer cycle.

| Tratamientos | DM | PH | REND | SFE (%) | ABCPE |
|--------------------|------------|------------|--------------|----------|-----------|
| Apizaco -Sf | 124.33 fgh | 55.53 g | 2015.1 h | 57.50 a | 474.83 a |
| Apizaco -Teb | 127.25 ef | 59.33 ef | 2284.3 gh | 12.91 d | 134.50 d |
| Apizaco -Az+Teb | 126.66 ef | 60.63 bcde | 2710.8 cdefg | 8.33 def | 128.58 d |
| Esmeralda-Sf | 119.16 i | 61.60 abc | 2325.9 efgh | 6.33 def | 39.58 fg |
| Esmeralda-Teb | 122.08 ghi | 62.26 ab | 2388.5 gh | 0.41 f | 6.25 g |
| Esmeralda-Az+Teb | 122.83 gh | 62.26 ab | 2695.1 cdefg | 0.58 f | 9.08 g |
| Doña Josefa-Sf | 123.08 gh | 59.80 def | 2877.8 bcde | 0.83 f | 15.08 g |
| Doña Josefa-Teb | 127.41 e | 61.80 abc | 3258.3 ab | 0.00 f | 1.58 g |
| Doña Josefa-Az+Teb | 126.91 ef | 62.53 a | 3567.4 a | 0.00 f | 1.25 g |
| Maravilla-Sf | 121.83 hi | 60.36 cdef | 2490.2 defgh | 0.83 f | 11.08 g |
| Maravilla-Teb | 123.33 gh | 60.76 bcde | 2950.7 bcd | 0.00 f | 0.00 g |
| Maravilla-Az+Teb | 125.00 efg | 58.66 f | 2862.7 bcdef | 0.00 f | 0.00 g |
| AC-Metcalfe-Sf | 135.25 d | 60.63 bcde | 2363.0 fgh | 27.08 c | 207.50 c |
| AC-Metcalfe-Teb | 138.58 abc | 61.56 abc | 2689.9 cdefg | 6.50 def | 59.67 efg |
| AC-Metcalfe-Az+Teb | 137.83 bcd | 62.56 a | 2439.4 efgh | 3.16 ef | 47.25 efg |
| ABI-Voyager-Sf | 137.00 cd | 60.20 cdef | 2322.2 gh | 44.58 b | 341.92 b |
| ABI-Voyager-Teb | 140.50 ab | 61.20 abcd | 2879.7 bcde | 9.66 de | 110.25 de |
| ABI-Voyager-Az+Teb | 141.50a | 61.30 abcd | 3043.2 bc | 7.08 def | 92.08 def |
| DMS | 3.02 | 1.72 | 501.8 | 8.54 | 63.97 |

DM= días a madurez, PH: peso hectolítrico, REND= rendimiento de grano (kg ha⁻¹), SFE= severidad final de la enfermedad. ABCPE= Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad; Sf= Sin fungicida, Az+Teb= Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%, Teb=Tebuconazole 25%. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (DMS, $p \leq 0.01$). / DM= days to maturity, PH: test weight, REND= grain yield (kg ha⁻¹), SFE= final disease severity. AUDPC= Area under the disease progress curve; Sf= Without fungicide, Az+Teb= Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%, Teb=Tebuconazole 25%. Means with the same letter are not statistically different (DMS, $p \leq 0.01$).

variables evaluadas con excepción de DE y AP. La variedad Esmeralda fue la más precoz en todos sus tratamientos para DM en tanto que las variedades de dos hileras fueron las más tardías; se observó una tendencia a incrementar la duración del ciclo cuando se aplica algún producto que cuando no se aplica. Los resultados obtenidos muestran que Esmeralda fue el genotipo más precoz cuando no se aplica fungicida (Esmeralda-Sf), y el más tardío la combinación de ABI-Voyager-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%. De manera general, los tratamientos sin fungicida fueron los más precoces en cada variedad, mientras que cuando se aplicó Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%, se observó que el comportamiento de las variedades Esmeralda, Maravilla y ABI-Voyager fue el de retardar la senescencia de la hoja, mientras que con Tebuconazole 25% fueron las variedades Apizaco, Doña Josefa y AC-Metcalfe. Bertelsen *et al.* (2001) reportaron que el fungicida Azoxistrobin provoca un retraso en la senescencia de la hoja; sin embargo, esto no significa necesariamente un aumento en la biomasa ni el rendimiento de grano.

Para la variable PH, se puede apreciar un mayor peso hectolítrico dentro de cada variedad cuando se aplica algún fungicida que cuando no se aplica (Cuadro 4), excepto en la combinación Maravilla-Az+Teb. Además, se observa una superioridad numérica al aplicar Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% sobre Tebuconazole 25% en todas las variedades excepto en Maravilla en la cual, Tebuconazole 25% fue superior a Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 25%. Los valores promedio de PH obtenidos en cada tratamiento con excepción de Apizaco-sin fungicida, cumplen con el valor especificado en la norma mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003 para la comercialización de cebada, como lo indican González-González *et al.* (2016). Los mayores PH fueron obtenidos en las combinaciones de AC Metcalfe-Azoxistrobin 11.1% +

numerically superior to Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (Table 4). The combination of Doña Josefa-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (3567.4 kg ha⁻¹) displayed the best yield, although it was similar statistically to that obtained in Doña Josefa-Tebuconazole 25% (3258.3 kg ha⁻¹) (Table 4). The lowest grain yield was obtained in the Apizaco variety when fungicide was not applied (Apizaco-Sf), a statistically similar value to most varieties when no fungicide was applied or when Tebuconazole 25% was applied on Apizaco and Esmeralda and Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% was applied on AC-Metcalfe. Devlash *et al.* (2015) proved that YR severely reduces grain yield in susceptible genotypes, and in these cases, the use of fungicides must be promoted to control the pathogen.

In terms of percentages, the increases in yield obtained when applying Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% were 35, 31, 24, 16, 15 and 3% in the varieties Apizaco, ABI Voyager, Doña Josefa, Emerald, Maravilla and AC Metcalfe, respectively, in comparison with not applying fungicide. These results show that the varieties respond differently to the application of these chemicals. Similar results were reported by Kanwar *et al.* (2018), who point out that when applying fungicides of the group of triazoles such as Trifloxystrobin 25% + Tebuconazole 50% and Tebuconazole 25.9%, they found an increase in grain yield of 56.5 and 53.27%, respectively. On the other hand, Selvakumar *et al.* (2014) reported an average increase in yield of 42.97% when applying Tebuconazole 25.9%.

For SFE, statistically similar values were obtained in most treatments (Table 4); the most notorious statistical differences were observed in the treatments of susceptible varieties such as Apizaco, AC Metcalfe and ABI Voyager, where SFE values reached 57.50, 27.08 and 44.58% in

Tebuconazole 18.4% (62.56 kg hL^{-1}) y Doña Josefa-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (62.53 kg hL^{-1}).

El rendimiento de grano (REND) se incrementó en cada variedad cuando se aplicaron fungicidas. Las variedades a las que se les aplicó Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% tuvieron rendimientos superiores que en aquéllas con aplicaciones de Tebuconazole 25%, excepto en Maravilla y AC-Metcalfé, donde Tebuconazole 25% fue superior numéricamente a Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% (Cuadro 4). La combinación de Doña Josefa-Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% ($3567.4 \text{ kg ha}^{-1}$) fue donde se obtuvo el mejor rendimiento, aunque estadísticamente similar al obtenido en Doña Josefa-Tebuconazole 25% ($3258.3 \text{ kg ha}^{-1}$) (Cuadro 4). El menor rendimiento de grano se obtuvo en la variedad Apizaco cuando no se aplicó fungicida (Apizaco-Sf) valor estadísticamente similar a la mayoría de las variedades cuando no se aplicó algún fungicida o cuando se aplicó Tebuconazole 25% en Apizaco y Esmeralda y Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% en AC-Metcalfé. Devlash *et al.* (2015) demostraron que la RA reduce severamente el rendimiento de grano en genotipos susceptibles, en estos casos se debe fomentar el uso de fungicidas efectivos para controlar al patógeno.

En términos de porcentaje, el aumento en el rendimiento obtenidos cuando se aplicó Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%, fueron del 35, 31, 24, 16, 15 y 3% en las variedades Apizaco, ABI Voyager, Doña Josefa, Esmeralda, Maravilla, y AC Metcalfé, respectivamente, en comparación con no aplicar fungicida. Estos resultados muestran que las variedades responden de forma diferente a la aplicación de estos productos. Resultados similares fueron reportados por Kanwar *et al.* (2018) quienes indican que al aplicar fungicidas del grupo de los triazoles como Trifloxystrobin 25%

these varieties, respectively, when the disease was not controlled, whereas with the application of fungicides, SFE is notoriously reduced. In varieties Esmeralda, Doña Josefa and Maravilla, SFE was very low in all treatments and were statistically similar amongst them, even when Esmeralda-without fungicide recorded a SFE of 6.33. These results indicate a greater resistance to YR of these three varieties in comparison with the varieties Apizaco, AC Metcalfé and ABI Voyager. The AUDPC shows a similar tendency to that observed in SFE, where the varieties Apizaco, AC Metcalfé and ABI Voyager have the highest values for this variable, whereas Esmeralda, Doña Josefa and Maravilla are the varieties with the lowest AUDPC values, and therefore the most resistant to the disease.

Effect of the fungicides on the severity of the disease. The results obtained indicate a clear effect of the fungicides on the varieties (Tables 1 and 4) and that, in addition, in each location, there was a different level of severity (Tables 2, 3 and Figure 1). This effect on the application of fungicides for the control of YR has a greater relevance when observing the superiority of the yield, PH and a greater health of plants in comparison to when the disease is not controlled. Out of the six varieties, only Esmeralda presented low SFE values (Table 4), similar to those obtained by the two forage varieties (Maravilla and Doña Josefa). In addition, except for Apizaco, it is possible to claim that the six-row varieties display lower SFE than the two-row varieties (ABI Voyager and AC Metcalfé). The analysis of the joint information does not display a statistical superiority of Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% on Tebuconazole 25% in most varieties for SFE (Table 4), therefore the application of either one of the two fungicides is effective in controlling the disease and ensures a higher grain

+Tebuconazole 50% y Tebuconazole 25.9% observaron un aumento en el rendimiento de grano del 56.5 y 53.27%, respectivamente. Por otra parte, Selvakumar *et al.* (2014) reportan incremento en el rendimiento promedio de 42.97% con la aplicación de Tebuconazole 25.9%.

Para SFE se obtuvieron valores estadísticamente similares en la mayoría de los tratamientos (Cuadro 4), las diferencias estadísticas más notables se observaron en los tratamientos de las variedades susceptibles como Apizaco, AC Metcalfe y ABI Voyager, donde se alcanzaron valores de SFE de 57.50, 27.08 y 44.58% en estas variedades, respectivamente, cuando no se controló la enfermedad; con la aplicación de fungicidas, disminuye notablemente la SFE. En las variedades Esmeralda, Doña Josefa y Maravilla, la SFE fue muy baja en todos sus tratamientos y fueron estadísticamente similar entre ellas, aún y cuando Esmeralda-sin fungicida registró SFE de 6.33. Estos resultados indican mayor resistencia a RA de estas tres variedades en comparación con las variedades Apizaco, AC Metcalfe y ABI Voyager. El ABCPE, muestra una tendencia similar a lo observado en SFE donde las variedades Apizaco, AC Metcalfe y ABI Voyager tienen los mayores valores para esta variable, mientras que Esmeralda, Doña Josefa y Maravilla son las variedades con los menores valores de ABCPE y por ende las más resistentes a la enfermedad.

Efecto de los fungicidas sobre la severidad de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican un efecto claro de los fungicidas en las variedades (Cuadros 1 y 4) y que, además en cada localidad se presentó una severidad diferente (Cuadros 2, 3 y Figura 1). Este efecto en la aplicación de fungicidas para el control de RA, tiene mayor relevancia al observar la superioridad del rendimiento, PH y mayor sanidad de las plantas en comparación a cuando no se realiza el control de la enfermedad. De las seis

yield, particularly in susceptible varieties. This coincides with the report by Devlash *et al.* (2015), who point out that applying fungicide, regardless of the product, significantly reduces the severity of the disease and increases yield in comparison with the control without fungicide, and they also point out that Tebuconazole reduced the disease severity by up to 91.8%. On the other hand, Walters *et al.* (2012) mention that protecting the plant from disease is better than trying to eradicate the pathogen, indicating that triazoles and strobilurins are effective in the reduction of the incidence of YR. Gangwar *et al.* (2018) mention that the fungicides belonging to the group of the triazoles, such as Tebuconazol 25%, and to the strobilurins, such as Azoxystrobin 25%, have proven to be effective in the control of rust in barley.

Losses in grain yield. Table 5 shows yield losses caused by YR in the three locations evaluated. The highest loss percentages were recorded in Relinas, with Apizaco being the variety with the greatest loss (53%), followed by AC Metcalfe (36%) and ABI Voyager (25%); Maravilla was the variety with the lowest percentage of losses, with only 5%. The location of Moxolahuac was the location with the second greatest loss, and where Apizaco and ABI Voyager had percentages of 26 and 25%, respectively. Esmeralda and Maravilla were the varieties with the least losses, with 13% each. For the location of Soltepec, the greatest losses were recorded in the varieties ABI Voyager (23%) and Doña Josefa (19%), while Esmeralda was the best variety with only 6% of yield loss. These results indicate that the varieties released by INIFAP (Esmeralda and Maravilla) are less affected in their yields by the presence of YR, while the two-row varieties, AC Metcalfe and ABI Voyager, along with Apizaco, are the varieties most affected by yellow rust due to their susceptibility.

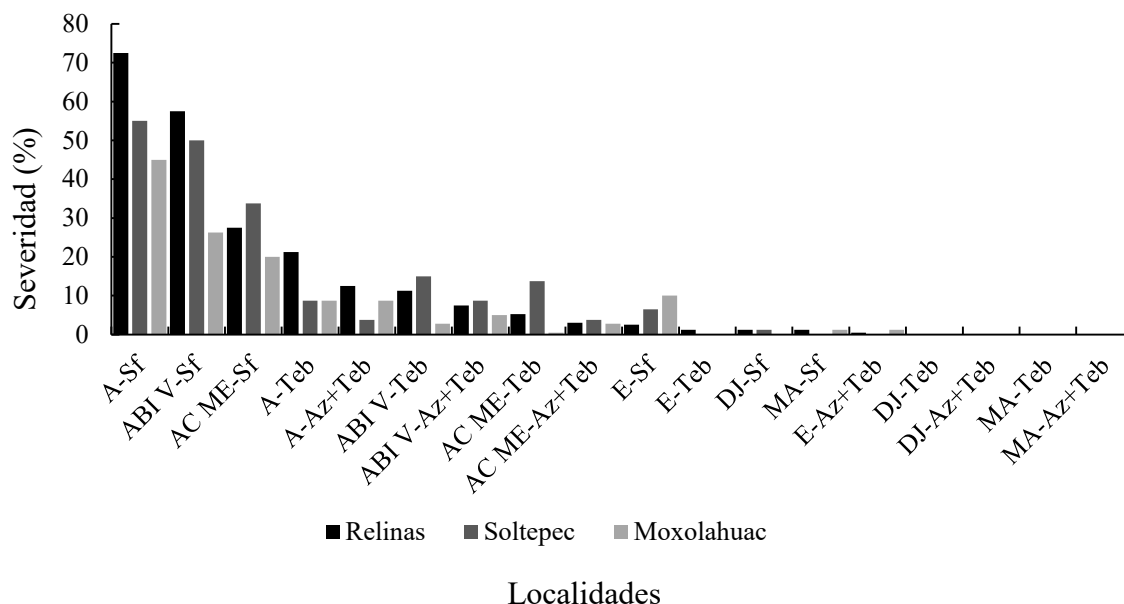


Figura 1. Comportamiento promedio por localidad de la severidad final de la enfermedad en seis variedades de cebada con y sin aplicación de fungicidas. A=Apizaco; DJ=Doña Josefa; E=Esmeralda; MA=Maravilla; AC ME=Metcalfe; ABI V=Voyager; Sf=Sin fungicida; Az+Teb=Azoxistrobin+Tebuconazole; Teb=Tebuconazole.

Figure 1. Average behavior by location of the final severity of the disease in six barley varieties with and without the use of fungicides. A=Apizaco; DJ=Doña Josefa; E=Esmeralda; MA=Maravilla; AC ME=Metcalfe; ABI V=Voyager; Sf=Sin fungicida; Az+Teb=Azoxistrobin+Tebuconazole; Teb=Tebuconazole.

variedades, las cuatro malteras, únicamente Esmeralda presentó valores de SFE bajos (Cuadro 4), cuyo valor fue similar al obtenido por las dos variedades forrajeras (Maravilla y Doña Josefa). Además, excluyendo Apizaco, es posible afirmar que las variedades de seis hileras presentan los menores valores de SFE que las variedades de dos hileras (ABI Voyager y AC Metcalfe). El análisis de la información conjunta no muestra una superioridad estadística de Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% sobre Tebuconazole 25% en la mayoría de las variedades para SFE (Cuadro 4), por lo que la aplicación de cualquiera de los dos fungicidas es efectiva para el control de la enfermedad y asegura un mayor rendimiento de grano, particularmente en variedades susceptibles; esta aseveración coincide con lo reportado por Devlash *et al.* (2015), quienes indican que al aplicar fungicida sin importar que

The yields obtained (average percentage) when Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% was applied were of 31, 24, 19, 18, 13 and 12 % in the varieties Apizaco, ABI Voyager, AC Metcalfe, Doña Josefa, Esmeralda and Maravilla, respectively, in comparison with not applying fungicide (Table 5). These results indicate that the varieties respond differently to these products and that they have different levels of resistance, although these differences do not statistically imply a higher yield. YR has caused significant losses in barley around the world. Marshall and Sutton (1995) reported losses of up to 72% in susceptible varieties, whereas Dubin and Stubbs (1986) indicate that losses in yield were estimated in 30 to 70% in Andean countries. On the other hand, Safavi *et al.* (2012) reported average losses caused by this disease in yield components such as the weight of one

producto sea, se reduce significativamente la severidad de la enfermedad y se aumenta el rendimiento en comparación con el testigo sin aplicación e indican que Tebuconazol redujo la severidad de la enfermedad hasta un 91.8%. Por otra parte, Walters *et al.* (2012) mencionan que es preferible proteger a la planta de la enfermedad y no tratar de erradicar el patógeno, indicando que los triazoles y las estrobilurinas son efectivos para reducir la incidencia de RA. Gangwar *et al.* (2018) mencionan que los fungicidas pertenecientes al grupo de los triazoles como Tebuconazol 25% y a las estrobilurinas como Azoxystrobin 25% han demostrado ser efectivos para el control de royas en cebada.

Pérdidas en el rendimiento de grano. En el Cuadro 5 se muestran las pérdidas del rendimiento ocasionadas por RA en las tres localidades evaluadas. Los mayores porcentajes de pérdidas se registraron en Relinas, siendo Apizaco la variedad con mayor pérdida (53%), seguido de AC Metcalfe (36%) y ABI Voyager (25%); Maravilla fue la variedad con menor porcentaje de pérdida con solo 5%. La localidad de Moxolahuac fue la segunda localidad con

thousand grains of 31% in susceptible genotypes, 3% in genotypes with resistance of a specific race, and 12% in lines with partial resistance, and for grain per spike, they reported losses of 19% (susceptible), 0.2% (specific race) and 8% (partial resistance). Kumar *et al.* (2020) reported losses in yield in Alberta, Canada, which range between 17.6 and 91% in susceptible varieties, and they point out that the application of fungicide is necessary when moderately resistant varieties are used and the disease prevail, which will reduce yield losses. Yellow rust is currently becoming more frequent in Mexico and the varieties planted do not have satisfactory levels of resistance, therefore one of the strategies to avoid losses in yield and the subsequent low-quality grain is to use chemical control methods as a complement to genetic control, using the control rationally and responsibly, to avoid contributing to the deterioration of the natural resources and to the resistance of the pathogen. Murray and Brennan (2010) point out that the use of chemical products must be in the correct dose in order to avoid producing lower amounts of residues in the environment, but particularly to stop the

Cuadro 5. Pérdidas promedio en el rendimiento de grano (kg ha⁻¹) de cebada ocasionadas por *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* para tres localidades, seis variedades y el fungicida Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazol 18.4%.
Table 5. Average losses in grain yield (kg ha⁻¹) of barley caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* for three locations, six varieties and the fungicide Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazol 18.4%.

| Variedades | Relinas | | | Soltepec | | | Moxolahuac | | | Pp (%) |
|-------------|---------|---------|-------|----------|---------|-------|------------|---------|-------|--------|
| | REND SF | REND CF | P (%) | REND SF | REND CF | P (%) | REND SF | REND CF | P (%) | |
| Apizaco | 646 | 1381 | 53 | 3103 | 3653 | 15 | 2297 | 3098 | 26 | 31 |
| AC Metcalfe | 542 | 844 | 36 | 3876 | 4161 | 7 | 2672 | 3158 | 15 | 19 |
| ABI Voyager | 787 | 1052 | 25 | 3558 | 4596 | 23 | 2623 | 3482 | 25 | 24 |
| Esmeralda | 983 | 1242 | 21 | 3125 | 3320 | 6 | 3057 | 3523 | 13 | 13 |
| Doña Josefa | 1227 | 1400 | 12 | 3972 | 4906 | 19 | 3435 | 4397 | 22 | 18 |
| Maravilla | 1136 | 1198 | 5 | 3279 | 4020 | 18 | 2994 | 3433 | 13 | 12 |

REND= rendimiento de grano (kg ha⁻¹); P= porcentaje de pérdidas; Pp= porcentaje de pérdidas promedio; SF= sin fungicida; CF= con fungicida. / REND= grain yield (kg ha⁻¹); P= percentage of losses; Pp= percentage of average losses; SF= without fungicide; CF= with fungicide.

mayores pérdidas y en ella, Apizaco y ABI Voyager tuvieron 26 y 25%, respectivamente. Esmeralda y Maravilla fueron las variedades con menores pérdidas con 13% cada una. Para la localidad de Soltepec, las mayores pérdidas se registraron en las variedades ABI Voyager (23%) y Doña Josefa (19%), mientras que Esmeralda fue la mejor variedad con solo 6% de pérdida en su rendimiento. Estos resultados indican que las variedades liberadas por INIFAP (Esmeralda y Maravilla), son menos afectadas en sus rendimientos por la presencia de RA mientras que, las variedades de dos hileras: AC Metcalfe y ABI Voyager, al igual que Apizaco son las variedades más afectadas por la roya amarilla por su susceptibilidad.

Los rendimientos obtenidos (porcentaje promedio) cuando se aplicó Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4%, fueron del 31, 24, 19, 18, 13 y 12% en las variedades Apizaco, ABI Voyager, AC Metcalfe, Doña Josefa, Esmeralda y Maravilla, respectivamente en comparación con no aplicar fungicida (Cuadro 5). Estos resultados muestran que las variedades responden de forma diferente a la aplicación de estos productos y que poseen niveles de resistencia diferente, no obstante, estas diferencias no implican un mayor rendimiento estadísticamente.

Mundialmente, la RA ha causado pérdidas significativas en el cultivo de cebada; Marshall y Sutton (1995) reportaron pérdidas hasta de 72% en variedades susceptibles; mientras que Dubin y Stubbs (1986) indican que las pérdidas en rendimiento se estimaron de 30 a 70% en los países andinos. Por otra parte, Safavi *et al.* (2012), reportaron pérdidas promedio por esta enfermedad en componentes de rendimiento como peso de mil granos del 31% en genotipos susceptibles, del 3% en genotipos con resistencia de raza específica y del 12% en líneas con resistencia parcial, y para granos por espiga reportaron pérdidas del 19% (susceptibles), 0.2%

pathogen from becoming resistant to the products applied. Likewise, Walters *et al.* (2012) mention that the control of diseases in barley depends, to a large extent, on the combined use of fungicides and resistant varieties, along with adequate agronomic practices. Therefore, to carry out an efficient control of YR in barley, it is necessary to consider diverse aspects, including the production environment, the variety to be planted and the fungicide product to be applied, which will contribute towards having a lower impact on the environment and a higher income for the farmer.

CONCLUSIONS

The fungicide Azoxistrobin 11.1 % + Tebuconazole 18.4% presented the best control of yellow rust in barley and caused an increase of 35% in grain yield. The use of fungicides gave the greatest grain test weight. The losses in grain yield due to the disease reached 53%. Chemical control is a feasible alternative for the control of yellow rust in the barley crop in rainfed environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the fiscal barley project of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP): Genetic Breeding of Barley to obtain highly productive and disease-resistant forage lines No. SIGI: 12532434778.

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

(raza específica) y 8% (resistencia parcial). Kumar *et al.* (2020) reportaron pérdidas en el rendimiento en Alberta, Canadá que van del 17.6 al 91% en variedades susceptibles, e indican que es necesario

aplicar fungicida cuando se usan variedades moderadamente resistentes y la enfermedad es prevalente, lo cual reducirá las pérdidas en el rendimiento.

Actualmente en México, la roya amarilla de la cebada se está presentando con más frecuencia y las variedades sembradas no poseen niveles satisfactorios de resistencia, por lo cual una de las estrategias para evitar las pérdidas en rendimiento y la subsecuente obtención de mala calidad del grano, es utilizar el control químico como complemento al control genético, cuidando la utilización racional y responsable de dicho control, para evitar contribuir al deterioro de los recursos naturales y a la resistencia del patógeno. Murray y Brennan (2010) indican que la utilización de productos químicos debe ser en la dosis adecuada para no generar tantos residuos al ambiente, pero sobre todo para evitar que el patógeno genere resistencia al producto aplicado. Por su parte, Walters *et al.* (2012) mencionan que el control de enfermedades en la cebada depende en gran medida del uso combinado de fungicidas y variedades resistentes, junto con prácticas agronómicas apropiadas. Por ello, para tener un control eficiente de la RA en el cultivo de cebada, es necesario considerar diversos aspectos entre ellos el ambiente de producción, la variedad a sembrar y el producto fungicida por aplicar, lo cual permitirá tener un menor impacto en el ambiente y mayores ingresos económicos para el productor.

## CONCLUSIONES

El fungicida Azoxistrobin 11.1% + Tebuconazole 18.4% presentó el mejor control de la roya amarilla de la cebada y causó un incremento del 35% en el rendimiento de grano. Con la aplicación de fungicidas se obtuvo mayor peso hectolítrico del grano. Las pérdidas en el rendimiento de grano por efecto de la enfermedad fueron de hasta 53%. El

control químico, es una alternativa viable para el control de la roya amarilla en el cultivo cebada en ambientes de temporal.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto fiscal de cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP): Mejoramiento Genético de cebada para obtener líneas forrajeras de alta productividad y tolerantes a enfermedades No. SIGI: 12532434778.

## LITERATURA CITADA

- Bertelsen JR, Neergaard E and Smedegaard-Petersen V. 2001. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. *Plant Pathology* 50(2): 190-205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00545.x>
- Bjarko ME and Line RF. 1988. Heritability and number of genes controlling leaf rust resistance in four cultivars of wheat. *Phytopathology* 78(4): 457-461.
- Brown WM, Hill JP and Velasco VR. 2001. Barley yellow rust in North America. *Annual Review of Phytopathology* 39:367-384. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.367>
- Calhoun DS, Luna A and Vivar FHE. 1988. Chemical control of barley stripe rust, a new disease for North America. *Barley Newsletter* 32: 109-112.
- Cuéllar-Zambrano C, Sandoval-Islas S, Quijano-Carranza JA, Zamora-Díaz M y Gómez-Mercado R. 2015. Modelo de infección y desarrollo de *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* Eriks en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Publicación Especial* 11: 2219-2224.
- Devlash R, Kishore N and Singh GD. 2015. Management of stripe rust of barley (*Hordeum vulgare* L.) using fungicides. *Journal of Applied and Natural Science* 7(1): 170-174. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.583>
- Dubin HJ and Stubbs RW. 1986. Epidemic spread of barley stripe rust in South America. *Plant Disease* 70(2): 141-144.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2020. *Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Diciembre 2020).
- Gangwar OP, Bhardwaj SC, Singh GP, Prasad P and Kumar S. 2018. Barley disease and their management: An Indian perspective. *Wheat and Barley Research* 10(3): 138-150. <https://doi.org/10.25174/22494065/2018/83844>
- González-González M, Zamora-Díaz M, Huerta-Zurita R y Solano-Hernández S. 2013. Eficacia de tres fungicidas para controlar roya de la hoja en cebada maltera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(8): 1237-1250. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a10.pdf>

- González-González M, Zamora-Díaz M y Solano-Hernández S. 2016. Evaluación agronómica y física en líneas avanzadas de cebada maltera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(1): 159-171. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n1/2007-0934-remexca-7-01-00159-en.pdf>
- Guzmán-Ortiz FA, Soto-Carrasquel A, López-Perea P and Román-Gutiérrez AD. 2019. Valuation and use of a new variety of barley for brewing craft beer. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas* 11(1): 81-95. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2018.01.001>
- Jalata Z, Ayana A and Fufa F. 2011. Assessment of yield stability and disease responses in Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces and crosses. *International Journal of Agricultural Research* 6(11): 754-768. <https://doi.org/10.3923/ijar.2011.754.768>
- Kanwar H, Shekhawat PS, Kumar V and Nathawat BDS. 2018. Evaluation of fungicides for the management of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*) of barley. *Wheat and Barley Research* 10(3): 224-227. <https://doi.org/10.25174/2249-4065/2018/83425>
- Kumar K, Xi K, Turkington TK, Aljarrah M and Capettini F. 2020. Yield responses in spring wheat and barley cultivars, varying in stripe rust resistance in central Alberta. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42(3): 344-352. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1680443>
- Line RF. 2002. Stripe rust of wheat and barley in North America: A retrospective historical review. *Annual Review of Phytopathology* 40: 75-118. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.020102.111645>
- Marshall D and Sutton RL. 1995. Epidemiology of stripe rust, virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*, and yield loss in barley. *Plant Disease* 79(7): 732-737. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0732>
- Murray GM and Brennan JP. 2010. Estimating disease losses to the Australian Barley industry. *Australasian Plant Pathology* 39(1): 85-96. <https://link.springer.com/article/10.1071/AP09064>
- Newton AC, Flavell AJ, George TS, Leat P, Mullholland B, Ramsay L, Revoredo-Giha C, Russell J, Steffenson BJ, Swanston JS, Thomas WTB, Waugh R, White PJ and Bingham IJ. 2011. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Security* 3:141-178. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0126-3>
- Peterson RF, Campbell AB and Hannah AE. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stem of cereals. *Canadian Journal of Research*. 26c(5): 496-500. <https://doi.org/10.1139/cjr48c-033>
- Rodríguez-García MF, González-González M, Huerta-Espino J, Solano-Hernández S y Villaseñor-Mir HE. 2019. Evaluación de fungicidas para el control de la roya lineal amarilla en cebada. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(Suplemento): S89. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen372019/S372019.pdf>
- Rodríguez-García MF, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, Rivas-Valencia P, González-González M, Hortelano-Santa Rosa R, Robles-Yerena L and Aranda-Ocampo S. 2020. Chemical treatment to wheat seed to reduce the incidence of bacteria. *Mexican Journal of Phytopathology* 30(2): 239-249. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2001-5>
- Roelfs AP, Huerta-Espino J and Marshall D. 1992. Barley stripe rust in Texas. *Plant Disease*. 76: 538.
- Safavi SA, Badai-Ahari A, Afshari F and Arzanlou M. 2012. Effect of yellow rust on yield components of barley cultivars with race-specific and slow rusting resistance to yellow rust. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(12): 1488-1498. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.677493>
- Sandoval-Islas JS, Osada-Kawasoe S, Vivar-Flores H y Benítez-Riquelme I. 1999. Correlación entre resistencia en plántula y resistencia en planta adulta a la roya amarilla y a la escaldadura de la cebada. *Agrociencia* 33(4): 415-422. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1627>
- Selvakumar R, Meeta M, Shekhawat PS, Verma RPS and Sharma I. 2014. Management of stripe rust of barley using fungicides. *Indian Phytopathology* 67(2):138-142.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.
- Vaish SS, Ahmed SB and Prakash K. 2011. First documentation of status of barley diseases from the high altitude cold arid trans-Himalayan Ladakh region of India. *Crop Protection* 30(9): 1129-1137. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.015>
- Walters DR, Avrova A, Bingham IJ, Burnett FJ, Fountaine J, Havis ND, Hoad SP, Hughes G, Looseley M, Oxley SJP, Renwick A, Topp CFE and Newton AC. 2012. Control of foliar diseases in barley: towards an integrated approach. *European Journal of Plant Pathology* 133(1): 33-73. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9948-x0>
- Zadoks JC, Chang TT and Konzak CF. 1974. A Decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14(6): 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zamora DM, Márquez CLA, Ramirez PF e Ibañez CAM. 1997. ESMERALDA Variedad de cebada maltera para los Valles Altos. Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Folleto Técnico No. 5. Chapingo, Edo. de Méx., México. 20 p.
- Zamora-Díaz M, Pérez-Ruiz JA, Huerta-Zurita R, López-Cano ML, Gómez-Mercado R y Rojas-Martínez I. 2017. Maravilla: variedad de cebada forrajera para Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(6): 1449-1454. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n6/2007-0934-remexca-8-06-1449.pdf>



# Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils

## Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido

**Jonathan Savín-Molina**, <sup>1</sup>Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al sur km 5.5. Colonia El Mezquitito, CP 23080, La Paz, Baja California Sur, México; **Luis Guillermo Hernández-Montiel**, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Avenida Instituto Politécnico Nacional 195. Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur, CP 23096, La Paz, Baja California Sur, México; **Wilson Ceiro-Catasú**, Ministerio de Educación Superior, Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo km 17 Peralejo, CP 85149, Granma, Cuba; **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Escorza 900, Colonia Centro, CP 31000, Chihuahua, Chihuahua, México; <sup>1</sup>**Alejandro Palacios-Espinosa**, <sup>1</sup>**Francisco Higinio Ruiz-Espinoza**, <sup>1</sup>**Mirella Romero-Bastidas**\*

\*Autor para correspondencia: miromero@uabcs.mx

Recibido: 29 de Junio, 2021.

Aceptado: 15 de Agosto, 2021.

Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruiz-Espinoza FH and Romero-Bastidas M. 2021. Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 435-451.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-7>

Primera publicación DOI: 26 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 26, 2021.

**Resumen.** Se aislaron, identificaron y caracterizaron especies de *Trichoderma* spp. asociadas a plantas de *Pachycereus pringlei* y *Jatropha cinerea* como agentes de biocontrol hacia hongos fitopatógenos. Los agentes antagonísticos se aislaron de seis sitios en Baja California Sur, México. La identificación se realizó en base a sus características

**Abstract.** Species of *Trichoderma* spp. were isolated, identified and characterized associated with *Pachycereus pringlei* and *Jatropha cinerea* as biocontrol agents against phytopathogenic fungi. The antagonistic agents were isolated from six sites in Baja California Sur, Mexico. The identification was made based on its morphological characteristics and abundance, frequency of occurrence and mycelial growth of *Trichoderma* spp. and *in vitro* antagonism against *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *C. gloeosporioides* and *A. alternata* was determined. Eighteen *Trichoderma* isolates concentrated in seven species were obtained: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* and *Trichoderma* spp. Duncan's test ( $p < 0.05$ ) showed significant differences in the abundance of the species (CFU/g of soil) and the frequency of occurrence. The largest population was found in El Saltito, Los Encinos and

morfológicas y se determinó; abundancia, frecuencia de ocurrencia y antagonismo *in vitro* hacia *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *C. gloeosporioides* y *A. alternata*. Se obtuvieron 18 aislamientos de *Trichoderma* concentrados en siete especies: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *Trichoderma* sp. La prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) mostró diferencias significativas en la abundancia de las especies (UFC/g de suelo) y la frecuencia de ocurrencia. La mayor población se encontró en El Saltito, Los Encinos y Las Pocitas con UFC de 2.1, 1.8 y  $0.7 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$  de suelo respectivamente. En el antagonismo *in vitro*, *T. koningii* inhibió significativamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos comparado con el control comercial. La actividad antifúngica de las diversas especies de *Trichoderma* spp. pueden ser una alternativa para el biocontrol de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos de las especies analizadas.

**Palabras clave:** Hongo, suelo, diversidad, población, fitopatógenos, control biológico.

*Trichoderma* (Ascomycota: Hypocreales) es un hongo cosmopolita que incluye a más de 100 especies presentes en diferentes zonas climáticas y se encuentra colonizando a una amplia gama de nichos, incluidas plantas vivas y muertas, suelo, sedimento, materia orgánica, tejido animal, entre otros (Wang y Zhuang, 2020; Nuangmek *et al.*, 2021). *Trichoderma* spp. poseen un metabolismo versátil que les da capacidad de controlar a diversos fitopatógenos debido principalmente a la producción de enzimas hidrolíticas, competencia por espacio y nutrientes, inducción de resistencia en el hospedero, antibiosis, micoparasitismo, entre otros (Gamarra *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020). Existe un progreso significativo sobre los mecanismos reguladores que utilizan las distintas especies

Las Pocitas with CFU of 2.1, 1.8 and  $0.7 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$  of soil respectively. In the *in vitro* antagonism, *T. koningii* was the one that significantly inhibited the growth of phytopathogenic fungi. The antifungal activity of the various of *Trichoderma* spp. can be an alternative for the biocontrol of diseases caused by phytopathogenic fungi.

**Key words:** Fungus, soil, diversity, population, phytopathogens, biological control.

*Trichoderma* (Ascomycota: Hypocreales) is a cosmopolitan fungus that includes over 100 species found in different climatic zones and colonizes a wide range of niches, including living and dead plants, soil, sediment, organic matter, animal tissue, and others (Wang and Zhuang, 2020; Nuangmek *et al.*, 2021). *Trichoderma* spp. has a versatile metabolism that gives it the ability to control diverse phytopathogens, due mainly to the production of hydrolytic enzymes, competition for space and nutrients, resistance induction in the host, antibiosis, mycoparasitism, among others (Gamarra *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020). There has been significant progress on the regulating mechanisms used by different species to establish themselves in terrestrial or marine habitats (Gal-Hemed *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2018). One of the differences is reportedly the more efficient production of secondary metabolites (6-pentyl- $\alpha$ -pyrone and trichodermaketones), along with a greater production of enzymes (chitinase and  $\beta$ -1,3-endoglucanase) (Kim *et al.*, 2020). Some of the most important *Trichoderma* species acting as biocontrol agents against phytopathogens are *T. reesei*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. aureoviride*, and others (Brito *et al.*, 2020; Alfiky and Weisskopf, 2021).

This genus is used to develop commercial bioproducts for the control of plant diseases (Singh

para establecerse en hábitats terrestres o marinos (Gal-Hemed *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2018). Se ha reportado que unas de las diferencias consisten en la producción más eficiente de metabolitos secundarios (6-pentil- $\alpha$ -pirona y trichodermacetonas). Así como mayor producción de enzimas (quitinasa y  $\beta$ -1,3-endoglucanasa) (Kim *et al.*, 2020). Dentro de las especies de *Trichoderma* más importantes como agentes de biocontrol hacia fitopatógenos se encuentran: *T. reesei*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. aureoviride*, entre otros (Brito *et al.*, 2020; Alfiky y Weisskopf, 2021).

Este género es utilizado para desarrollar bioproductos comerciales para el control de enfermedades en las plantas (Singh y Jadon, 2019; Carrillo *et al.*, 2020); sin embargo, existen casos de baja eficiencia en el control de fitopatógenos, debido a que las diversas especies de *Trichoderma* que componen los bioproductos comerciales son originarios de regiones edafoclimáticas diferentes a la zona geográfica donde se aplica (Harman *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante la selección de microorganismos nativos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la región donde se pretende realizar el biocontrol de las enfermedades en plantas (Al-Mekhlafi *et al.*, 2019; Tegene *et al.*, 2021). Alrededor del mundo, se desarrollan actividades agrícolas bajo climas desérticos con limitadas precipitaciones durante el año y temperaturas extremas con más de 40 °C. Los suelos en las zonas semiáridas son comúnmente alcalinos con pobre materia orgánica (Yang *et al.*, 2019; Elnashar *et al.*, 2021), por lo tanto, las plantas agrícolas que crecen sobre estas condiciones necesitan de la aplicación de bioproductos que permitan lograr una mayor productividad y calidad de la cosecha, de tal manera que el estudio de *Trichoderma* spp. nativos de zonas desérticas son un importante recurso para la sostenibilidad de los cultivos agrícolas (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015; Michaud, 2018). En México, existen escasos estudios

and Jadon, 2019; Carrillo *et al.*, 2020). However, there are cases of low efficiency in the control of phytopathogens, since the diverse species of *Trichoderma* that make up the commercial bioproducts are originally from different edaphoclimatic regions to the geographic area in which it is applied (Harman *et al.*, 2010). It is therefore important to select native microorganisms adapted to the edaphoclimatic conditions of the place in which the biocontrol of plant diseases is intended to be carried out (Al-Mekhlafi *et al.*, 2019; Tegene *et al.*, 2021). Worldwide, agricultural activities are carried in deserts with limited yearly rainfall and extreme temperatures of over 40 °C. Soils in semiarid areas are commonly alkaline with poor organic matter (Yang *et al.*, 2019; Elnashar *et al.*, 2021), therefore, crops that grow under these conditions require bioproducts that help achieve a greater productivity and quality of the harvest, hence the study of *Trichoderma* spp. native to desert areas are an important resource for the sustainability of agricultural crops (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015; Michaud, 2018). In Mexico there are scarcely any studies related to obtaining native *Trichoderma* isolations in desert areas. Due to this, the aim of the present study was to isolate, identify and characterize *Trichoderma* species as biocontrollers of semiarid areas against phytopathogenic fungi.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling and study site.** During the year 2019-2020, strains of *Trichoderma* spp. were isolated in Baja California Sur, Mexico. In the area of study, the predominant climate is semiarid with a maximum temperature of 44 °C and a minimum of 16 °C with rainfalls of 122.5 mm/year. The predominant vegetation is the xerophilous scrub. Samples were taken from six places (Figure 1): Las

relacionados a la obtención de aislados nativos de *Trichoderma* asociado a suelos de zonas desérticas. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue el aislamiento, identificación y caracterización de especies de *Trichoderma* como biocontroladores de zonas semiáridas hacia hongos fitopatógenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio y muestro.** Durante el año 2019-2020, cepas de *Trichoderma* spp. fueron aisladas en Baja California Sur, México. En la zona de estudio predomina el clima semiárido con temperatura máxima de 44 °C y mínima de 16 °C, con precipitaciones de 122.5 mm/año. El tipo de vegetación predominante es el matorral xerófilo. Los muestreos se realizaron en seis sitios (Figura 1). Las Pocitas (24° 24' 30.13N-111° 5' 53.55"O y 57 msnm), El Cajete (24° 12' 56.95"N-110° 35' 17.21"O y 17 msnm), El Saltito (24° 14' 8.03"N-110° 12' 10.36"O y 55 msnm), Los Encinos (24° 0' 9.02"N-110° 9' 29.95"O y 530 msnm), El Triunfo (23° 47' 39.2"N-110° 7' 6.56"O y 516 msnm) y Los Barriles (23° 42' 7.72"N-109° 44' 39.69"O y 170 msnm). En cada sitio, se colectaron 10 muestras de suelo de 2 kg a una profundidad de 30 cm de la rizósfera de *Pachycereus pringlei* y *Jatropha cinerea* (especies representativas del matorral xerófilo) (Siddiquee, 2017). Las muestras fueron almacenadas en bolsas estériles a 20 °C.

**Aislamiento e identificación.** El aislamiento de *Trichoderma* spp. se realizó en el laboratorio de Fitopatología del área de agronomía en la Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. El procedimiento fue mediante el método propuesto por Karthikeyan *et al.* (2008). De cada muestra homogenizada de suelo se colectó una submuestra de 50 g y se agregó a un matraz con 450 mL de

Pocitas (24° 24' 30.13N-111° 5' 53.55" W and 57 masl), El Cajete (24° 12' 56.95"N-110° 35' 17.21" W and 17 masl), El Saltito (24° 14' 8.03" N-110° 12' 10.36" W and 55 masl), Los Encinos (24° 0' 9.02" N-110° 9' 29.95" W and 530 masl), El Triunfo (23° 47' 39.2" N-110° 7' 6.56" W and 516 masl) and Los Barriles (23° 42' 7.72" N-109° 44' 39.69" W and 170 masl). In each site, 10 soil samples were collected, each weighing 2 kg, at a depth of 30 cm of the *Pachycereus pringlei* and *Jatropha cinerea* rhizosphere (representative species of the xerophilous scrub) (Siddiquee, 2017). The samples were stored in sterile bags at 20 °C.

**Isolation and identification.** The isolation of *Trichoderma* spp. was performed in the Phytopathology Laboratory of the Autonomous University of Baja California Sur, Mexico. The procedure was carried out using the method proposed by Karthikeyan *et al.* (2008). From each homogenized soil sample, a 50 g subsample was taken and placed in a beaker with 450 mL of sterile distilled water and stirred for 20 min. One milliliter of the mixture was taken to carry out a series of dilutions until 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-5</sup> were obtained. Out of each dilution, a 200 µL aliquot was uniformly striated in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA, Bioxon) and incubated at 28 °C for seven days. After five days of incubation, the culture forming units (CFU), which displayed a green color, were quantified. They were replanted in PDA until pure cultures were obtained. The *Trichoderma* spp. isolations were identified with the taxonomic keys proposed by Rifai (1969), Barnett and Hunter (1972) and Bissett *et al.* (2015). The macroscopic morphological characteristics observed were the color of mycelia, the texture of mycelia and the formation of concentric rings. The microscopic characteristics determined under a compound microscope (Labomed LX 400) were

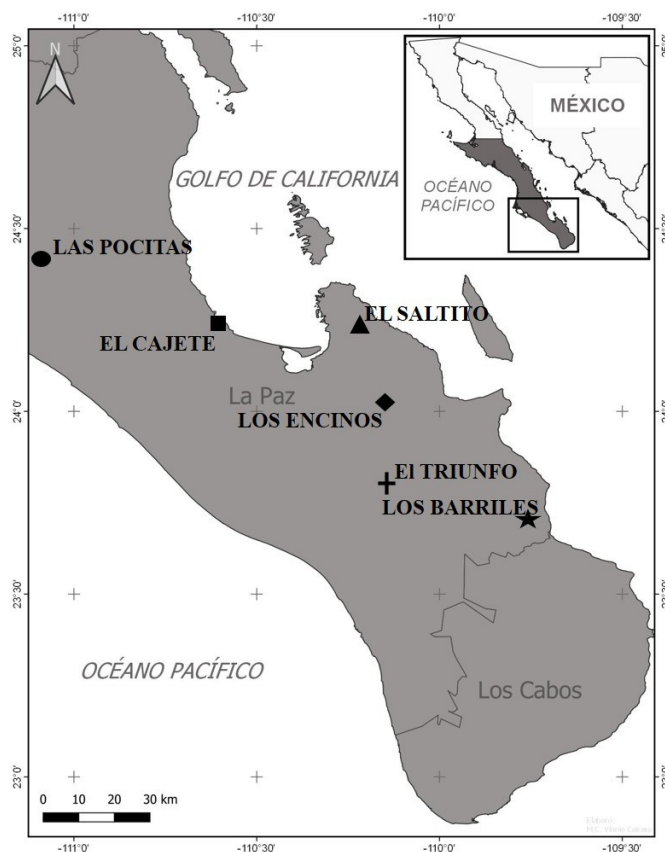


Figura 1. Sitios de estudio para el muestreo de suelo y el aislamiento de especies de *Trichoderma* en Baja California Sur, México.

Figure 1. Study sites for soil sampling and isolation of *Trichoderma* species in Baja California Sur, Mexico.

agua destilada estéril y se agitó por 20 min. De 1 mL de la mezcla fue tomado para realizar diluciones seriadas hasta obtener  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . De cada dilución, una alícuota de 200  $\mu$ L, se estrío uniformemente en cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Bioxon) y se incubaron a 28 °C por siete días. Después de cinco días de incubación se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) que aparecieron de color verde. Se realizaron resiembras en PDA hasta la obtención de cultivos puros. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron identificados con las claves taxonómicas propuestas por Rifai (1969), Barnett y Hunter

the shape of conidia, phialides and the presence of chlamydospores.

***Trichoderma* abundance and frequency of occurrence.** The abundance and frequency of *Trichoderma* spp. were determined with the quantification of the cultures of each area of study using the formula proposed by Muniappan and Muthukumar (2014): Abundance = Number of CFUs from a fungus in the sample /total number of CFUs from all the fungi in each sample  $\times$  100 and it was expressed in CFU  $g^{-1}$ . The frequency of occurrence (F) was calculated using the formula



(1972) y Bissett *et al.* (2015). Las características morfológicas macroscópicas observadas fueron: color de micelio, textura de micelio y formación de anillos concéntricos. Mientras que las características microscópicas determinadas bajo un microscopio compuesto (Labomed LX 400) fueron: forma de conidios, fiálides y presencia de clamidosporas.

**Abundancia y frecuencia de ocurrencia de *Trichoderma* spp.** La abundancia y frecuencia de *Trichoderma* spp. se determinó con la cuantificación de las colonias de cada área de estudio mediante la fórmula propuesta por Muniappan y Muthukumar (2014): Abundancia = Número de UFC de un hongo en la muestra/Número total de UFC de todos los hongos en cada muestra  $\times 100$  y se expresó en UFC g<sup>-1</sup>. La frecuencia de ocurrencia (F) se calculó siguiendo la fórmula  $F (\%) = \# \text{ agroecosistemas con una especie de hongo} / \# \text{ agroecosistemas examinados} \times 100$ . Estos experimentos se realizaron con cinco repeticiones y evaluados dos veces en el tiempo.

**Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs. hongos fitopatógenos.** Se evaluó *in vitro* la actividad antagonista por el método de cultivo dual de los aislamientos de *Trichoderma* que presentaron la mayor velocidad de crecimiento micelial hacia cinco hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria alternata*) obtenidos del cepario del Laboratorio de fitopatología. Su patogenicidad fue evaluada previamente en estudios anteriores (Camacho-Aguiñiga, 2016; Núñez-Madera *et al.*, 2016; Rodríguez-Macías, 2016). Los microorganismos fueron cultivados en cajas Petri con PDA por siete días a 28 °C. Posteriormente, de los cultivos se tomó un disco de 5 mm de diámetro de cada *Trichoderma* y fitopatógeno y se depositaron ambos en los extremos de la caja a 6 cm de distancia entre sí. Las cajas Petri se incubaron

$F (\%) = \# \text{ agroecosistemas with a species of fungus} / \# \text{ agroecosistemas examined} \times 100$ . These experiments were carried out with five repetitions and evaluated twice.

**Antagonism of *Trichoderma* spp. vs. phytopathogenic fungi.** The antagonistic activity was evaluated *in vitro* using the dual culture method of the *Trichoderma* isolations that presented the greatest speed of mycelial growth towards five phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria alternata*) obtained from the ceparium of the Phytopathology Laboratory. Its pathogenicity was evaluated in earlier studies (Camacho-Aguiñiga, 2016; Núñez-Madera *et al.*, 2016; Rodríguez-Macías, 2016). The microorganisms were cultivated in Petri dishes with PDA for seven days at 28 °C. Later, a disk, 5 mm in diameter, was taken from each *Trichoderma* and phytopathogen and they were both placed on the edges of the dish, 6 cm away from each other. The Petri dishes were incubated at 28 °C for five days and the mycelial growth of the pathogen was measured in cm, in relation to the *Trichoderma*. A group of Petri dishes were planted with a *Trichoderma* from the commercial product Tricho-Sin® based on *T. harzianum* (commonly used in the organic agriculture of the region) along with the phytopathogens. As a control, Petri dishes were planted on one edge, only with each fungus. The percentage of inhibition (PI) was determined using the formula by Otadoh *et al.* (2011):  $PI (\%) = R1 - R2 / R1 \times 100$ , where R1 = mycelial growth of the fungus in the control dishes, and R2 = mycelial growth of the fungus in the presence of the antagonist. Ten repetitions were carried out per treatment and the experiment was performed twice.

**Statistical analyses.** The data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) using

a 28 °C por cinco días y se midió en cm el crecimiento micelial del fitopatógeno con relación al del *Trichoderma*. Un grupo de cajas Petri fueron sembradas con un *Trichoderma* proveniente del producto comercial Tricho-Sin® a base de *T. harzianum* (Usado comúnmente en la agricultura orgánica de la región) más los fitopatógenos. Como tratamiento control, cajas Petri fueron sembradas en un extremo solo con cada hongo. El porcentaje de inhibición (PI) se determinó siguiendo la fórmula de Otadoh *et al.* (2011):  $PI (\%) = R1-R2/R1 \times 100$ . Donde R1 = Crecimiento micelial del hongo en las cajas control y R2 = Crecimiento micelial del hongo en presencia del antagonista. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento y el experimento fue repetido dos veces en el tiempo.

**Análisis estadísticos.** Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software STATISTICA 10.0 (paquete de software StatSoft, Tulsa, OK) y se utilizó la prueba de Duncan ( $p \leq 0.05$ ) para la separación de medias. Antes del análisis de varianza, los porcentajes se transformaron en arcoseno-raíz cuadrada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aislamiento e identificación de aislados de *Trichoderma*.** Se obtuvieron 18 aislamientos agrupados en siete especies: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *Trichoderma* sp. (Cuadro 1). Conidios globosos a subglobosos fueron observados en *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *Trichoderma* sp. Sin embargo, fue elipsoidal en *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. koningii*. Cinco especies (*T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* y *Trichoderma* sp.) mostraron de dos a tres zonas concéntricas de conidiación, mientras que

the software STATISTICA 10.0 (StatSoft software package, Tulsa, OK) and Duncan's test ( $p \leq 0.05$ ) was used for the separation of means. Before the analysis of variance, the percentages were converted to arcsine-square root.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Isolation and identification of *Trichoderma* isolations.** Eighteen isolations were obtained and grouped in seven species: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* and *Trichoderma* sp. (Table 1). Globular to subglobular conidia were found in *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* and *Trichoderma* sp. However, ellipsoidal conidia were found in *T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. koningii*. Five species (*T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* and *Trichoderma* sp.) displayed two to three concentric areas of conidiation, whereas two species showed scattered conidiation in one ring (*T. koningii* and *T. asperellum*). Phialides displayed a globular shape in the center, except in *T. viride*, *T. koningii* and *T. asperellum*, which displayed a thin morphology. In most species, phialides tended to group into 2-3 whorls, except for *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*, which presented a solitary arrangement. These characteristics coincide with those indicated in the taxonomic keys pointed out earlier. Although *Trichoderma* sp. displayed a colonial morphology, which is typical to the genus, and microscopic similarities, some characteristics varied, such as the shape of the conidia, their arrangement and the sporocarp.

The presence of these species may represent possible stress-resistant biotypes. Osorio-Concepción *et al.* (2013) mention that the variability of isolations in one place may be stimulated by stress

**Cuadro 1. Características morfológicas de diferentes especies de *Trichoderma* aisladas de zona semiáridas del Noroeste de México.**  
**Table 1. Morphological characteristics of different species of *Trichoderma* isolated from semiarid zone of the Northwest Mexico.**

| Especie                   | Colonia                     | Micelio    | No. anillos | Conidias    | Fiálides                    |
|---------------------------|-----------------------------|------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| <i>T. atroviride</i>      | Verde oscuro                | Plano      | 2           | Globosa     | Agrupadas en 2-3 verticilos |
| <i>T. asperellum</i>      | Verde oscuro                | Plano      | 1           | Elipsoidal  | Agrupadas en 2-3 verticilos |
| <i>T. harzianum</i>       | Verde oscuro                | Algodonoso | 2           | Elipsoidal  | Solitarias                  |
| <i>T. longibrachiatum</i> | Verde ligero                | Algodonoso | 2           | Globosa     | Solitarias                  |
| <i>T. viride</i>          | Verde oscuro                | Algodonoso | 3           | Globosa     | Agrupadas en 2-3 verticilos |
| <i>T. koningii</i>        | Verde ligero a azul verdozo | Algodonoso | 1           | Elipsoidal  | Agrupadas en 2-3 verticilos |
| <i>Trichoderma</i> sp.    | Verde ligero                | Algodonoso | 2           | Sub-globosa | Agrupadas en 2-3 verticilos |

dos especies registraron conidiación dispersa en un solo anillo (*T. koningii* y *T. asperellum*). Las fiálides presentaron forma globosa en el centro excepto en *T. viride*, *T. koningii* y *T. asperellum*, las cuales mostraron morfología delgada. En la mayoría de las especies las fiálides tendían a agruparse en 2-3 verticilos, excepto *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* que mostraron disposición solitaria. Estas características coinciden con las señaladas en las claves taxonómicas anteriormente mencionadas. En *Trichoderma* sp. aunque presentó morfología colonial típica del género y similitudes microscópicas, algunas características variaron como la forma de los conidios, su disposición y el cuerpo fructífero.

La presencia de estas especies pueden representar posibles biotipos resistentes a factores estresantes. Osorio-Concepción *et al.* (2013), mencionan que la variabilidad de aislados en un lugar, puede ser estimulada por factores de estrés como la luz, falta de nutrientes o cambios en pH. Al-Ani (2018) y Bononi *et al.* (2020), mencionan que el rápido crecimiento de *Trichoderma* spp. y su habilidad para crecer en diferentes sustratos, ha permitido su aislamiento en diversos suelos alrededor del mundo. Sin embargo, aunque este género ha sido estudiado en diversas zonas desérticas (Sharma *et al.*,

factors such as light, a lack of nutrients or changes in pH. Al-Ani (2018) and Bononi *et al.* (2020) mention that the rapid growth of *Trichoderma* spp. and its ability to grow in different substrates has allowed its isolation in diverse soils worldwide. However, although this genus has been studied in diverse barren areas (Sharma *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020), this is the first report of its isolation from a semiarid area in Northwestern Mexico. The identification of *Trichoderma* species by their morphology continues to be an efficient method to identify this fungus (Wu *et al.*, 2017; Asis *et al.*, 2021). The species of *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* and *T. viride* have already been reported as biocontrol agents for phytopathogens in diverse crops (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021; Hewedy *et al.*, 2020; Naeimi *et al.*, 2020; Shamurailatpam and Kumar, 2020; Ayele *et al.*, 2021).

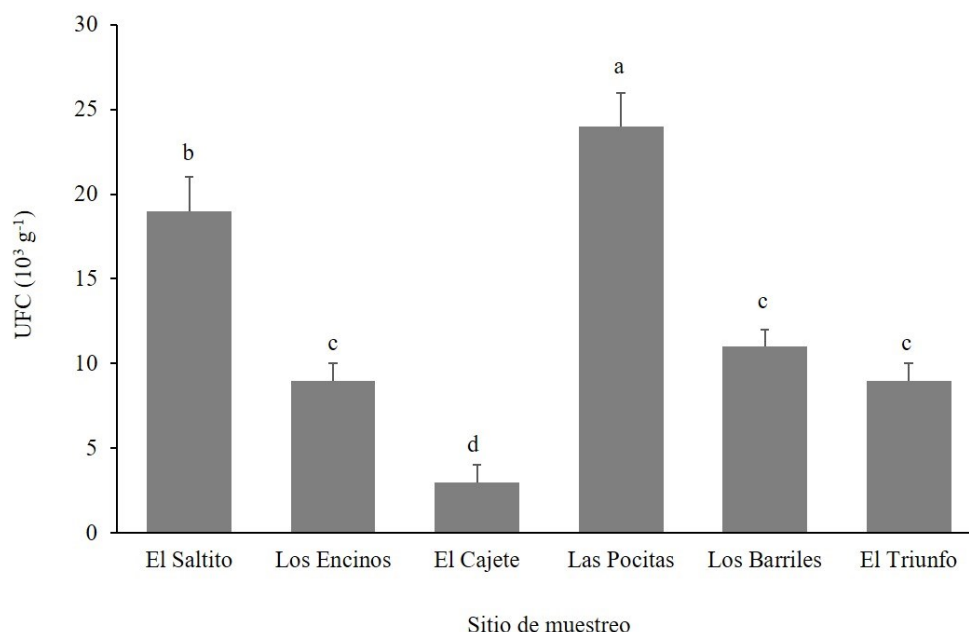
***Trichoderma* spp. abundance and frequency of occurrence.** The abundance of *Trichoderma* spp. was significantly different (Duncan,  $p \leq 0.05$ ) between study sites (Figure 2). Las Pocitas presented the highest abundance of *Trichoderma* spp., whereas the lowest fungal population was

2019; Ma *et al.*, 2020) este es el primer reporte de su aislamiento de una zona semiárida del Noroeste de México. La identificación de especies de *Trichoderma* mediante morfología sigue siendo un método eficiente en la identificación de este hongo (Wu *et al.*, 2017; Asis *et al.*, 2021). Las especies de *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* y *T. viride* ya han sido reportadas como agentes de biocontrol de fitopatógenos en diversos cultivos (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021; Hewedy *et al.*, 2020; Naeimi *et al.*, 2020; Shamu-railatpam y Kumar, 2020; Ayele *et al.*, 2021).

**Abundancia y frecuencia de ocurrencia de *Trichoderma* spp.** La abundancia de *Trichoderma* spp. fue significativamente diferente (Duncan,  $p \leq 0.05$ ) entre los sitios de estudio (Figura 2). Las Pocitas presentó la mayor abundancia de *Trichoderma* spp., mientras que la menor población del

quantified in El Cajete. Regarding the frequency of occurrence of the *Trichoderma* spp. isolations, differences were found between sites under study (Figure 3). In El Saltito, a higher number of *Trichoderma* spp. species (6) were found: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* and *Trichoderma* sp., and in Los Barriles, the lowest figure for occurrence was presented, with only three species: *T. koningii*, *T. atroviride* and *T. asperellum*.

In some geographical sites with greater rainfalls, there is availability of organic matter and host plants, and the abundance of *Trichoderma* is higher (Harman *et al.*, 2004; Garnica-Vergara *et al.*, 2016). In the semiarid areas in which high temperatures prevail almost all year round, a limiting factor is humidity, which affects plants negatively and indirectly reduces the diversity and abundance of microorganisms in the soil (Silva *et al.*, 2020), such



**Figura 2. Abundancia de especies de *Trichoderma* aislados en diferentes sitios semiáridos del Noroeste de México. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.**

**Figure 2. Abundance of *Trichoderma* species in different semiarid sites in the Northwest of Mexico. CFU = Colony Forming Units.**

hongo fue cuantificada en El Cajete. En relación a la frecuencia de ocurrencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp. se encontraron diferencias entre los sitios de estudio (Figura 3). En El Saltillo se presentó el mayor número de *Trichoderma* spp.: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* y *Trichoderma* sp. y en Los Barriles se presentó el nivel más bajo de ocurrencia con solo tres especies: *T. koningii*, *T. atroviride* y *T. asperellum*.

En algunos sitios geográficos donde la precipitación es alta, hay disponibilidad de materia

as bacteria, fungi, actinomycetes, related to plants of agronomic or forestry interest, among others (Long *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Although *Trichoderma* spp. is one of the most abundant fungi in the soil, its occurrence is generally low in desert soils and is related to the scarce presence of plant species and to extreme edaphological conditions. In this regard, Gherbawy *et al.* (2004) identified only two species in soils of the Nile Valley: *T. harzianum* and the anamorphic *Hypocrea orientalis*, a member of the *T. longibrachiatum* genus. Montoya-González *et al.* (2016) point out

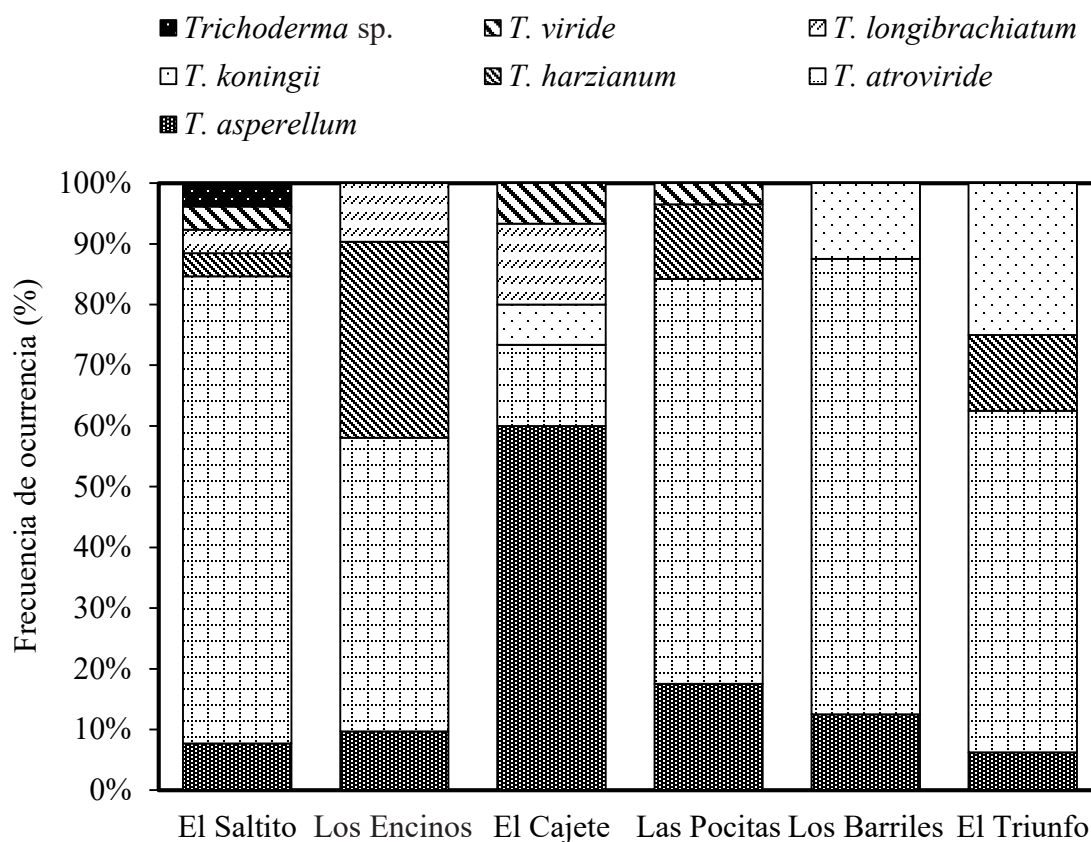


Figura 3. Frecuencia de ocurrencia de especies de *Trichoderma* en diferentes sitios semiáridos pertenecientes al municipio de La Paz, del Noroeste de México.

Figure 3. Frequency of occurrence of *Trichoderma* species in different semi-arid sites belonging to the municipality of La Paz, in the Northwest of Mexico.



orgánica y plantas hospederas, la abundancia de *Trichoderma* es mayor (Harman *et al.*, 2004; Garnica-Vergara *et al.*, 2016). En las zonas semiáridas donde prevalecen las altas temperaturas durante casi todo el año, un factor limitante es la humedad, que afecta negativamente a las plantas e indirectamente disminuye la diversidad y abundancia de los microorganismos del suelo (Silva *et al.*, 2020), como bacterias, hongos, actinomicetos, asociados a plantas de interés agronómico, forestal, entre otras (Long *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Aunque *Trichoderma* spp. es uno de los hongos más abundantes en el suelo, su ocurrencia generalmente es baja en suelos desérticos y está asociada a la escasa presencia de especies vegetales y a condiciones edafoclimáticas extremas, al respecto Gherbawy *et al.* (2004), identificó en suelos del Valle del Nilo solamente dos especies: *T. harzianum* y el anamorrofo *Hypocrea orientalis*, miembro del género *T. longibrachiatum*. Montoya-González *et al.* (2016) señalan que el ambiente seco y la falta de materia orgánica reducen la presencia y diversidad de microorganismos del suelo. Estas características pueden estar relacionadas con la baja población que se presentó en el sitio de El Cajete, por la escasa vegetación y la textura arenosa del suelo, carente de materia orgánica. Aunque se destaca que el número de especies fue mayor al del sitio de Las Pocitas. Estas especies podrían poseer mayor capacidad de producción de compuestos para su adaptación a ambientes extremos.

**Antagonismo *in vitro*.** El porcentaje de inhibición (PI) de diversos hongos fitopatógenos fue significativamente diferente (Duncan,  $p \leq 0.05$ ) entre las especies de *Trichoderma* (Cuadro 2). Esta respuesta puede ser debido a la capacidad diferencial de cada especie en la producción de compuestos, así como la velocidad de reacción ante los distintos factores. Al respecto, Hewedy *et al.* (2020), señalan que la

that the dry environment and the lack of organic matter reduce the presence and diversity of soil microorganisms. These characteristics may be related to the low population found in the site of El Cajete due to the scarce vegetation and the sandy texture of the soil, lacking in organic matter. However, it is worth mentioning that the number of species found was higher than in Las Pocitas. These species may have a greater ability to produce compounds to adapt to extreme environments.

**Antagonism *in vitro*.** The percentage of inhibition (PI) of diverse phytopathogenic fungi was significantly different (Duncan,  $p \leq 0.05$ ) between species of *Trichoderma* (Table 2). This response may be due to the different ability of each species in the production of compounds, as well as the speed of reaction when faced with different factors. Regarding this, Hewedy *et al.* (2020) point out that the difference in the inhibition of pathogens between *Trichoderma* spp. isolations is mostly due to its ability to adapt and grow under different substrates and to its antagonistic ability, mediated by its versatility to exert diverse antagonistic mechanisms. Due to this, its plasticity helps it survive in soils with extreme climates, such as in Northern Mexico. *T. koningii* inhibited all the phytopathogenic fungi (*F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* and *C. gloeosporioides*), surpassing the antagonism exerted by the rest of the microorganisms, including the commercial product Tricho-Sin®. *T. harzianum* caused the least inhibition in phytopathogens (Figure 4). These results coincide with a report by Elshahawy *et al.* (2017), who proved the effectiveness of *T. koningii* in comparison with *T. album*, *T. harzianum*, *T. viride* and *T. virens* in the control of *Sclerotium cepivorum*. Meanwhile, Katyayani *et al.* (2020) evaluated the inhibiting effect of *T. harzianum*, *T. viride* and *T. koningii* on *Fusarium oxysporum*

**Cuadro 2. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la inhibición de hongos asociados a enfermedades bajo condiciones *in vitro*.**  
**Table 2. Effect of *Trichoderma* spp. on the inhibition of phytopathogenic fungi related to diseases under *in vitro* conditions.**

| Especie                   | Porcentaje de Inhibición (%) <sup>y</sup> |                        |                           |                             |                                       |
|---------------------------|-------------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
|                           | <i>Fusarium oxysporum</i>                 | <i>Fusarium solani</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |
| <i>T. asperellum</i>      | 70 b <sup>z</sup>                         | 64 c                   | 56 b                      | 69 b                        | 63 b                                  |
| <i>T. harzianum</i>       | 60 d                                      | 63 c                   | 40 d                      | 56 d                        | 50 d                                  |
| <i>T. koningii</i>        | 75 a                                      | 73 a                   | 62 a                      | 73 a                        | 69 a                                  |
| <i>T. longibrachiatum</i> | 69 b                                      | 68 b                   | 56 b                      | 61 c                        | 62 b                                  |
| <i>T. atroviride</i>      | 63 c                                      | 68 b                   | 55 b                      | 68 b                        | 62 b                                  |
| <i>Trichoderma</i> sp.    | 63 c                                      | 64 c                   | 50 c                      | 68 b                        | 63 b                                  |
| <i>T. viride</i>          | 64 c                                      | 64 c                   | 51 c                      | 69 b                        | 62 b                                  |
| Tricho-Si <sup>n</sup> ®  | 64 c                                      | 54 d                   | 57 b                      | 69 b                        | 56 c                                  |

<sup>y</sup>PI = Porcentaje de inhibición. / <sup>y</sup>PI = Percentage of inhibition

<sup>z</sup>Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Duncan  $p \leq 0.05$ . / <sup>z</sup>Different letters represent significant differences between treatments according to Duncan's test  $p \leq 0.05$ .

diferencia en la inhibición de los fitopatógenos entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. se debe principalmente a su habilidad para adaptarse y crecer bajo diversos sustratos y a su capacidad antagónica mediada por su versatilidad para ejercer diversos mecanismos antagónicos. Por lo anterior, su plasticidad le permite sobrevivir en suelos de climas extremos como del norte de México. *T. koningii* inhibió a todos los hongos fitopatógenos (*F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. gloeosporioides*) superando al antagonismo ejercido por el resto de los microorganismos incluido al producto comercial Tricho-Sin<sup>®</sup>. *T. harzianum* fue el que causó la menor inhibición en los fitopatógenos (Figura 4). Estos resultados coinciden con lo reportado por Elshahawy *et al.* (2017) quienes comprobaron la efectividad de *T. koningii* comparada con *T. album*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. virens* en el control de *Sclerotium cepivorum*. Mientras que Katyayani *et al.* (2020) evaluó el efecto inhibidor de *T. harzianum*, *T. viride* y *T. koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* determinando a *T. koningii* el de mayor eficiencia de inhibición en el crecimiento micelial del patógeno. Esta efectividad

f. sp. *ciceri* and determined *T. koningii* to be the most efficient in inhibiting the mycelial growth of the pathogen. This effectiveness of *T. koningii* may be due to higher efficient mechanisms, not only for the control of pathogens, but also in the tolerance to different types of stress. Regarding this, Nykiel-Szymańska *et al.* (2018) reported that *T. koningii* specifically produces dechlorinated and hydroxyl-type metabolites that provide a higher tolerance to copper, and which may be related to its different action mechanisms.

Cheng *et al.* (2012) reported that the efficiency of most *Trichoderma* species (including *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* and *T. viride*) consists in inhibiting the growth of the hyphae of phytopathogenic fungi by causing cytosolic vacuolization and lysis in the hyphae, whereas Kashyap *et al.* (2020) associates it with the reduction in the sporulation of fungi. Other antagonistic mechanisms exerted by *Trichoderma* spp. in the *in vitro* and *in vivo* inhibition of the phytopathogens is the production of hydrolytic enzymes (chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase) that degrade the cell wall of the fungus (Ruangwong *et*

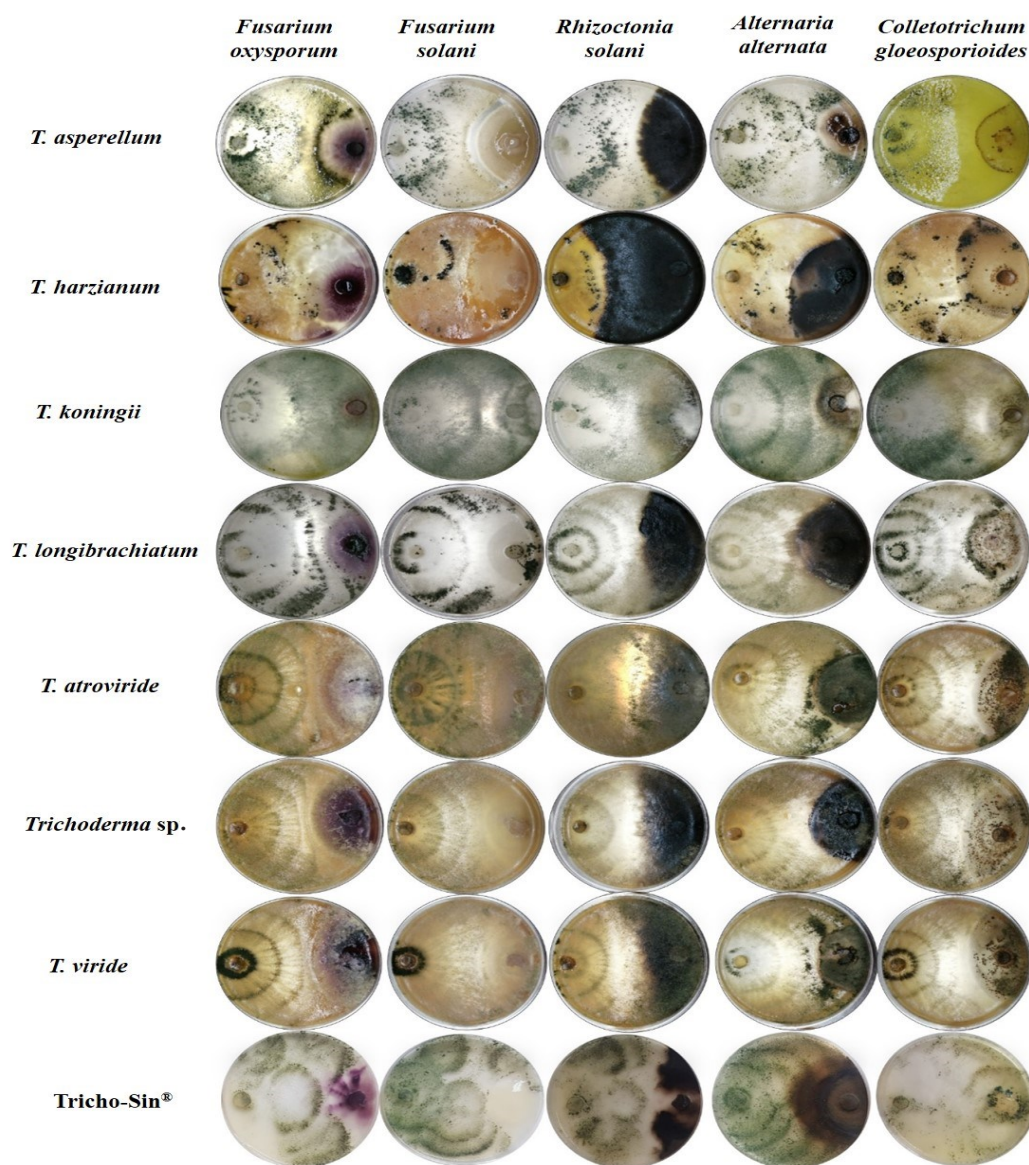


Figura 4. Antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* aisladas de zonas semiáridas contra hongos fitopatógenos.  
Figure 4. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species isolated from semiarid areas against phytopathogenic fungi.

de *T. koningii* puede ser debido a mecanismos mayormente eficientes no solo en el control de patógenos, sino también en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. Al respecto, Nykiel-Szymańska *et al.* (2018) reportaron que *T. koningii* produce específicamente metabolitos de tipo de clorados e hidroxilos

*al.*, 2021), volatile organic compounds (azetidina, 2-fenilethanol and etil hexadecanoato) with antimicrobial activity (Dini *et al.*, 2021), the production of antibiotics (Bae *et al.*, 2016), competition for space and nutrients such as sucrose and glucose (Liu *et al.*, 2021), induction of the

que le proporcionan una alta tolerancia al cobre y los cuales posiblemente pueden estar asociados a sus diferentes mecanismos de acción.

Cheng *et al.* (2012), reportaron que la eficacia de la mayoría de las especies de *Trichoderma* (incluidas *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* y *T. viride*) consiste en inhibir el crecimiento de las hifas de los hongos fitopatógenos al provocar vacuolización citosólica y lisis en las hifas, mientras que Kashyap *et al.* (2020), lo asocia a la reducción de la esporulación de los hongos. Otros mecanismos antagónicos que ejerce *Trichoderma* spp. en la inhibición *in vitro* e *in vivo* de los fitopatógenos es la producción de enzimas hidrolíticas (chitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa) que degradan la pared celular del hongo (Ruangwong *et al.*, 2021), compuestos volátiles orgánicos (azetidina, 2-feniletanol y hexadecanoato de etilo) con actividad antimicrobiana (Dini *et al.*, 2021), producción de antibióticos (Bae *et al.*, 2016), competencia por espacio y nutrientes como la sacarosa y glucosa (Liu *et al.*, 2021), inducción de resistencia sistémica del hospedero (Li *et al.*, 2018), entre otros. Debido a que la supervivencia, el establecimiento y la actividad antagónica de especies de *Trichoderma* en campo son aún inconsistentes, es de vital importancia realizar estudios encaminados en comprender la ecología y la dinámica de las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo para lograr una protección eficiente de los cultivos.

## CONCLUSIONES

Siete especies de *Trichoderma* fueron identificadas: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *Trichoderma* sp. Las Pocitas presentó mayor población y frecuencia de ocurrencia de *Trichoderma* spp., mientras que en El Saltito se observó mayor variabilidad de especies al identificar a *T. harzianum*,

systemic resistance of the host (Li *et al.*, 2018), and others. Due to the survival, the establishment and the antagonistic activities of *Trichoderma* species in the field are still inconsistent, it is crucial to carry out studies aimed at understanding the ecology and the dynamics of the *Trichoderma* populations in the soil to protect the crops in an efficient manner.

## CONCLUSIONS

Seven *Trichoderma* species were identified: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* and *Trichoderma* sp. Las Pocitas presented the largest population and frequency of occurrence of *Trichoderma* spp., and in El Saltito, a greater variability of species was observed, since *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* and *Trichoderma* sp. were identified. In the antagonism, *T. koningii* presented the best inhibition response in the growth of *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* and *C. gloeosporioides*, in comparison with the rest of the species and the *T. harzianum* commercial product Tricho-Sin®. A knowledge of the different species of *Trichoderma* present in the region will be essential for future studies related to the selection of native strains from semiarid areas that can be used in extreme environmental conditions against root pathogens in plants of agricultural interest.

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

T. atroviride, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* y *Trichoderma* sp. En el antagonismo *T. koningii* presentó la mejor respuesta de inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. gloeosporioides*, comparado con

el resto de las especies y el producto comercial de *T. harzianum* Tricho-Sin®. El conocimiento de las diferentes especies de *Trichoderma* presentes en la región, será de gran relevancia para futuros estudios relacionados a la selección de cepas nativas de zonas semiáridas que puedan ser utilizadas en condiciones ambientales extremas contra patógenos de raíz en plantas de interés agrícola.

LITERATURA CITADA

- Alfiky A, and Weisskopf L. 2021. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi* 7(1): 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>.
- Al-Mekhlafi NA, Abdullah QY, Al-Helali MF and Alghalibi SM. 2019. Antagonistic potential of native *Trichoderma* species against tomato fungal pathogens in Yemen. *International Journal of Molecular Microbiology* 2(1): 1-10. <https://psmpublishers.org/issues/antagonistic-potential-of-native-trichoderma-species-against-tomato-fungal-pathogens-in-yemen/>.
- Al-Ani LKT. 2018. *Trichoderma* from extreme environments: Physiology, diversity, and antagonistic activity. In *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* 8: 389-403. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_14.
- Asis A, Shahriar SA, Naher L, Saallah S, Fatimah HNN, Kumar V and Siddiquee S. 2021. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports* 48: 3285-3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>.
- Ayele TM, Gebremariam GD and Patharajan S. 2021. Isolation, identification and *in vitro* test for the biocontrol potential of *Trichoderma viride* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *The Open Agriculture Journal* 15: 10-20. <https://doi.org/10.2174/1874331502115010010>.
- Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, Hong S-B, Seo H, Bae D-W, Bae I, Kim J-J and Bae H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control* 92: 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Barnett H and Hunter B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. EE. UU. Burgess Publ. Co. 241p.
- Bissett JW, Gams W and Jaklitsch GJ. 2015. *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6: 263-295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>.
- Bononi L, Chiamonte JB, Pansa CC, Moitinho MA and Melo IS. 2020. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports* 10: 2858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>.
- Brito RAS, Cavalcante GP, Stock VM, Colman AA, dos Santos DP, Sermarini RA and Maffia LA. 2020. *Trichoderma* species show biocontrol potential against *Ceratocystis* wilt in mango plants. *European Journal of Plant Pathology* 158(3): 781-788. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02095-6>.
- Camacho-Aguñiga DG, Hernández-Montiel LG, López-Aburto MG y Romero-Bastidas M. 2016. Identificación y caracterización del agente causal de la marchitez en esparago en Baja California Sur. Memoria de congreso. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología 34 (Suplemento): S49. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/Suplemento342016.html>
- Carrillo P, Woo SL, Comite E, El-Nakhel C, Rouphael Y, Fusco GM, Borzacchiello A, Lanzuise S and Vinale F. 2020. Application of *Trichoderma harzianum*, 6-pentyl- α -pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes. *Plants* 9(6): 771. <https://doi.org/10.3390/plants9060771>.
- Cheng CH, Yang CA and Peng KC. 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology* 102(11): 1054-1063. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-11-0315>.
- Dini I, Marra R, Cavallo P, Pironti A, Sepe I, Troisi J, Scala G, Lombardi P and Vinale F. 2021. *Trichoderma* strains and metabolites selectively increase the production of volatile organic compounds (VOCs) in olive trees. *Metabolites* 11(4): 213. <https://doi.org/10.3390/metabo11040213>.
- Elnashar A, Abbas M, Sobhy H and Shahba M. 2021. Crop water requirements and suitability assessment in arid environments: A new approach. *Agronomy* 11(2): 260. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020260>.
- Elshahawy IE, Saied N, Abd-El-Kareem F and Morsy A. 2017. Biocontrol of onion white rot by application of *Trichoderma* species formulated on wheat bran powder. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 50(3-4): 150-166. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1276423>.
- Gal-Hemed I, Atanasova L, Komon-Zelazowska M, Druzhinina I, S, Viterbo and Yarden O. 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5100-5109. doi:10.1128/AEM.00541-11.
- Gamarrá MAF, Ojeda MM and Maldonado GAE. 2017. Identificación molecular y tasa de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la Región Norte del Paraguay. *Investigación Agraria* 19(2): 127-132. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2017.diciembre.127-132>.
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-González J, Méndez-Bravo A and Macías-Rodríguez L. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytologist* 209 (4): 1496-1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>.
- Gherbawy Y, Druzhinina I, Shaban GM, Wuczkowsky M, Yasser M, El-naghy MA, Prillinger HJ, and Kubicek CP. 2004. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycological Progress* 3(3): 211-218. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0091-y>.
- Harman GA, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant

- symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Harman G, Obregon M, Samuels G and Lorito M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developed and developing world. *Plant Disease* 94: 928-939. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0928>.
- Hewedy OA, Abdel LKS, Seleiman MF, Shami A, Albarakaty FM and M El-Meihy R. 2020. Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology* 9(8): 189. <https://doi.org/10.3390/biology9080189>.
- Katyayani KKS, Bindal S, Prakash Singh J, Rana M and Srivastava S. 2020. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against chickpea wilt. *International Archive of Applied Sciences and Technology* 11(3): 1-4. <https://doi.org/10.15515/iaast.0976-4828.11.3.14>
- Karthikeyan BC, Jaleel A., Lakshmanan GA and Deiveekasundaram M. 2008. Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62 (1): 143-45. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.004>.
- Kashyap PL, Solanki MK, Kushwaha P, Kumar S and Srivastava AK. 2020. Biocontrol potential of salt-tolerant *Trichoderma* and *Hypocrea* isolates for the management of tomato root rot under saline environment. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 20(1): 160-176. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00114-y>.
- Kim K, Heo YM, Jang S, Lee H, Kwon SL, Park MS, Lim YW and Kim JJ. 2020. Diversity of *Trichoderma* spp. in marine environments and their biological potential for sustainable industrial applications. *Sustainability* 12, 4327: 1-12. <https://doi.org/10.3390/su12104327>.
- Li N, Alfiky A, Wang W, Islam M, Nourollahi K, Liu X and Kang S. 2018. Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>.
- Liu CM, Liu SY, Liao CK, Lo CT, Lin KC and Peng KC. 2021. Cabbage defense response provoked by *Trichoderma* Th-LAAO. *Archives of Microbiology* 203(4): 1641-1647. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02174-6>.
- Long Y, Yang X, Cao Y, Lv G, Li Y, Pan Y and Liu Y. 2021. Relationship between soil fungi and seedling density in the vicinity of adult conspecifics in an arid desert forest. *Forests* 12(1): 92. <https://doi.org/10.3390/f12010092>.
- Ma J, Tsegaye E, Li M, Wu B and Jiang X. 2020. Biodiversity of *Trichoderma* from grassland and forest ecosystems in Northern Xinjiang, China. *3 Biotech* 10(8): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02301-6>.
- Michaud JP. 2018. Challenges to conservation biological control on the high plains: 150 years of evolutionary rescue. *Biological Control* 125: 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.001>.
- Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA and Fernández-Pavía SP. 2021. Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(2): 228-247. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>
- Muniappan V, and Muthukumar TV. 2014. Influence of crop species and edaphic factors on the distribution and abundance of *Trichoderma* in Alfisol soils of southern India. *Acta Botánica Croatica* 73(1): 37-50. <https://doi.org/10.2478/botcro-2013-0004>.
- Montoya-González AH, Quijano-Vicente G, Morales-Maza A, Ortiz-Urbe N, Hernández-Martínez R. 2016. Isolation of *Trichoderma* spp. from desert soil, biocontrol potential evaluation and liquid culture production of conidia using agricultural fertilizers. *Journal of Fertilizers and Pesticides* 7: 163. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000163>.
- Nacimi S, Khosravi V, Varga A, Vágvölgyi C and Kredics L. 2020. Screening of organic substrates for solid-state fermentation, viability and bioefficacy of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biocontrol strain against rice sheath blight disease. *Agronomy* 10(9): 1258. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091258>.
- Nykiel-Szymańska J, Bernat P and Ślaba M. 2018. Potential of *Trichoderma koningii* to eliminatealachlor in the presence of copper ions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162(30):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.060>.
- Nuangmek W, Aiduang W, Kumla J, Lumyong S and Suwanarath N. 2021. Evaluation of a newly identified endophytic fungus, *Trichoderma phayaense* for plant growth promotion and biological control of gummy stem blight and wilt of muskmelon. *Frontiers in Microbiology* 12: 410. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.634772>.
- Núñez-Madera CA, Hernández-Montiel LG, López-Aburto MG y Romero-Bastidas M. 2016. Identificación morfológica del agente causal de la marchitez en garbanzo (*Cicer arietinum*) en Baja California Sur. *Memoria de congreso. Revista Mexicana de Fitopatología* 34(suplemento): S49 <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/Suplemento342016.html>
- Osorio-Concepción MFS, Casas PC, Cortés 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-40.
- Otadoh JA, Okoth SA, Ochanda J and Kahindi JP. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* F. sp. *phaseoli*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13(1): 99 – 107. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v13n1/v13n1a15.pdf>
- Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycology Papers* 116: 1-56. <https://doi.org/10.1139/b91-298>.
- Rodríguez-Macías KM, Hernández-Montiel LG, López-Aburto MG y Romero-Bastidas M, Chiquito-Contreras R. 2016. Aislamiento e identificación del agente causal de la mancha foliar en albahaca (*Ocimum basilicum*) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (suplemento): S50. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/Suplemento342016.html>
- Ruangwong OU, Pornsuriya C, Pitija K and Sunpapao A. 2021. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper. *Journal of Fungi* 7(4): 276. <https://doi.org/10.3390/jof7040276>.

- Siddiquee S. 2017. Practical handbook of the biology and molecular diversity of *Trichoderma* species from tropical regions. Springer International Publishing. P. 17. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7>.
- Shamurailatpam D and Kumar A. 2020. Selected fungicides and biocontrol agents for managing early blight of tomato caused by *Alternaria solani*. Indian Journal of Plant Protection 48(4): 474-481.
- Silva JBT, Marques E, Menezes JE, Silva JP and Mello SCM. 2020. Population density of *Trichoderma* fungi in natural environments and agrosystems of a Cerrado area. Biota Neotropica 20(4): 1-9. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1048>.
- Singh SK and Jadon KS. 2019. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* against fungal pathogens of cumin, groundnut and castor. Indian Phytopathology 72(3): 537-543. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00156-3>.
- Sharma S, Kour D, Rana KL, Dhiman A, Thakur S, Thakur P, Thakur S, Thakur N, Sudheer S, Yadav N, Yadav AN, Rastegari AA and Singh K. 2019. *Trichoderma*: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In: Yadav AN, Mishra S, Singh S and Gupta A (eds). Recent advancement in white biotechnology through fungi. Springer 85-120. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_3.
- Su D, Ding L, He S. 2018. Marine-derived *Trichoderma* species as a promising source of bioactive secondary metabolites. Mini-Rev. Medicinal Chemistry 18(20):1702-1713. <https://doi.org/10.2174/1389557518666180727130826>
- Tegegne S, Dejene M, Terefe H, Tegegn G, Tena E and Ayalew A. 2021. Evaluation of native *Trichoderma* isolates for the management of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in sugar plantations of Ethiopia. Cogent Food and Agriculture 7(1): 1872853. <https://doi.org/10.1080/23311932.2021.1872853>.
- Torres-De la Cruz M, Ortiz-García CF, Bautista-Muñoz C, Ramírez-Pool JA, Ávalos-Contreras N and Cappello-García S. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86: 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>.
- Wang C and Zhuang WY. 2020. Carbon metabolic profiling of *Trichoderma* strains provides insight into potential ecological niches. Mycologia 112(2): 213-223. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698246>.
- Wu Q, Sun R, Ni M, Yu J, Li Y, Yu C, Dou K, Ren J and Chen J. 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. Plos One 12(6): e0179957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179957>.
- Yang H, Chen Y and Zhang F. 2019. Evaluation of comprehensive improvement for mild and moderate soil salinization in arid zone. Plos One 14(11): e0224790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224790>.
- Yang X, Long Y, Sarkar B, Li Y, Lü G, Ali A and Cao YE. 2021. Influence of soil microorganisms and physicochemical properties on plant diversity in an arid desert of Western China. Journal of Forestry Research 1-15. [https://doi.org/10.1094/MPMI-03-20-0076-A](https://doi.org/10.1007/s11676-021-01292-Zhou Y, Wang Y, Chen K, Wu Y, Hu J, Wei Y, Li J, Yang H, Ryder M and Denton MD. 2020. Near-complete genomes of two <i>Trichoderma</i> species: A resource for biological control of plant pathogens. Molecular Plant Microbe Interactions 33(8): 1036-1039. <a href=).

Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease

Sistemas de vigilancia epidemiológicos para interfaz web y aplicaciones en roya del cafeto

Gustavo Mora-Aguilera*, ^{1,2,3}Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Gerardo Acevedo-Sánchez, Eduardo Guzmán-Hernández, Oscar Eder Flores-Colorado, Juan José Coria-Contreras, Coral Mendoza-Ramos, Verónica Inés Martínez-Bustamante, ²Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF); Abel López-Buenfil ³Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; Rigoberto González-Gómez, Miguel Ángel Javier-López, DGSV-SENASICA km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Calle Centenario, Tecámac, Estado de México C.P. 55740. *Autor para correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: 30 de Abril, 2021.

Aceptado: 10 de Agosto, 2021.

Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, López-Buenfil A, González-Gómez R and Javier-López MA. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 452-492.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2021.

First DOI publication: Agosto 31, 2021.

Resumen. El avance de la tecnología digital ha permitido concebir Sistemas de Vigilancia Epidemiológicos (SVE) automatizados con un enfoque *holístico-sistémico* favoreciendo la planeación, operación, gestión y procesamiento de datos fitosanitarios de manera efectiva y oportuna para toma de decisiones en la prevención y manejo regional

Abstract. The advancement of digital technology has made it possible to conceive automated Epidemiological Surveillance Systems (ESS) with a *holistic-systemic* approach allowing effective operation, management, and processing of phytosanitary data for fast decision-making applied to regional prevention and pest management. This surveillance type focuses on plant health, overcoming the reductionist pest vision of the conventional normative surveillance. An ESS implies the precise definition of the regional framework, objectives, pest(s) in wide-sense, human/financial resources, regulatory context, support research planning, operational structure, and innovation models. These elements determine the precision, frequency, and type of sampling and monitoring and the selection of variables related to a novel *epidemiological system*. In contrast to the normative surveillance, a systemic ESS has descriptive and risk forecasting

de plagas. Este tipo de sistemas se enfocan en la salud del cultivo superando la visión reduccionista de plaga en la vigilancia normativa convencional. Un SVE web implica la definición clara del marco regional, objetivos, plaga(s) en su amplia acepción, recursos humanos/financieros, contexto normativo, líneas de investigación de soporte, estructura operativa y modelos de innovación. Estos elementos determinan la precisión, frecuencia y tipo de muestreo y monitoreo, así como las variables de medición relativas a un novel *sistema epidemiológico*. A diferencia de la vigilancia normativa, un SVE web *holístico-sistémico* tiene capacidad descriptiva y de pronóstico de riesgos, incluyendo alertas tempranas a partir de análisis espaciales y temporales. La interfaz web SVE asegura la generación flexible y dinámica de reportes y/o análisis automatizados. Un SVE operado en plataformas web, con énfasis en lenguajes de programación y herramientas de uso libre puede ser alojado en servidores genéricos o dedicados para almacenamiento de metadatos configurados con tecnologías Linux/Apache y funcionalidad 24/7 (h día⁻¹). Programas de uso libre incluyen MySQL/MariaDB y otros como gestores de bases de datos; PHP / Node.js, y JavaScript, Ajax, HTML5 y CSS, como tecnologías web de maquetado base ‘back-end’ y ‘front-end’, respectivamente. Esta revisión se enfoca en principios, atributos conceptuales, enfoques metodológicos generales y objetivos de SVE base web. Aplicaciones generales se ilustran con un SVE desarrollado en México para el café (*Coffea* spp.), el cual permitió operar la vigilancia de 19 plagas, nueve con estatus cuarentenario, mediante la generación, gestión y análisis de 87.4 y 15.7 millones de registros climáticos y epidemiológicos, respectivamente, obtenidos entre 2013-2019.

Palabras clave: *Hemileia vastatrix*, *Coffea arabica*, Alerta temprana, Prevención.

capabilities, including early warnings, based on spatial and temporal analyses. A web-based ESS assures a flexible-dynamic generation of reports and automated analysis. An ESS operated on web platforms, emphasizing open source software and tools, can be hosted on generic or dedicated servers for metadata storage configured with Linux / Apache technologies with 24/7 (h day⁻¹) functional capabilities. Open source tools include MySQL / MariaDB and other systems as database managers; PHP / Node.js, and JavaScript, Ajax, HTML5 and CSS as web design base ‘back-end’ and ‘front-end’ programs, respectively. This review focuses on principles, conceptual attributes, general methodological approaches, and objectives of web-based ESS. An overview is presented with an ESS developed in Mexico for coffee plantations (*Coffea* spp.), which allowed the surveillance of 19 pests, nine under quarantine status, through the generation, management, and analysis of 87.4 million climatic data and 15.7 million epidemiological records over 2013-2019.

Key words: *Hemileia vastatrix*, *Coffea arabica*, Early warning, Prevention.

The concept and scope of epidemiological surveillance

Epidemiological surveillance (ES) embraces a phytosanitary concept referred to planned actions that aim to prevent and mitigate the effect of epidemics by restricting the entry, establishment, and/or population density increase of a pest(s) in an area of exclusion or endemicity, to avoid or reduce continued productive impacts that compromise the sustainability and resilience of a crop (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). This definition has three implications: 1) ES’s ruling principles are protection and prevention, the

El concepto y ámbito de vigilancia epidemiológica

La *vigilancia epidemiológica* (VE) es una acción fitosanitaria planeada que tiene como objetivo la prevención y mitigación del efecto de epidemias mediante la restricción del ingreso, establecimiento y/o incremento poblacional de una plaga(s) en un área de exclusión o endemidad, con el fin de evitar o reducir impactos productivos sostenidos que comprometan la sustentabilidad y resiliencia de un cultivo (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). Esta definición tiene tres implicaciones: 1) La VE tiene como principios la *prevención*, constituida a su vez por estrategias secuenciales de *exclusión* y *erradicación*, y la *protección*. Esto implica que la VE es aplicable tanto a organismos de interés cuarentenario como de importancia económica prevalentes; 2) La VE tiene como propósito el monitoreo de riesgos epidémicos. En consecuencia, un *nuevo sistema epidemiológico* es su marco racional obligado (Figura 1). Trasciende la reducida concepción de '*Vigilancia*', definida en la Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias 5 (NIMF 5), publicada por la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), adscrita a la FAO (<https://www.ippc.int/es/>), como: '*Un proceso oficial para recopilar y registrar información sobre la presencia o ausencia de una plaga mediante el uso de encuestas, monitoreo u otros procedimientos*', la cual implica una estrategia limitada a monitorear un organismo-plaga fuera de su contexto epidémico; 3) La VE puede incorporar cualquier atributo biótico y/o abiótico (p.e., nutrición y aeropoluentes) pertinente a la salud de una población de plantas, es decir, el cultivo (Mora-Aguilera *et al.*, 2016a). Adicionalmente, la plaga en su amplia acepción (patógenos, insectos, malezas, etc.) es la unidad biológica poblacional de interés (Mora-Aguilera *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d), liberándolo-

latter constituted in turn by sequential strategies of exclusion and eradication. This implies that ES applies to both organisms of quarantine interest and those regionally prevalent of economic importance; 2) The purpose of ES is to monitor epidemic risks. Consequently, a novel epidemiological system is its compelling rational framework (Figure 1). It transcends the narrow concept of 'Surveillance', defined in the International Standards for Phytosanitary Measures 5 (ISPM 5), published by the International Plant Protection Convention (IPPC), bounded to FAO (<https://www.ippc.int/es/>). This is defined as: '*An official process to collect and record information on the presence or absence of a pest through the use of surveys, monitoring or other procedures*', which implies a strategy limited to monitoring a pest-organism outside of its epidemic context; 3). ES can incorporate any biotic and/or abiotic attribute (e.g., nutrition and air pollutants) relevant to the health of a plant population, that is, the crop (Mora-Aguilera *et al.*, 2016a). Additionally, the pest in its broad sense (pathogens, insects, weeds, etc.) is the population biological unit of interest (Mora-Aguilera *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d), freeing itself from the infection principle typical of classical epidemiology and still deep-rooted on conventional surveillance (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017). Eventually, ES transcends the population to incorporate the community as a comprehensive analytical, biological base (Mora-Aguilera *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). This approach represents a paradigm shift in classical epidemiology. Other meanings of ES, in general, restrict the biological scope to a taxonomically related pest(s) (Kaundal *et al.*, 2006). The rational epidemiological framework is not explicit, it is omitted in the strategy (Firanj Sremac *et al.*, 2018), or its scope is limited to reporting the presence and absence of a pest (ES type 1) or stratified by levels

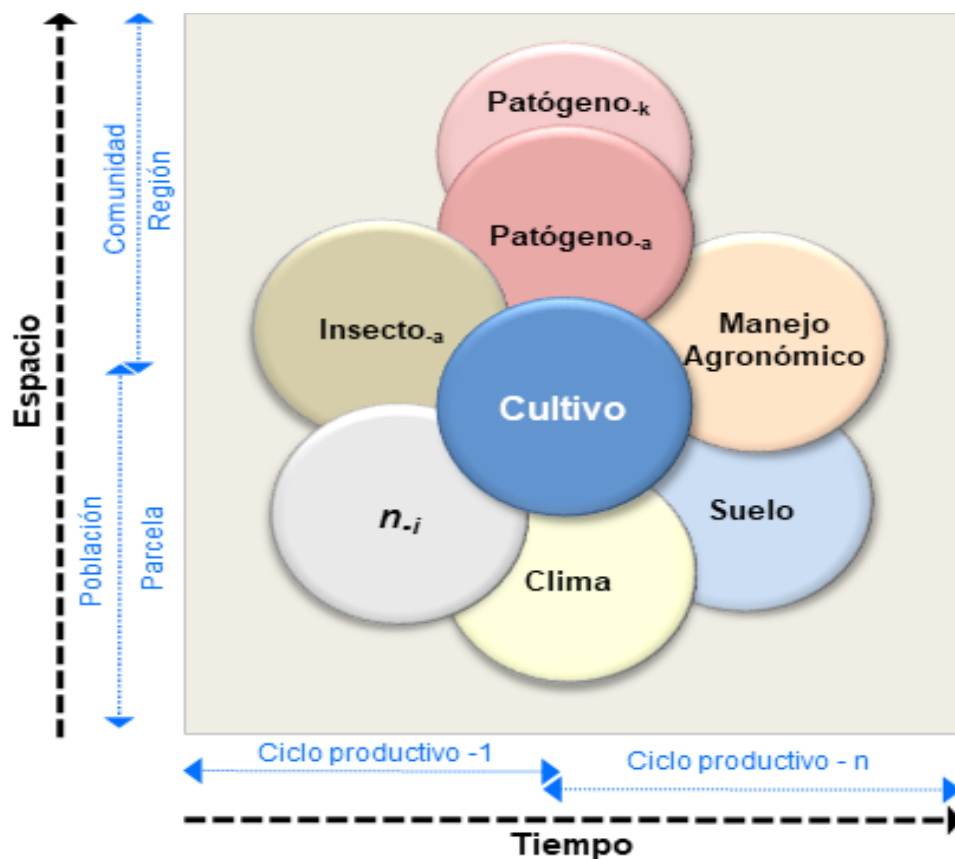


Figura 1. Nueva propuesta de *sistema epidemiológico*, en el cual la planta es el centro del sistema y subordina el resto de subsistemas a diferentes escalas de *tiempo* y *espacio*. El *sistema epidemiológico* es flexible para incluir *n*-subsistemas (p.e., vector) y permite la aplicación *holística-sistémica* de los principios de *prevención* y *protección* del manejo de plagas. Este sistema sustituye el restrictivo triángulo y tetraedro epidemiológico. El *sistema epidemiológico* es intrínsecamente *sistémico* y su implementación en *vigilancia epidemiológica* conduce al enfoque *holístico* con la inclusión dinámica e interactiva de *n*-plagas (patógenos, insectos, ácaros, etc.) evaluadas en su macro y microambientes regional-parcelario (Figura 4 y 6), transitando del enfoque de *población* de la epidemiología clásica al de *comunidad*.

Figure 1. Novel *epidemiology system* in which the *plant* subordinates the remaining subsystems at different *time* and *space* scales. The proposed system is flexible to include *n*-subsistemas (e.g., vector) and allows the *holistic-systemic* application of the pest management *prevention* and *protection* principles. This system replaces the restricted *epidemiological triangle* and *tetrahedron*. The *epidemiology system* is intrinsically *systemic* and its implementation lead towards a *holistic* approach with the dynamic and interactive inclusion of *n*-pests (pathogens, insects, mites, etc.) assessed in their macro and micro-environment niche (Figure 4 and 6), transiting from the *population* of classical epidemiology to the *community*.

se del principio de infección, propio de la epidemiología clásica, fuertemente adoptado por la vigilancia convencional (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017). Eventualmente, se supera la *población* para incorporar la *comunidad* como base biológica analítica integral (Mora-Aguilera *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). Este enfoque representa un cambio de paradigma en la epidemiología clásica.

Otras acepciones de la VE, en general restringen el ámbito biológico a una plaga(s) taxonómicamente relacionada(s) (Kaundal *et al.*, 2006), el marco epidemiológico racional no es explícito o se omite en la estrategia (Firanj Sremac *et al.*, 2018), y su alcance se limita al reporte presencia/ausencia de una plaga (VE tipo 1) o estratifica por niveles de detección (VE tipo 2) (Cuadro 1) (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017).

of detection (ES type 2) (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017) (Table 1).

Recent experiences have shown that ES type 3, to which the proposed definition adheres, involves a complex and dynamic implementation of technical-scientific, operational, and digital innovation strategies (Kaundal *et al.*, 2006). Under this approach, its systemic application at time and space scales that guarantee the solution of a phytosanitary problem lead to the development of *Epidemiological Surveillance Systems* (ESS), which often are referred to as *Epidemiological Surveillance Programs* in the context of public policies. The system approach is natural because its conception and operation are based on the *epidemiological system* in its modern, flexible structure and dynamic n_i -subsystems, the plant population as an integrative *subsystem*, and

Cuadro 1. Tipos de vigilancia epidemiológica (VE) fitosanitaria propuestos en función de su objetivo, enfoque metodológico y principio fitosanitario enfatizado ejemplificados con algunos Programas de VE.

Table 1. Types of phytosanitary epidemiological surveillance (EV) proposed according to their objective, methodological approach and emphasized phytosanitary principle, exemplified with some EV Programs.

| Tipo VE | Objetivo / Metodología | Principio Fitosanitario | ² Ejemplos de Programas de VE operados en un entorno web |
|---------------|--|---|---|
| Tipo 1 | Estatus de plaga: Área libre
Área de Baja prevalencia

/ Análisis cualitativo con adherencia a NIMF 6 y 8 | Exclusión | <ul style="list-style-type: none"> • DGSV/CNRF, https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF • EPPO, https://gd.eppo.int/ • NAPPO, https://www.pestalerts.org • OIRSA, https://geoportal.oirsa.org/ |
| Tipo 2 | Delimitación y contención regional

/ Análisis cuantitativo descriptivo | Exclusión

Erradicación | <ul style="list-style-type: none"> • DGSV/CNRF/SIRVEF https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF • SIMDIA http://www.siafeson.com/simdia |
| Tipo 3 | Estatus de plaga, Delimitación regional, Riesgos epidémicos, Alertas y criterios de accionabilidad
Dispositivos de emergencia
Campaña fitosanitaria

/ Análisis cuantitativo descriptivo e inferencial | Exclusión

Erradicación

Protección | <ul style="list-style-type: none"> • ANACAFE https://www.anacafe.org/Servicios/Cedicafe • FUNDECITRUS https://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitosanitario • Fundación ABC https://fundacaoabc.org/ • PVEF-Cafeto https://www.lanref.royacafe.org.mx • SIVEA-Agave https://www.sivea.org.mx |

²Los hipervínculos de algunos programas de VE podrían no ser funcionales o públicos en concordancia con políticas operativas de la institución respectiva. / ²Links of some ES Programs cannot be fully functional or allow public access according to institutional operative policies.

Experiencias recientes han mostrado que la VE tipo 3, a la cual se adhiere la definición propuesta, implica una implementación compleja y dinámica de estrategias técnico-científicas, operativas y de innovación digital (Kaundal *et al.*, 2006). Bajo este enfoque, su aplicación sistémica a escalas de tiempo y espacio que garanticen la solución de un problema fitosanitario conducen al desarrollo de *Sistemas de Vigilancia Epidemiológica* (SVE), los cuales pueden ser referidos como *Programas de Vigilancia Epidemiológicos* en un contexto de política pública. En realidad, el enfoque de sistemas es natural porque su concepción y operación tiene como base el *sistema epidemiológico* en su moderna acepción abierta con n_i -subsistemas dinámicos, la población de plantas como subsistema integrador y el tiempo-región como dimensiones reguladoras de *entradas* (p.e., plaga(s), variedades) y *salidas* (p.e., carga inóculo, producción del cultivo) (Figura 1).

Un SVE tiene escalabilidad espacial variable. Sin embargo, a nivel regional se optimiza su propósito fitosanitario (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera, 2016; Mora-Aguilera *et al.*, 2014e). Una región, en este contexto, es un área constituida por un conjunto de n -unidades productivas entre las que se establecen relaciones funcionales de interdependencia, directa o indirecta, por el uso común de recursos agroambientales, económicos y humanos, así como servicios, infraestructura y política pública específica (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Coria-Contreras *et al.*, 2015a,b; Mendoza-Ramos *et al.*, 2015a). Evidencias de algunos programas regionales fitosanitarios exitosos han demostrado que el manejo enfocado al cultivo puede coadyuvar a desarrollar estrategias de sustentabilidad y resiliencia productiva (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d), los cuales no son factibles biológica, ambiental y técnicamente a nivel de unidades de producción o parcelas

time-region as *input* (e.g., pest(s), varieties) and *outputs* controlling dimensions (e.g., inoculum load, crop production) (Figure 1).

ESS has variable spatial scalability. However, its phytosanitary purpose is optimized at a regional level (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera, 2016; Mora Aguilera *et al.*, 2014e). A region, in this context, is an area made up of a set of n -productive units among which functional relationships of interdependence are established, direct or indirect, through routinely everyday use of agro-environmental, economic and human resources, as well as specific services, infrastructure, and policies (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Coria-Contreras *et al.*, 2015a, b; Mendoza-Ramos *et al.*, 2015a).

Evidence from some successful regional phytosanitary programs has shown that crop-focused management can help develop strategies for sustainability and productive resilience (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d), which are not biologically, environmentally, and technically feasible at the unit production level (field plot) or independent fields. In general, the field-plot vision of surveillance and other planned phytosanitary management practices, e.g., fungicides scheduled, is the reason for undesirable effects on productive assets: plant genetic erosion, loss of varietal resistance, development of resistance to limited mechanisms of action of pesticides, food safety problems, contamination of water and soil resources, etc. (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c).

Surveillance in classical epidemiology

In classical epidemiology, *sensu* Vanderplank, *surveillance* has its antecedents in *forecasting models* and *early warnings* applied at the level of farm production units to support phytopathogen

independientes. En general, la visión parcelaria de la vigilancia y otras prácticas de manejo fitosanitario planeadas, p.e., calendarización de fungicidas, es la razón de efectos indeseables en los activos productivos: erosión génica, pérdida de resistencia varietal, desarrollo de resistencia a limitados mecanismos de acción de pesticidas, problemas de inocuidad, contaminación de recursos hídricos y edáficos, etc. (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c).

La vigilancia en la epidemiología clásica

En la epidemiología clásica, *sensu* Vanderplank, la *vigilancia* tiene sus antecedentes en *modelos de pronóstico y alertas tempranas* aplicadas a nivel de unidades productivas parcelarias con el propósito de sustentar estrategias de control de fitopatógenos bajo el principio de *protección*. Notoriamente, la *prevención* estuvo ausente en estos seminales enfoques analíticos. Artículos de revisión exhaustivos permiten claramente delinear la evolución conceptual y aplicativa de modelos de pronóstico. Por ejemplo, Krause y colaboradores (1975), resaltaron la importancia mecanística de la biología de patógenos mediante el uso de variables asociadas al proceso patogénico, p.e., periodo de incubación (ver sección de algoritmos, Figura 5); Coakley y colaboradores (1985), y posteriormente Huber y Gillespie (1992), enfatizaron el empleo de sensores microclimáticos para generar variables climáticas predictoras. De Wolf e Isard (2007), sintetizaron los avances del modelaje cuantitativo y las perspectivas de la tecnología digital concluyendo que: ‘*efforts appear to be greater than just a few decades ago, and include novel applications of Bayesian decision theory. Advances in information technology have stimulated innovations in model application*’.

La *alerta temprana*, menos popular que el *pronóstico* en epidemiología clásica en realidad representó una variante conceptual, más que analítica, al

control strategies under the *protection* principle. Notoriously, *prevention* was absent from these seminal analytical approaches. Comprehensive review articles allow the conceptual and applicative evolution of forecasting models to be outlined. For example, Krause and collaborators (1975) highlighted the mechanistic importance of pathogen biology by using variables associated with the pathogenic process, e.g., the incubation period (see the algorithms section, Figure 5). Coakley and collaborators (1985), and further Huber and Gillespie (1992), emphasized using microclimatic sensors to generate predictive climatic variables. De Wolf and Isard (2007) analyzed the advances of quantitative modeling and the perspectives of digital technology, concluding that: ‘*efforts appear to be greater than just a few decades ago, and include novel applications of Bayesian decision theory. Advances in information technology have stimulated innovations in model application*’.

Early warning, less popular than *forecasting*, actually represented a conceptual variant rather than an analytical one. Its purpose was to generate a predictor as ‘early’ as possible in an epidemic progression induced by a specific phytopathogen. This predictor(s), generally climatic, is used as a criterion of actionability for control strategies with protective purposes. At present, an *early warning* has been mistakenly conceived as a synonym for ES, calling them *Early Warning Systems*, among others terms. Its greatest restrictiveness is its non-systemic condition. However, its analytical structure and its strong emphasis on climate variables have favored its digitized implementation by companies that market automated climate equipment for field-plot use in specific crops (<https://www.ambientweather.com/dadi6571.html>). Given the eventual adoption by a broad productive sector, its scope may be regional. However, its particular application to the end-user limits a comprehensive phytosanitary regional integration.

tener como propósito la generación de un predictor lo más ‘temprano’ posible en una progresión epidémica inducida por un fitopatógeno específico. Este predictor(es), generalmente climático, se emplea como criterio de accionabilidad para estrategias de control con un fin protectorio. En la actualidad, la *alerta temprana* se ha concebido erróneamente como sinónimo de VE denominándoseles *Sistemas de Alerta Temprana*, entre otros. Su mayor restrictividad es su condición no sistémica. Sin embargo, su estructura analítica y su fuerte énfasis en variables climáticas han favorecido su implementación digitalizada por empresas que comercializan equipos climáticos automatizados para uso parcelario en cultivos específicos (<https://www.ambientweather.com/dadi6571.html>). Ante la eventual adopción por un amplio sector productivo, su alcance puede ser regional. No obstante, su aplicación particularizada al usuario final limita la integración sistémica fitosanitaria.

Dos sistemas clásicos de *pronóstico*, los cuales inspiraron la adaptación o derivación de otros sistemas, ilustran como los sistemas web han permitido escalar y automatizar los modelos de vigilancia. En los 70’s, BLITECAST y FAST (del cual derivó posteriormente TOMCAST), fueron sistemas de pronóstico computarizados pioneros, los cuales generaron criterios de accionabilidad con base en *modelos empíricos determinísticos* combinando matrices de decisión con temperatura, precipitación, humedad relativa y mojado foliar para decidir la primera y subsecuentes aplicaciones de fungicidas para control de *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* (Madden *et al.*, 1978; Krause *et al.*, 1975). Estos modelos se desarrollaron en FORTRAN IV operados en computadoras tipo ‘mainframe’ IBM 370/168. El cálculo de parámetros con estos modelos requería el ingreso manual de datos climáticos. La operación de BLITECAST muestra claramente el principio que fundamenta un sistema de vigilancia

Two classic forecasting systems, which inspired the adaptation or derivation of other systems, illustrate how web systems have made it possible to scale and automate surveillance models. In the 70’s, BLITECAST and FAST (from which TOMCAST later derived) were pioneering computerized forecasting systems, which generated actionability criteria based on empirical deterministic models combining decision matrices with temperature, precipitation, relative humidity, and leaf wetness to decide the first and subsequent applications of fungicides to control *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* (Madden *et al.*, 1978; Krause *et al.*, 1975). These models were developed in FORTRAN IV operated on IBM 370/168 “mainframe” computers. The calculation of parameters with these models required the manual input of climatic data. The BLITECAST operation clearly shows the principle underlying a surveillance system and the aspects that current digital technology has allowed automating (highlighted with underlining): “*When a grower desires a Blitecast, he telephones the Blitecast operator and reports his most recently recorded environmental data. The operator submits data to the computer via a typewriter terminal. The computer analyzes data within a fraction of a second and returns the forecast and spray recommendation to the operator, who relays it to the grower. The entire operation can be completed during a standard 3-minute telephone call. In this way, it is possible to provide, from a central office, Blitecast for 15 to 20 distant locations in one hour*” (Krause *et al.*, 1975). Later, in the 90’s, the actionability criteria were generated from empirical *models* directly on personal computers using programs developed in Turbo-C or Turbo Pascal, among others, self-executable in the MS DOS® operating system, the predecessor of MS Windows®. Examples of these systems are

y los aspectos que la tecnología digital actual ha permitido automatizar (resaltado con subrayado): *'When a grower desires a Blitecast, he telephones the Blitecast operator and reports his most recently recorder environmental data. The operator submits the data to the computer via a typewriter terminal. The computer analyzes the data within a fraction of a second and returns the forecast and spray recommendation to the operator, who relays it to the grower. The entire operation can be completed during a standard 3-minute telephone call. In this way, it is possible to provide, from a central office, Blitecast for 15 to 20 distant locations in one hour'* (Krause *et al.*, 1975). Posteriormente, en los 90's los criterios de accionabilidad se generaron a partir de *modelos empíricos* directamente en computadoras personales mediante programas desarrollados en Turbo-C o Turbo Pascal, entre otros, autoejecutables en el sistema operativo MS DOS®, antecesor de MS Windows®. Ejemplos de estos sistemas son DMCAST y PLASMO para el control de *Plasmopara viticola* (Park *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 1993). Actualmente, este tipo de sistemas se distribuyen comercialmente como complemento de equipos climáticos para uso individual parcelario aplicable a plagas y enfermedades de vid (*Vitis* spp.), almendro (*Prunus dulcis*), manzano (*Malus domestica*), peral (*Pyrus communis*) y duraznero (*Prunus persica*) (<https://www.ambientweather.com/dadi6571.html>). Esta visión comercial ha limitado el enfoque SVE regional original y restringiendo el *sistema epidemiológico* al componente *clima* como variables predictoras, una tendencia operativa práctica a nivel parcelario, pero limitado en una visión productiva sustentable (Kim *et al.*, 2020; Firanj Sremac *et al.*, 2018).

Los avances de la tecnología digital web y telefonía móvil durante el presente siglo han impulsado la VE regional y fortalecido estrategias predictivas clásicas (Coria-Contreras *et al.*, 2019;

DMCAST and PLASMO to control *Plasmopara viticola* (Park *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 1993). Currently, these types of systems are commercially distributed as a complement to climatic equipment for individual field-plot use applicable to pests and diseases of grapes (*Vitis* spp.), almond (*Prunus dulcis*), apple (*Malus domestica*), pear (*Pyrus communis*), and peaches (*Prunus persica*) (<https://www.ambientweather.com/dadi6571.html>). This commercial vision has limited the original regional ESS approach and biased the *epidemiological system* to the *climate* component as predictive variables, a pragmatically operational trend feasible at the field-plot level but limited to the sustainable plant health approach (Kim *et al.*, 2020; Firanj Sremac *et al.*, 2018).

During this century, advances in digital web and mobile telephony technology have promoted regional ES and strengthened classic predictive strategies (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a). However, the adoption of systemic epidemiological approaches remains limited (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017), privileging, for example, automatic and massive generation variables such as climatic ones (Kim *et al.*, 2020; Firanj Sremac *et al.*, 2018; Newlands, 2018), or relying heavily on classical theoretical modeling pathogen-oriented (Parnell *et al.*, 2017). The evolution of knowledge and technological developments in ES has been limited mainly to fulfill the principles of *infection* and *protection* at the field-plot level. In general, the biological and regional *holistic* vision has been excluded, and the *systemic* application of the *epidemiological system* as a comprehensive rational framework has been absent or partially applied. We must overcome this restrictive scientific and technological approach based on a new paradigm where the spatial unit is scaled to the region (Mora-Aguilera *et al.*, 2014e), and the

Mora-Aguilera *et al.*, 2015a). Sin embargo, la adopción de enfoques epidemiológicos sistémicos sigue siendo limitada (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017), privilegiándose por ejemplo variables de generación automática y masiva como las climáticas (Kim *et al.*, 2020; Firanj Sremac *et al.*, 2018; Newlands, 2018), o enfatizando modelos teóricos clásicos orientados al patógeno (Parnell *et al.*, 2017). La evolución del conocimiento y desarrollos tecnológicos en VE se han circunscrito principalmente a operar los principios de *infección* y *protección* a nivel parcelario. En general, se ha excluido la visión *holística* biológica y regional, y la aplicación *sistémica* del *sistema epidemiológico*, como marco racional integral, ha estado ausente o se ha aplicado parcialmente. Este enfoque científico y tecnológico restrictivo debe superarse sobre la base de un nuevo paradigma donde se escale la unidad espacial a la región (Mora-Aguilera *et al.*, 2014e), y la salud de la planta sea el eje integrador de un nuevo *sistema epidemiológico* como base racional de la *prevención* y *protección* (Figura 1). La tendencia a una visión *holística-sistémica* será el gran reto de la fitosanidad en el futuro. Paradójicamente, el problema no parece ser tecnológico, sino visiones científicas clásicas atomizadas por la especialización. En contrapeso, la tendencia a una agricultura de precisión y extensiva, orientada a satisfacer la necesidad de alimentos y a fortalecer cadenas de valor (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019), forzará el desarrollo de SVE regionales, nacionales y globales.

Marco normativo y operativo

SVE a nivel regional requiere efectiva planeación, operatividad y eventualmente marcos legales que idealmente pueden cumplir instituciones fitosanitarias e instancias coadyuvantes. La Organización Mundial de Comercio (OMC), CIPF,

plant's health, in the broad sense, is the integrating axis of a new *epidemiological system* as a rational basis for *prevention* and *protection* (Figure 1). The trend towards a *holistic-systemic* vision will be a big challenge for plant health in the future. Paradoxically, the problem does not seem to be the technological one, but the classical scientific views atomized by specialization. In contrast, the precision and extensive agriculture trend to satisfy food supplies and crops value chain (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019) will force comprehensive regional, national and global ESS.

Regulatory and operational framework

ESS at the regional level requires effective planning, operability, and eventually legal frameworks that phytosanitary institutions and organizational partners can ideally meet. The World Trade Organization (WTO), IPPC, National and Regional Plant Protection Organizations (NPPO and RPPO, respectively), and growers organized linked to NPPOs have established legal or regulatory frameworks to safeguard plant health and food safety in a regional environment, primarily for international trade purposes (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019). In this context, *surveillance*, without epistemological associativity with *epidemiology* and an apparent reference to the pest in its broad sense, was conceived with a normative approach unrelated to methodological developments of classical epidemiology. However, the emergence and mobility of the recurrent pest through alternative routes to commercial paths (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016a; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2014a), has caused some of these instances to promote the scientific-technological development of ESS beyond the regulatory

Organismos Nacionales y Regionales de Protección Fitosanitaria (ONPF y ORPF, respectivamente), y productores organizados y vinculados con ONPFs, han establecido marcos jurídicos o normativos para salvaguardar la sanidad e inocuidad de productos agrícolas en un entorno regional, principalmente con fines de comercio internacional (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019). En estos ámbitos la *vigilancia*, sin asociatividad epistemológica a la *epidemiología*, y en clara referencia a la plaga en su concepción amplia, fue concebida con un enfoque normativo desvinculada de desarrollos metodológicos de la epidemiológica clásica. No obstante, la recurrente emergencia y movilidad de plagas, por vías alternas a flujos comerciales (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016a; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2014a), ha provocado que algunas de estas instancias impulsen el desarrollo científico-tecnológico de SVE más allá del marco normativo establecido, por ejemplo, en NIMF 6 *Directrices para la Vigilancia* publicada por la CIPF (<https://www.ippc.int/es/>). Esta norma, cuyo fin es armonizar la vigilancia entre países adherentes a la CIPF, es efectiva para determinar el estatus de una plaga, pero altamente restrictiva conceptual y metodológicamente para sustentar sistemas cuantitativos robustos, inferenciales y aplicados a toma de decisiones fitosanitarias en procesos productivos (Cuadro 1).

En 2019, se publicó la nueva versión de la NIMF 6 denominada *Vigilancia* (<https://www.ippc.int/es/>). En esta versión aún prevalece un marco conceptual epidemiológico restrictivo, pero se amplían opciones analíticas y metodológicas acordes a la epidemiología cuantitativa con el fin reducir el riesgo de movilidad de plagas por efecto del comercio internacional y otras vías. Sin embargo, también se reconoce la importancia de proteger cultivos estratégicos de plagas preexistentes en un país

framework established, for example, in the ISPM 6 *Guidelines for Surveillance* (<https://www.ippc.int/es/>). Such normative, whose purpose is to harmonize surveillance among countries adhering to the IPPC, effectively determines the status of a pest but is highly restrictive conceptually and methodologically to support robust quantitative systems, inferential and applied to phytosanitary decision-making in crop production (Table 1).

In 2019, the new version of ISPM 6 called *surveillance* was published. A restrictive epidemiological conceptual framework still prevails in this version, but analytical and methodological options are expanded according to quantitative epidemiology to reduce the risk of pest mobility due to international trade and other paths. However, the importance of protecting strategic crops from pre-existing pests in a country is also recognized (<https://www.ippc.int/es/>). The ISPMs are minimum guidelines for NPPOs that can be optimized conceptually and methodologically, with the corresponding scientific support. Thus, each country can develop official ES programs according to its phytosanitary needs and legal framework (Table 1). In addition, organized growers or companies can implement ES programs, generally type 2 or 3, which may have the technical and/or financial support of the NPPO.

An example is the Integral System of Protection and Epidemiological Surveillance of Agave (SIVEA in Spanish), associated to the Tequila Regulatory Council (TRC) with technical and financial official support (Table 1). In other cases, productive associations can develop and operate their ES programs according to their productive and commercial needs. Adherence to international regulations is not required while ensuring productivity and effective management of phytosanitary risks. The Guatemalan National Coffee Association (ANACAFE), the Citriculture

(<https://www.ippc.int/es/>). Las NIMFs son directrices mínimas para ONPFs que pueden optimizarse conceptual y metodológicamente, con el correspondiente sustento científico. Así, cada país puede desarrollar programas de VE oficiales acorde a sus necesidades fitosanitarias y marco legal (Cuadro 1). En adición, por iniciativa de productores organizados o empresas es posible implementar programas de VE, generalmente de tipo 2 o 3, los cuales pueden tener el soporte técnico y/o financiero del ONPF. Un ejemplo lo constituye el Sistema Integral de Protección y Vigilancia Epidemiológica del Agave (SIVEA) asociado al Consejo Regulador del Tequila (CRT) con apoyo técnico y financiero del ONPF (Cuadro 1). En otros casos, organizaciones productivas pueden desarrollar y operar sus propios programas de VE acordes a sus necesidades productivas y de comercio. No se requiere la adherencia a la normatividad internacional mientras se garantice la productividad y un manejo efectivo de riesgos fitosanitarios. La Asociación Nacional del Café de Guatemala (ANACAFE), Fundación de Defensa de la Citricultura (FUNDECITRUS) y la Fundación ABC constituida para la asistencia en trigo, soya y frijol en Brasil, son ejemplos con instancias científicas no gubernamentales financiados directamente por productores, con limitada o nula participación oficial (Cuadro 1).

Programas de vigilancia epidemiológica y la tecnología digital

La vigilancia epidemiológica a escala regional puede generar y emplear bases de datos constituidas por millones de metadatos. Superar la barrera analítica del dato parcelario fue posible con el advenimiento de tecnología digital de los 90's. Hay tres sucesos tecnológicos que posibilitaron romper con la vigilancia parcelaria y con el uso de modelos de pronóstico locales: Desarrollo del World Wide Web

Defense Foundation (FUNDECITRUS), and the ABC Foundation constituted for assistance in wheat, soybeans, and beans in Brazil, are examples of scientific non-governmental entities financed directly by growers, with limited or no official participation (Table 1).

Epidemiological surveillance programs and digital technology

Epidemiological surveillance at the regional scale can generate and use databases consisting of millions of metadata. Overcoming the analytical barrier of field-plot data was possible due to the advent of digital technology in the 90's. Three technological events made it possible to break with field-plot surveillance and the use of local forecasting models: Development of the World Wide Web (WWW), which allows data to be consulted anywhere in the world through an internet service provider; the standardized SQL database language for storing large volumes of multidimensional structured data and its subsequent consultation 24/7 (h day⁻¹) (e.g., Apache Derby) (Chiavegatto, 2015); and finally, the Android® mobile operating system, developed in open source programs, which enabled the integration of programs (Apps) to record variables measurements *in situ*, transfer in real-time to WWW databases to automate epidemiological analyzes and reception of phytosanitary alerts (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). The digital revolution made the cross-sectional integration of plant health at the community level of crops (e.g., sour and sweet citrus species) and pests that interact in a region (e.g., CLas, CTV, *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida* in citrus). As a result, at the scientific level, it was possible to operate complexity, as a *holistic-systemic* approach, to epidemiological responses and, at the productive level, correctly conceive and assess sustainability

(WWW), que permite la consulta de datos en cualquier parte del mundo a través de un proveedor de internet; el lenguaje de base de datos estandarizado SQL para almacenamiento de grandes volúmenes de datos multidimensionalmente estructurados y su posterior consulta 24/7 (h día⁻¹) (p.e., Apache Derby) (Chiavegatto, 2015); y por último, el sistema operativo móvil Android®, desarrollado en programas de código abierto, que posibilitó la integración de programas (Apps) para el registro de medición de variables *in situ*, transferencia en tiempo real a bases de datos WWW para automatizar análisis epidemiológicos y recepción de alertas sanitarias (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). La revolución digital hizo posible la integración transversal de la fitosanidad a nivel de comunidad de cultivos (p.e., especies de cítricos agrios y dulces) y plagas que interactúan en una región (p.e., CLas, CTV, *Dia-phorina citri*, *Toxoptera citricida* en cítricos), viabilizando a nivel científico operar la complejidad como enfoque *holístico-sistémico* de respuestas epidemiológicas, y a nivel productivo concebir y medir correctamente indicadores de sustentabilidad y resiliencia. Previo a los desarrollos tecnológicos de los 90's, el investigador debía explotar al máximo limitadas bases de datos mediante modelos programados en Fortran o Pascal ejecutados mediante tarjetas perforadas en grandes computadoras IBM o *mainframe* (Casacuberta, 2013). Alternativamente, bases de datos fitosanitarias creadas por la academia u organismos internacionales (p.e., FAO) se masificaron mediante dispositivos digitales asociados a gestores de datos tipo dBase pero de nula o limitada aplicación directa en modelaje.

En la actualidad, la *vigilancia* 'normativa' (i.e., VE tipo 1 y 2), la que aporta listados oficiales de plagas regionalmente presentes, análisis descriptivos y categóricos de plagas en un entorno web, tiene amplia aceptación en ONPFs y organismos regionales de protección fitosanitarios (ORPF) como

and resilience indicators. Before the technological developments of the 90's, the researcher had to exploit limited databases to the maximum through models programmed in Fortran or Pascal executed using punched cards in large IBM or *mainframe* computers (Casacuberta, 2013). Alternatively, phytosanitary databases created by academia or international organizations (e.g., FAO) were massified by digital devices associated with dBase-type data managers but with no or limited direct application in modeling.

At present, 'normative' *surveillance* (i.e., VE type 1 and 2), which provides official lists of regionally present pests, descriptive and categorical analyzes of pests using a web environment, has wide acceptance in NPPOs and regional phytosanitary protection organizations (RPPOs) such as NAPPO, OIRSA, and EPPO, yet with asymmetric advances (Table 1). These instances operate ES following regulatory and transparency guidelines established in the Agreements on Sanitary and Phytosanitary Measures of the World Trade Organization (WTO), further formalized and expanded in the IPPC. These qualitative ES web programs vary in flexibility, dynamism, user interaction, report generation, etc. Methodologically, they depend on pest diagnosis protocols and sampling and/or monitoring strategies (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017). Consequently, they are feasible to be implemented with the technical expertise of RPPO or NPPO without supervised scientific execution. In contrast, the application and adoption of ES type 3 have been limited for the lack of rational models and conceptual, methodological, operational, and technological constraints. An effective *holistic-systemic* type 3 ESS is generated from the interdisciplinary conception of three *interdependent models*: A) *Integrative innovation model* between research, institutional policies, and operational structures. This guarantees

NAPPO, OIRSA y EPPO, aunque con avances asimétricos (Cuadro 1). Estas instancias operan VE en concordancia con lineamientos regulatorios y de transparencia establecidos en los Acuerdos sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial de Comercio (OMC), posteriormente formalizados y ampliados con la CIPF. Estos programas de VE cualitativos digitales varían en flexibilidad, dinamismo, interacción con el usuario, generación de reportes, etc. Metodológicamente son dependientes de protocolos de diagnóstico de plagas y de estrategias de muestreo y/o monitoreo (Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017). Consecuentemente son factibles de implementarse en el ámbito técnico de un ORPF u ONPF sin supervisión científica. En contraste, la aplicación y adopción de VE tipo 3 ha sido limitada por deficientes modelos racionales y por restricciones conceptuales, metodológicas, operativas y tecnológicas. Un SVE *holístico-sistémico* efectivo tipo 3 se genera a partir de la concepción interdisciplinaria de tres *modelos* interdependientes: A) *Modelo de innovación integral* entre investigación, políticas institucionales y estructuras operativas. Este permite garantizar la adopción y aplicabilidad a partir de estrategias de gestión y vinculación interinstitucionales; B) *Modelo científico-tecnológico* (Figura 2); y C). *Modelo de integración de tecnologías digitales* (Figura 3), los cuales permiten planear y aplicar tecnologías pertinentes a las necesidades científicas del SVE (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019; Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). Otra limitante que debe superarse es la tendencia a emplear un marco racional analítico generalmente restringido o acotado a un subsistema del *sistema epidemiológico* como contexto predictor de cambios en la dinámica de plaga(s) (Figura 1). Por ejemplo, una tendencia en los últimos 20 años ha sido el énfasis en variables del subsistema clima,

the adoption and applicability of inter-institutional management and organizational strategies; B) *Scientific-technological model* (Figure 2); and C) *Integrative digital technologies model* (Figure 3), which allow planning and applying relevant technologies to the scientific needs of the ESS (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019; Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). Another limitation to overcome is the tendency to use a rational, analytical framework generally restricted or limited to a subsystem of *the epidemiology system* as a predictive context of changes in pest dynamics (Figure 1). For example, a trend in the last 20 years has been the emphasis on variables of the climate subsystem, such as temperature, wind, relative humidity, etc., favored by the availability of digital weather stations and public access to regional databases (e.g., CONAGUA in Mexico) and global (NOAA) (Magarey and Isard, 2017), for the development of regional phytosanitary risk alerts (Kim *et al.*, 2020; Moschini *et al.*, 2004). This subsystem has shown viability in extensive crops with linear thermal gradients (Tsukahara *et al.*, 2008; Moschini *et al.*, 2004), but in general, its application is not feasible in heterogeneous agroecosystems due to the exclusion of other subsystems associated with rational biological processes of pests (Mora-Aguilera *et al.*, 2016a, b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d) (Figure 1). A systemic ESS is inherently holistic. It requires a robust *epidemiological system* and integrative models as rational frame. Digital technology is clearly subordinate to ESS needs and objectives. It is not the ultimate goal (Figure 4).

The general structure of an Epidemiological Surveillance System type 3

A web-based ESS in the *holistic-systemic* approach, a type 3 ES, corresponds

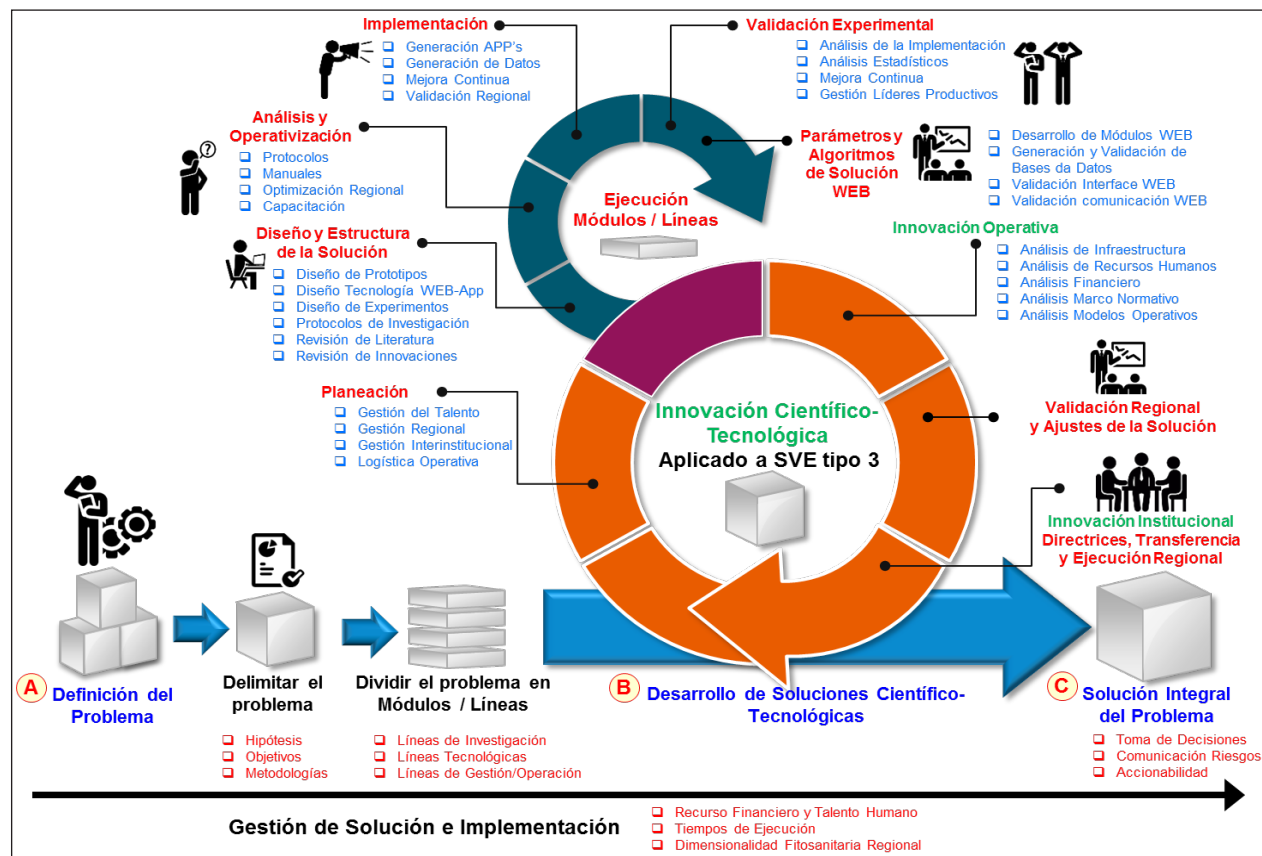


Figura 2. *Modelo científico-tecnológico* empleado en la concepción, desarrollo, validación e implementación web de un Sistema de Vigilancia Epidemiológico (SVE) tipo 3. El modelo tiene tres ejes principales: Definición del problema (A); desarrollo de soluciones científico-tecnológicas (B); y solución integral del problema (C). El modelo genera innovación *tecnológica* continua, la cual detona innovaciones *institucionales* y *operativas* complementarias requeridas para garantizar el éxito SVE. Fuente: CP-LANREF.

Figure 2. *Scientific-technological model* used in the conception, development, validation and implementation of a web-based Epidemiological Surveillance System (ESS) type 3. The model is based on three main elements: Definition of the problem (A); development of scientific-technological solutions (B); and comprehensive solution (C). The model generates continuous *technological* innovations which prompt complementary *institutional* and *operative* innovations to guaranty ESS success. Source: CP-LANREF.

como temperatura, viento, humedad relativa, etc., favorecido por la disponibilidad de estaciones meteorológicas digitales y acceso público a bases de datos regionales (p.e., CONAGUA en México) y globales (NOAA) (Magarey e Isard, 2017), para el desarrollo de alertas de riesgos fitosanitarios regionales (Kim *et al.*, 2020; Moschini *et al.*, 2004). Este subsistema ha mostrado viabilidad en cultivos extensivos con gradientes térmicos lineales (Tsuka-

to a *complex dynamic system* characterized by the interaction and interdependence of multiple concurrent processes, all derived from the *epidemiology system* rational frame (Figure 2-4), which operate with the following assumptions: 1) Every phytosanitary phenomenon is multidimensional and has a highly dynamic multivariate variability in time and space. Its characterization and quantification are the basis

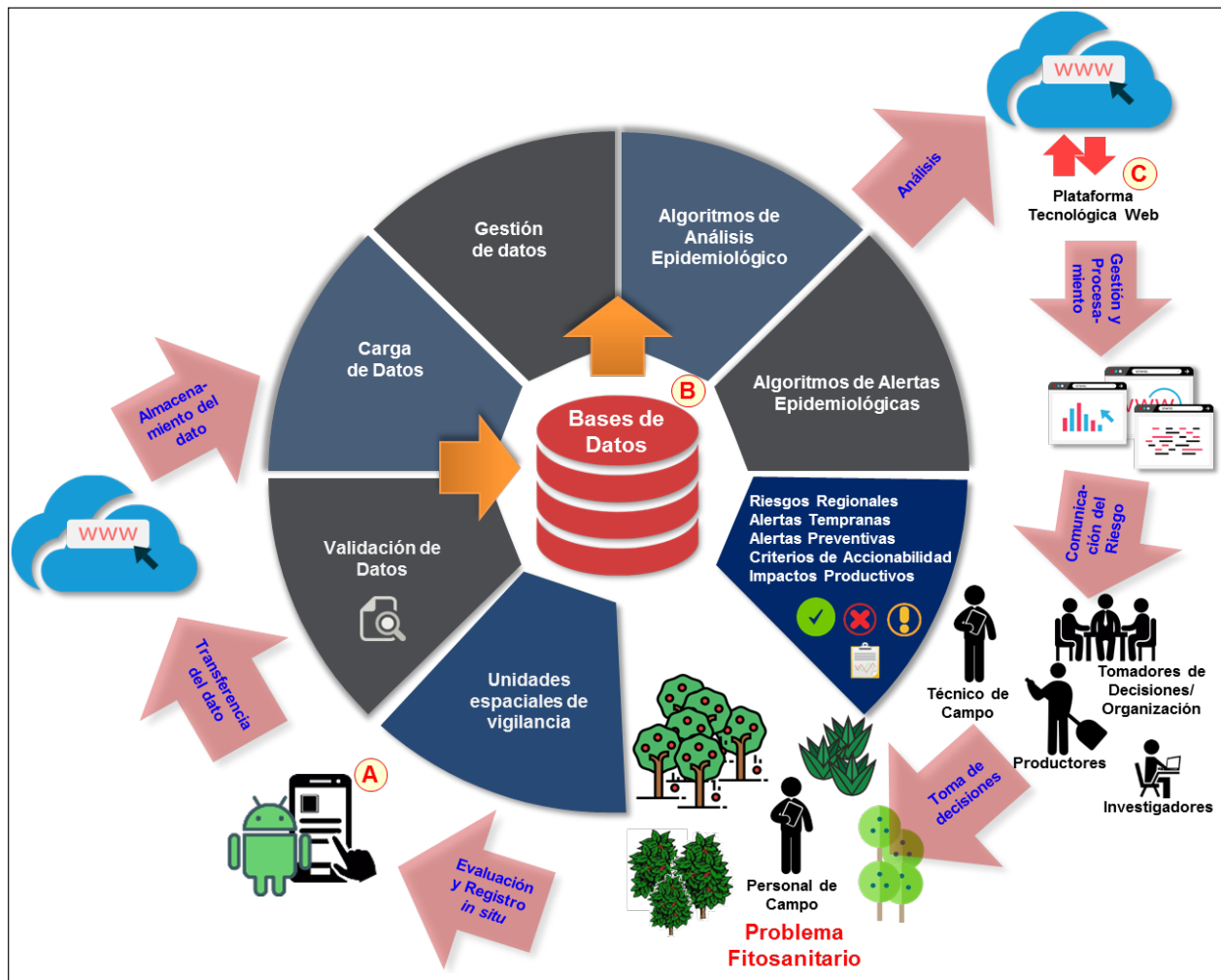


Figura 3. *Modelo de integración de tecnología digital* aplicable a la generación y gestión web de datos de un Sistema de Vigilancia Epidemiológico tipo 3 mediante tres elementos integrales: Diseño de aplicaciones móviles de código abierto para evaluación y registro de *n*-variables epidemiológicas *in situ* (A); diseño estructural de *n*-bases de datos relacionales (B); y desarrollo de una plataforma modular web para gestión de metadatos, análisis y comunicación de riesgos (C) (Figura 4). Fuente: CP-LANREF.

Figure 3. *Integrative model of digital technology* applicable to the development and processing of data in a web-based Epidemiological Surveillance System type 3 through three integral elements: Design of open source mobile applications for evaluation and records of epidemiological *n*-variables *in situ* (A); structural design of relational *n*-databases (B); and development of a modular web-platform for metadata processing, analysis, and risk communication (C) (Figure 4). Source: CP-LANREF.

hara *et al.*, 2008; Moschini *et al.*, 2004), pero en general su aplicación es inviable en agroecosistemas heterogéneos al excluir otros subsistemas asociados a sensibles procesos biológicos de las plagas (Mora-Aguilera *et al.*, 2016a,b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b) (Figura 1). Un SVE sistémico es intrínse-

of modeling, epidemic indicators, and algorithms development; 2) Require planned feedback, and optimization protocols, e.g., a molecular diagnosis can correct risk factors, or a new pest incursion implies reconfiguring prevalence algorithms and analyses interfaces; 3) It involves non-linear

camente holístico. Requiere un *sistema epidemiológico* robusto y modelos integrativos como marco racional. La tecnología digital claramente se subordina a las necesidades y objetivos del SVE. Es la consecuencia, no el fin (Figura 4).

functional relationships between variables whose parameters are also relative in space-time. For example, the sporulation rate of *H. vastatrix* versus leaf severity does not have a simple proportional relationship, and its estimated parameters

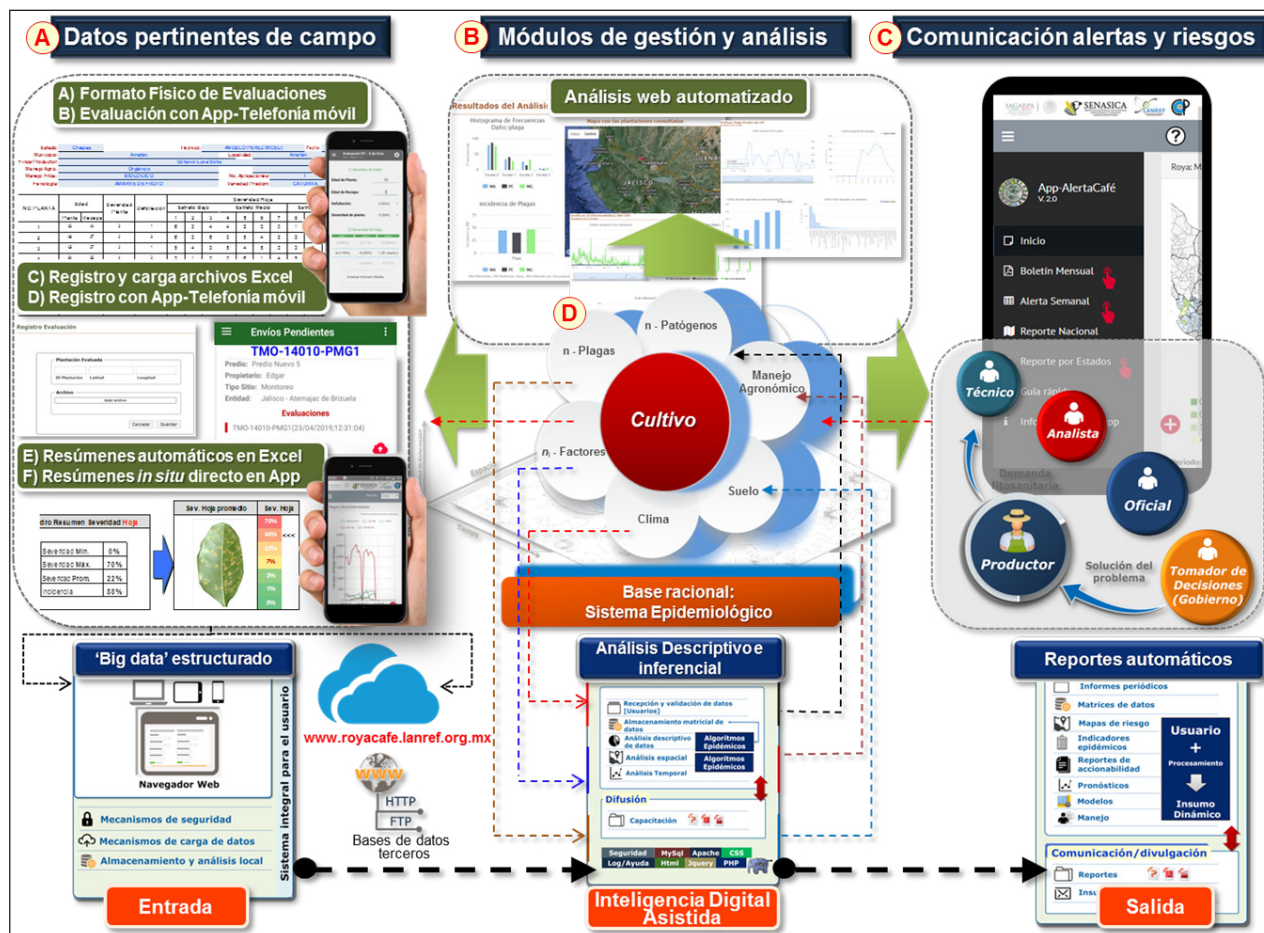


Figura 4. Modelo sistémico general de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica tipo 3 operado por técnicos capacitados en la concepción *holística-sistémica* de los principios de *prevención* y *protección* aplicados al manejo de plagas. Integra aplicaciones móviles *ad hoc* para registro de datos pertinentes de campo (A) (Figura 3), su envío en tiempo real a una plataforma web modular para gestión de base de datos y análisis dinámico automatizado (B), y comunicación de riesgos mediante la generación de gráficas descriptivas, indicadores epidémicos y alertas epidemiológicas aplicadas a toma de decisiones en *manejo integrado fitosanitario* sustentable (C). El modelo tiene como base racional el novel *sistema epidemiológico* (D) (Figura 1). Fuente: CP-LANREF.

Figure 4. General systemic model of a web-based Epidemiological Surveillance System type 3 implemented by trained human resources in the *holistic-systemic* conception of the *prevention* and *protection* principles applied to pest management. It is supported by *ad hoc* mobile applications for pertinent field data collection (A) (Figure 3), its sending in real-time to a modular web system for big data management and automated dynamic analyses (B), and risk communication through descriptive graphics, epidemic indicators and epidemiological alerts applied to decision making in *regional integrated phytosanitary management* (C). The model has the novel *epidemiological system* as comprehensive approach (D) (Figure 1). Source: CP-LANREF.

Estructura general de un Sistema de Vigilancia Epidemiológico tipo 3

Un SVE web en la concepción *holística-sistémica*, es decir un VE tipo 3, corresponde a un *sistema dinámico complejo* caracterizado por la interacción e interdependencia de múltiples procesos concurrentes, todos derivados a partir del marco racional del *sistema epidemiológico* (Figura 2-4), los cuales operan con las siguientes asunciones: 1) Todo fenómeno fitosanitario es multidimensional y posee una variabilidad multivariada altamente dinámica en tiempo y espacio. Su caracterización y cuantificación es la base del modelaje, indicadores epidémicos y desarrollo de algoritmos; 2) Requiere procedimientos planeados de retroalimentación y optimización, p.e., un diagnóstico molecular puede corregir factores de riesgo u ocurrencia de una nueva plaga implica reconfigurar algoritmos de prevalencia y módulos de análisis; 3) Involucra relaciones funcionales no lineales entre variables cuyos parámetros además son relativos en espacio-tiempo, p.e., la tasa de esporulación de *H. vastatrix* versus severidad no tiene una relación proporcional simple y sus parámetros estimados son dependientes de variedad de café (*Coffea arabica*) o factores de manejo (Mendoza-Ramos *et al.*, 2015b); 4) Incluye mediciones cualitativas (p.e., categorías de manejo agronómico) y cuantitativas (i.e., número de hojas con lesiones de roya), lo cual diversifica las estrategias analíticas; y 5) El factor humano es parte sustancial del *sistema*. Directamente, aportando calidad del dato registrado en campo y en adopción de criterios de accionabilidad preventiva/protectora; e indirectamente, en planeación de política fitosanitaria y agrícola. Debido a la complejidad intrínseca, un SVE requiere un enfoque de *holístico-sistémico* e idealmente un equipo interdisciplinario involucrado en procesos cíclicos de análisis y síntesis conducentes a la solución del problema (Figura 1 y 2).

are dependent on the coffee variety (*Coffea arabica*) or management factors (Mendoza-Ramos *et al.*, 2015b); 4) It includes qualitative (e.g., agronomic management categories) and quantitative measurements (e.g., number of leaves with rust lesions), which diversify the analytical strategies; and 5) The human factor is a substantial part of the system. Directly, by providing quality of data records collected on the field and adopting preventive/protective actionability criteria; and indirectly, thought phytosanitary and agricultural policy planning. Due to the intrinsic complexity, an ESS requires a *holistic-systemic* approach and, ideally, an interdisciplinary team involved in cyclical processes of analysis and synthesis, leading to the solution of the problem (Figure 1 and 2).

This *holistic-systemic* approach results in a digital technological model of innovation (Figure 3) (Kang *et al.*, 2010), but articulated to a rational research framework to support the development of methods and algorithms in solving the phytosanitary problem (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d; Kuang *et al.*, 2012). The general structure of a web-based ESS has three perfectly differentiated components: 1) Generation of relevant field data through App-Web platform synchronization; 2) Modular system for advanced data management and analysis in the web platform and restricted analysis in the App; 3) Alerts and risks communication. These components have flow diagrams specific to the phytosanitary problem, so they have their digital programming structure and cannot be used arbitrarily (Figure 4) The development core can be a back-end programming language like PHP complemented with others front-end types like JavaScript. In this concept, a *web platform* should be understood as a web interface specifically designed and developed to graphically represent and/or intervene in a big phytosanitary database through specific user requirements upon an automatized menu

Este enfoque *holístico-sistémico* resulta en un modelo tecnológico digital de innovación (Figura 3) (Kang *et al.*, 2010), pero articulado a un marco racional de investigación para sustentar el desarrollo de algoritmos en la solución del problema fitosanitario (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d; Kuang *et al.*, 2012). La estructura general de un SVE web tiene tres componentes perfectamente diferenciados: 1) Generación de datos pertinentes de campo a través de sincronización App-Plataforma Web; 2) Sistema modular de gestión y análisis avanzados en Plataforma Web y análisis restringido en App; 3) Comunicación de alertas y riesgos. Estos componentes poseen diagramas de flujo específicos al problema fitosanitario por lo que poseen su propia estructura digital de programación y no pueden aplicarse indiscriminadamente (Figura 4). El núcleo de desarrollo implica un lenguaje de programación a nivel servidor, como PHP, complementado con otro usuario-interfaz, como JavaScript. Una *plataforma* debe entenderse aquí como una interfaz web específicamente diseñada y desarrollada para representar gráficamente y/o intervenir grandes bases de datos fitosanitarios a través de requerimientos específicos del usuario a partir de un conjunto automatizado de opciones propuestas para la comprensión y solución de un problema fitosanitario. Sin embargo, una plataforma web, orientada a simplificar las necesidades del usuario, representa únicamente el modelo digital operativo y no la integralidad del proceso *holístico-sistémico* asociados con un SVE tipo 3 que un equipo interdisciplinario de expertos supervisa y aplica mejora continua (Figura 2-4).

Aplicaciones móviles – plataformas web en la gestión del dato epidemiológico

La telefonía móvil y el desarrollo de aplicaciones (Apps) para operar en esos dispositivos

provided to comprehend and solve a phytosanitary problem. However, the intended user-friendly web platform represents only the operational digital model, not the comprehensiveness of the *holistic-systemic* process associated with an ESS type 3 that an interdisciplinary team supervises and continuously improves (Figure 2 - 4).

Mobile applications - web platforms in the management of epidemiological data

Mobile telephony and the development of applications (Apps) to operate on these devices have revolutionized ES, being fundamental to ESS type 3, in the last ten years (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017; Aanensen *et al.*, 2009) (Figure 3 and 4). Apps with relevant architecture allow the recording and transferring data in real-time with telephone service providers and low-cost equipment. Android®, the popular open-source operating system, has favored the generation and innovation of Apps according to specific ESS needs. However, these developments must ensure adequate biological, epidemiological, and operational bases for functional purposes. An interdisciplinary team is essential to achieve this purpose. The usability growing trend of Apps in ES, and in general in phytosanitary programs, has exhibited application failures because its conception is delegated to the software developer.

Additionally, an App can be designed for particular purposes, e.g., to assess disease severity, sampling units calculation, georeferencing of suspicious pests and symptoms, and to the record of trapped individuals (Pethybridge and Nelson, 2018; Pethybridge and Nelson, 2015). This leads to the excessive fragmentation of a phytosanitary problem in multiple Apps, but handily for ES type 1 and 2. In contrast, a generic App, overloaded with modules and menu tools can be complex

ha revolucionado la VE, siendo fundamental para SVE tipo 3 en los últimos 10 años (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017; Aanensen *et al.*, 2009) (Figura 3 y 4). Apps con arquitectura pertinente permiten registrar y transferir datos en tiempo real con servicios telefónicos y equipos de bajo costo. Android®, el popular Sistema Operativo de código abierto, ha favorecido la generación e innovación de Apps acordes a necesidades específicas SVE. Sin embargo, estos desarrollos deben asegurar una adecuada integración de bases biológicas, epidemiológicas y operativas con fines funcionales. Un equipo interdisciplinario es fundamental para lograr este propósito. La tendencia creciente del empleo de Apps en VE, y en general en la fitosanidad, ha exhibido fallas aplicativos debido a que se delega su concepción al desarrollador de software.

Adicionalmente, una App puede diseñarse para fines muy específicos, p.e., evaluar severidad de enfermedad, cálculos de unidades de muestreo, georreferenciación de plagas/síntomas sospechosos, y registro de individuos trapeados (Pethybridge y Nelson, 2018; Pethybridge y Nelson, 2015). Esto conduce a la fragmentación excesiva de un problema fitosanitario en múltiples Apps, pero viables para VE tipo 1 y 2. En contraparte, una App genérica, sobrecargada de módulos y opciones puede resultar compleja e impráctica. Por otra parte, la factibilidad técnica y conceptual para desarrollar una App orientada al usuario final, sin interactividad web, proyecta una idea tecnológica simplificada. En realidad, Apps para SVE tipo 3 deben concebirse para flujo bidireccional de datos referenciados en espacio-tiempo, vinculado a un sistema web de gestión fitosanitario y múltiples usuarios acreditados para registrar y recibir información estandarizada y sincrónica hacia / desde un entorno web (Figura 3 y 4) (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). Estas Apps tienen un fin epidemiológico y son más complejas conceptual y operativamente

and impractical. On the other hand, the technical and conceptual feasibility to develop an App oriented to end-users, without web interactivity, oversimplified the EES technological needs. In reality, Apps for ESS type 3 support must be conceived for bidirectional flow of data referenced in space-time, structured linked to its phytosanitary web platform with multiple accredited users to register and receive standardized and synchronous information to and from the web environment (Figure 3 and 4) (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). These Apps have an epidemiological purpose and are conceptually and operationally complex (Drew *et al.*, 2020; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). In other cases, such as Epicollect5 3.0.3, a pioneering generic application (Aanensen *et al.*, 2009), they are linked to a web environment for data integration and visualization, but they do not incorporate algorithms for decision-making.

ESS type 3 Apps are essential to record periodic data in real-time from extensive evaluations of variables associated with the *epidemiological system* in *n*-sites/regional production units preselected with quantitative inductivity criteria, ideally with statistical error estimates for technical auditability purposes (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Parnell *et al.*, 2017; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera, 2016). Eventually, the structured collection of data storage hock to a web platform generates large volumes of data (i.e., structured big data), which are intervened by dynamic algorithms to generate descriptive graphic outputs, automated analysis, and development of actionability criteria for decisions making inherent to the ESS objective(s). A mobile application designed with an epidemiological approach also allows its implementation in ESS support research (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria- Contreras *et al.*, 2019) and in risk communication by receiving alerts for decision-

(Drew *et al.*, 2020; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). En otros casos, como en Epicollect5 3.0.3, una aplicación pionera genérica (Aanensen *et al.*, 2009), se vinculan a un entorno web para la integración y visualización de datos, pero no permiten la incorporación de algoritmos para tomas de decisiones.

Apps para SVE tipo 3 son esenciales para registrar datos periódicos en tiempo real a partir de evaluaciones extensivas de variables asociadas al sistema epidemiológico en *n*-sitios/unidades productivas regionales preseleccionadas con criterios cuantitativos de inductividad, idealmente con estimaciones de error estadístico con fines de audibilidad técnica (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Parnell *et al.*, 2017; Acevedo-Sánchez y Mora-Aguilera, 2016). Eventualmente, el acopio estructurado de datos articulados a una plataforma web *ad hoc* genera grandes volúmenes de datos los cuales son intervenidos mediante algoritmos dinámicos para generar insumos gráficos descriptivos, análisis automatizados y desarrollo de criterios de accionabilidad para toma de decisiones inherentes al objetivo(s) de un SVE. Una aplicación móvil diseñada con un enfoque epidemiológico permite también su implementación en investigación de soporte (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019), y en comunicación de riesgos mediante la recepción de alertas para toma de decisiones. App Alerta Café v. 2.0, disponible en *Play Store*, se implementó por tres años con este propósito (CP-LANREF, 2017. No Publicado). CP-LANREF generó las aplicaciones App-VEFCafé v4.7 y App-SIVEA v4.1 para SVEs de café (*C. arabica*) y agave (*Agave tequilana*), respectivamente, operados oficialmente por el ONPF (SENASICA-DGSV) (Cuadro 1). Estas aplicaciones permiten el registro de un total de 79 y 71 metadatos calendarizados, totalizando 103,242,764 y 35,664,551 registros en bases de datos web durante ocho y cinco años de

making. App Alerta Café v. 2.0, available in Play Store, was supported for three years with this purpose (CP-LANREF, 2017. Not published). CP-LANREF generated the applications App-VEFCafé v4.7 and App-SIVEA v4.1 for ESS of coffee (*C. arabica*) and agave crop (*Agave tequilana*), respectively, officially operated by the NPPO (SENASICA-DGSV) (Table 1). These applications allow the collection of a total of 79 and 71 scheduled metadata, totaling 103,242,764 and 35,664,551 database web records in eight and five years of implementation, respectively. Operational characteristics include ge positioning, user authentication, characterization of productive units, ID QR systems, pest damage assessment, pest density, plant phenology, etc. These guarantee standardization, timeliness, reliability, and regional representativeness of phytosanitary and productive data of the target crop. The Apps were developed for the Android® operating system (version 5 or higher for coffee and 6 – 8 for agave), articulated with web technologies and back-end programming languages (PHP, Nodejs, etc.) to generate web services for registering-sending data. They use relational databases with MySQL as the primary manager. Both Apps were extensively validated before ESS implementation, requiring adaptation for compatibility between mobile systems, automatic geographical verification of ge positioning, record retrieval, local historicity of data, etc.

These Apps are developed with a multifunctional, multivariate and multipest modular structure. App-SIVEA also allows the generation of epidemiological pre-alerts *in situ*. The metadata feed algorithms in the PVEF-Cafeto and SIVEA web platforms to generate preventive alerts of phytosanitary risks at a regional and sub-regional level for decision-making. The use of this type of Apps requires training, and they are for the exclusive use of accredited users. Other Apps

implementación, respectivamente. Características operativas incluyen geoposicionamiento, autenticación de usuarios, caracterización de unidades productivas, sistemas QR de identificación, y escalas de evaluación daño por plaga(s), fenología, etc., que garantizan estandarización, oportunidad, confiabilidad y representatividad regional de datos fitosanitarios y productivos del cultivo agrícola de interés. Las Apps fueron desarrolladas para el sistema operativo Android® (versión 5 o mayor para café y 6 - 8 para agave) articuladas con tecnologías web y lenguajes de programación asociadas al servidor (PHP, HTML, CSS, etc.) para generar servicios web de registro-envío de datos. Emplean bases de datos relacionales teniendo a MySQL como gestor principal. Ambas Apps se validaron extensivamente previa implementación SVE, requiriendo adecuación por compatibilidad entre sistemas móviles, verificación geográfica automática de georreferencias, recuperación de registros, historicidad local de datos, etc.

Estas Apps están desarrolladas con una estructura modular multifuncional, multivariada y multiplaga. App-SIVEA permite además generar pre-alertas epidemiológicas *in situ*. Los metadatos alimentan algoritmos en las plataformas PVEF-Cafeto y SIVEA para generar alertas preventivas de riesgos fitosanitarios a nivel regional y subregional para toma de decisiones. El uso de este tipo de Apps requiere entrenamiento y son de uso exclusivo para usuarios acreditados. Otras Apps, con propósitos fitosanitarios pueden ser genéricas y de uso libre. App-Monitor 4.0 de CP-LANREF se diseñó en soporte a diagnósticos epidemiológicos no extensivos. Permite configurar la escala de medición de daño y vigor de planta, evaluar hasta cinco plagas de interés y registrar la especie vegetal hospedera. Los datos generados son compatibles con formato MS Excel y son exportables desde distintas herramientas como e-mail, bluetooth y otras. Esta App también puede descargarse desde *Play Store*.

for phytosanitary purposes can be generic and free to use. CP-LANREF App-Monitor v. 4.0 was designed to support non-extensive epidemiological diagnoses. It allows setting the scale to assess pest(s) damage and plant vigor, evaluate up to five pests of interest, and register the host plant species. The data generated is compatible with MS Excel format and can be exported from different tools such as e-mail, Bluetooth, and others. This App can also be downloaded from Play Store.

After exhaustive validation under real conditions, the digital technology and support research results should be transferred to end-user directly on the field to assure data quality and adoption of the *holistic-systemic* philosophy explicit on the scientific-technological innovation. Such transference must include the implemented institutional and operative innovation models implying directives, protocols, functional roles, and programmed goals. Effective human talent management is fundamental for ESS type 3 success (Figure 2 and 3).

Algorithms applicability to metadata management and analyses

ESS type 3 requires integrating quantitative strategies to establish or support *preventive* and *protective* actionability criteria in pest management (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Acevedo-Sanchez *et al.*, 2017; Acevedo-Sanchez and Mora-Aguilera., 2016; Mora Aguilera *et al.*, 2015a,b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014e). ES types 1 and 2 often rely on normative qualitative decisions (i.e., present/absent pest). In web-based ESS, quantitative strategies must generate solutions or algorithms programmable to automate the management and analyses of big structured data in real-time. In this context, a computer program is lines of code in a language suitable for the web environment, such as PHP, that solves a specific

Después de un proceso exhaustivo de validación en condiciones reales, la tecnología digital y la investigación de soporte generada para un SVE tipo 3 debe ser transferida al usuario final directamente en campo para asegurar calidad del dato y adopción de la filosofía *holística-sistémica* explícita en la innovación científica-tecnológica. Esta transferencia debe incluir el modelo de innovación operativo y el institucional/empresarial/productivo con énfasis en directrices, protocolos, roles funcionales y metas programáticas. La gestión efectiva del talento humano determina el éxito SVE web tipo 3 (Figura 2 y 3).

Aplicabilidad de algoritmos en la gestión y análisis de metadatos

SVE tipo 3 requiere la integración de estrategias cuantitativas para establecer o sustentar criterios de accionabilidad *preventivos* y *protectivos* en el manejo de plagas (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera, 2016; Mora Aguilera *et al.*, 2015a, b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014e). VE tipo 1 y 2 comúnmente emplean criterios normativos cualitativos (i.e., plaga presente/ausente). En SVE web, las estrategias cuantitativas deben generar soluciones o algoritmos programables para automatizar la gestión y análisis de grandes volúmenes de datos en tiempo real. En este contexto, un programa de computo son líneas de código en un lenguaje idóneo para entorno web, como PHP, que resuelve un problema específico de visualización gráfica, generación de reportes automáticos con análisis descriptivos y cálculo de criterios de accionabilidad define un algoritmo (Figura 5A). Un enfoque intuitivo para generar algoritmos ha sido el empleo de *modelos empíricos determinísticos* o *modelos estocásticos* recurrentes en la epidemiología clásica. Por ejemplo, para resolver la interrogante: ¿Cuál

problem of graphical visualization, generating automatic reports with descriptive analysis, and calculating actionability criteria define an algorithm (Figure 5A). An intuitive approach to generating algorithms has been using *empirical deterministic* or *stochastic models* recurrent in classical epidemiology. For example, to solve the question: What is the incidence of disease-*y* at time-*t*?, the following algorithm was generated using a stochastic or probabilistic model: $\hat{y} = 20.92 + 0.28x_1 - 0.20x_2 - 0.005x_3 + 0.09x_4 + 0.02x_5 + 0.05x_6$. Where x_1 - x_6 are climate variables measured with specialized equipment (Kuang *et al.*, 2012). In this case and others, using measurements of variables associated with a real problem determines the *empirical* nature of the model (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Coria-Contreras *et al.*, 2015b), as opposed to a *theoretical model* based on preconceived assumptions (Parnell *et al.*, 2017). Estimating parameters (e.g., 20.92, 0.28, etc.) with statistical assumptions establishes its stochastic character. With a systemic web ESS based on big structured data, in addition to this type of *numerical algorithms*, a set of *relational algorithms* is required, that is, those that allow relating categories of metadata for big data management (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d).

Effective data management through user-defined multi-criteria options acquires powerful relevance in visualizing interrelationships among *epidemiological system* components and understanding its effect on pest intensity changes in time and space. The transference of web-based ESS to end-users with different technical profiles has shown that *relational algorithms* better understand functional interrelationships among variables and provide the epidemiological bases to comprehend actionability criteria (CP-LAREF. Unpublished). For example, graphically observing the numerical progression of young coffee leaves

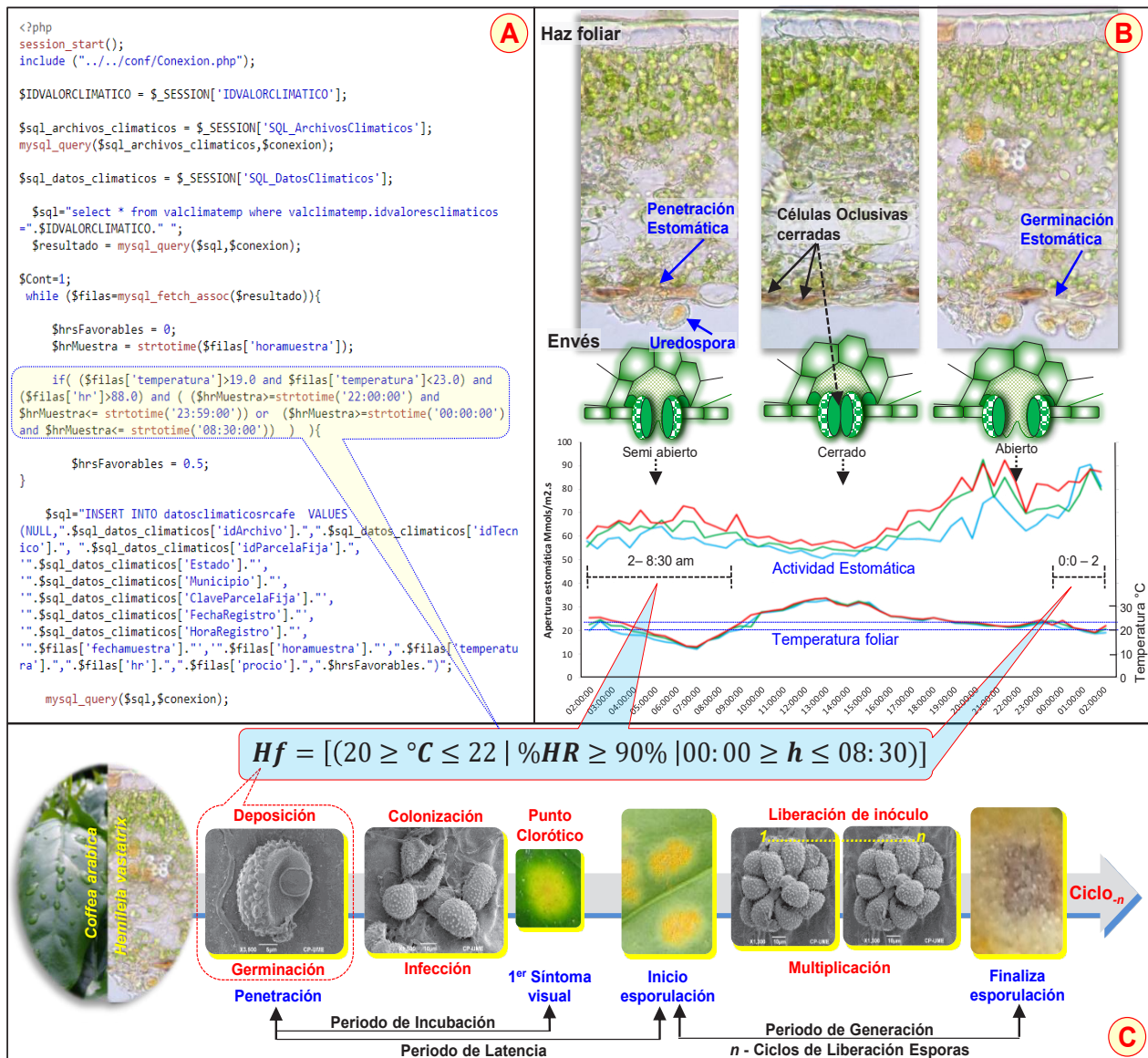


Figura 5. Programación web en PHP de un *algoritmo numérico dinámico* para el cálculo del *número de horas favorables* (H_f) para la germinación de esporas de *H. vastatrix* aplicable en alertas tempranas de focos regionales de roya del café. La sección enmarcada hace referencia al código de programación específico a la función numérica del recuadro azul (A). Actividad estomática y temperatura foliar en *C. arabica* var. Caturra empleada para definir el rango de horas (h)(0-8:30) de estoma abierto para contabilizar horas de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (HR) aptas para la germinación (B). Ciclo de patógenesis de *H. vastatrix*. El recuadro punteado rojo indica la fase seleccionada para estimar riesgos de infección (C).

Figure 5. Web programming in PHP to calculate the number of favorable hours (FH), a *dynamic numerical algorithm*, for spore germination of *H. vastatrix* applicable in early warning of regional outbreaks of coffee rust. The framed section refers to the programming code specific to the numeric function in the blue box (A). Stomata activity and leaf temperature in *C. arabica* var. Caturra used to define the range of hours (h) (0-8:30) of open stoma to count hours of temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (RH) suitable for germination (B). Pathogenesis cycle of *H. vastatrix*. The red dotted box indicates the phase selected for infection risk estimations (C).

es la incidencia de enfermedad- y en un tiempo- t ?, se generó el siguiente algoritmo mediante un modelo estocástico o probabilístico: $\hat{y} = 20.92 + 0.28x_1 - 0.20x_2 - 0.005x_3 + 0.09x_4 + 0.02x_5 + 0.05x_6$. Donde x_1-x_6 son variables de clima medidas con equipo especializado (Kuang *et al.*, 2012). En este caso, el empleo de mediciones de variables asociadas a un problema real determina el carácter *empírico* del modelo (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Coria-Contreras *et al.*, 2015b), en oposición a un *modelo teórico*, el cual se basa en asunciones preconcebidas (Parnell *et al.*, 2017). La estimación de parámetros (i.e., 20.92, 0.28, etc.) con supuestos estadísticos establece su carácter estocástico. Con un SVE sistémico basado en grandes volúmenes de datos se requiere además de este tipo de *algoritmos numéricos*, un conjunto de *algoritmos relacionales*, es decir aquellos que permiten relacionar categorías de metadatos para gestión de grandes bases de datos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d)

La gestión efectiva de datos mediante opciones multi-criterio definidas por el usuario adquiere una poderosa relevancia en la visualización de interrelaciones entre variables asociadas al *sistema epidemiológico* y su efecto en cambios de intensidad de plaga en tiempo y espacio. La transferencia de SVE web a usuarios con diferente perfil técnico ha demostrado que los *algoritmos relacionales* permiten la fácil comprensión de interrelaciones funcionales entre variables y aporta bases epidemiológicas para entender los criterios de accionabilidad (CP-LAREF. No publicado). Por ejemplo, observar gráficamente la progresión numérica de hojas jóvenes de cafeto (*subsistema Planta*) respecto al número de hojas con lesiones causadas por *H. vastatrix* (*subsistema Patógeno*), permite entender la relación tejido susceptible con disponibilidad de inóculo para desencadenar un proceso infectivo. Los algoritmos que posibilitan esto son predominantemente *relacionales* y están condicionados

(*Plant subsystem*) concerning the number of leaves with lesions caused by *H. vastatrix* (*Pathogen subsystem*) allows us to understand the relationship between susceptible tissue and inoculum availability to trigger an infective process. The algorithms that enable this are predominantly *relational* and are conditioned to the proper and planned selection of variables, frequency, and spatial distribution of measurements. ESS support research provides this kind of information (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera, 2016; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mendoza-Ramos *et al.*, 2015a, b). Logically, a *numerical algorithm* must also be programmed to automate decision rules. However, its origin and conception were part of quantitative modeling (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Kuang *et al.*, 2012).

These algorithms are critical in the automation of web-based ESS type 3 due to their direct link with the criterion(s) of actionability or epidemiological alerts. Note that field data, even more acute with real-time transfer with ESS Apps, are dynamic by their very nature. Nevertheless, this is not necessarily represented by the *numerical algorithm*. These can be *dynamic or static* in terms of their numerical structure or due to parameter calculation. A *dynamic* or ‘intelligent’ *numerical algorithm* is mainly based on *epidemic indices* that are desirable due to their sensitivity to detect spatio-temporal changes without depending on absolute parameters, which is the case of a *static numerical algorithm*. These, in general, has a local application and is temporally restricted (i.e., β_i of a model like the one previously described in the form $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \varepsilon$). In PVEF-Cafeto, 20 algorithms based on *epidemic indices* and *indicators* were programmed. For example, the algorithm for calculating the number of hours favorable for *H. vastatrix* infection was based on specific temperature (20-22 °C) and relative humidity

a la pertinente y planeada selección de variables, frecuencia y distribución espacial de mediciones. Líneas de investigación de soporte SVE proporcionan esta de información (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Acevedo-Sánchez and Mora-Aguilera. 2016; Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mendoza-Ramos *et al.*, 2015a, b). Lógicamente, un *algoritmo numérico* también debe programarse para automatizar reglas de decisión en un entorno web. Pero su origen y concepción fue parte de una modelación cuantitativa (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Kuang *et al.*, 2012).

Este tipo de algoritmos son críticos en la automatización de un SVE debido a su vinculación directa con el criterio(s) de accionabilidad o de alerta temprana. Notar que el dato de campo, aún más acentuado por su transferencia en tiempo real con SVE Apps, es dinámico por su propia naturaleza. Pero esto no es necesariamente expresado por un *algoritmo numérico*. Estos pueden ser *dinámicos* o *estáticos* en cuanto a su estructura numérica o al cálculo de parámetros. Un *algoritmo numérico dinámico* o ‘inteligente’ se basa principalmente en *índices epidémicos* los cuales son deseables por su sensibilidad para detectar cambios espacio-temporales sin depender de parámetros absolutos, como es el caso de un *algoritmo numérico estático*. Estos generalmente tienen una aplicación local y temporalmente restringida (i.e., β_i de un modelo como el previamente descrito de la forma $\hat{y} = \beta_o + \beta_i x_i + \epsilon$). En el SVE para café se programaron un total de 20 algoritmos basados en *índices e indicadores epidémicos* (CP-LANREF, No Publicado). Por ejemplo, el algoritmo para el cálculo *número horas favorables* para la infección de *H. vastatrix* se basó en temperatura (20-22 °C) y humedad relativa (> 90%) específicas exhibidas entre las 0:00 y 8:30 am (Santana-Peñaloza *et al.*, 2015) (Figura 5). Estas condiciones constituyen rangos funcionales biológicos asociados a germinación de esporas

(> 90%) exhibited between 0:00 and 8:30 a.m. (Santana-Peñaloza, *et al.* 2015) (Figure 5). These conditions constitute functional biological ranges associated with spore *germination* and stomata *penetration* of the fungus (Figure 5B). Such “early” events of the pathogenesis are suitable for purpose of alerts regarding infection risks (Figure 5B, C). The mechanistic understanding of this process implied determining the pathogenesis cycle, complemented with lesion expansion / uredospore density, in different coffee varieties and thermal regimes (Figure 5C). Additionally, studies were carried out with scanning electron (JSM 6390) and light (40x Carl Zeiss) microscopy to determine the uredospore aerodynamic morphology, its germination process and the stomata density in field plant material (Figure 5B). Thus, Figure 5B shows, in transverse foliar sections of *C. arabica* var. Bourbon, the stomata penetration of the germ tube of the fungus. The graph shows the effective stomata opening hours in var. Caturra (Handheld SC-1 Leaf Porometer) in young (blue line), mature (green) and old (red) leaves in order to specify the leaf-age most receptive to penetration / infection (CP-LANREF. Not Published). This type of research demonstrates the scientific foundation required to support an actionability algorithm. The *holistic-systemic* ESS cannot be intuitive and requires comprehensive research according to the region where it is intended. The automatic result of this algorithm is graphically displayed in the PVEF-Cafeto web interface in the next section.

PVEF-Cafeto did not include any algorithm developed with classical epidemiological models or general probabilistic models based on temporal incidence trends (Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2014e). In contrast, in ESS agave (Table 1), subregional algorithms obtained from an exhaustive analysis of regional historical data using

y penetración estomática del hongo, eventos ‘tempranos’ de la patogénesis aptos con fines de alertas respecto a riesgos de infección (Figura 5B, C). La comprensión mecanística de este proceso implicó determinar el ciclo de patogénesis complementado con expansión de lesión / densidad de uredosporas en diferentes variedades de café y régimen térmicos (Figura 5C). Adicionalmente, se realizaron estudios con microscopía electrónica de barrido (JSM 6390) y compuesto (40x Carl Zeiss) para conocer la morfología aerodinámica de la uredospora, su proceso germinativo y la densidad estomática en material vegetal de campo (Figura 5B). Así, la Figura 5B muestra, en cortes foliares transversales de *C. arabica* var. Bourbon, la penetración estomática del tubo germinativo del hongo. La gráfica exhibe las horas efectivas de apertura estomática determinadas en var. Caturra (Handheld SC-1 Leaf Porometer) en hojas jóvenes (línea azul), maduras (verde) y viejas (rojo) con el fin de precisar la edad foliar más receptiva a la penetración / infección (CP-LANREF. No Publicado). Este tipo de investigación demuestra el fundamento científico requerido para sustentar un algoritmo de accionabilidad. El SVE *holístico-sistémico* no puede ser intuitivo y demanda investigación acorde a la realidad regional donde éste será implementado. El resultado automático de este algoritmo se muestra gráficamente en la interfaz web PVEF-Cafeto en la siguiente sección.

PVEF-Cafeto no incluyó ningún algoritmo desarrollado con modelos epidemiológicos clásicos o modelos probabilísticos generales, basados por ejemplo en la tendencia temporal de incidencia (Mora-Aguilera *et al.*, 2016b; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2014e). En contraste, en SVE para agave se programaron algoritmos sub-regionales obtenidos a partir de exhaustivos análisis de datos históricos regionales (2016-2019) mediante modelos de regresión múltiple ajustados con

multiple regression models adjusted with SAS (Statistical Analyzes System) were programmed for the calculation of agave weevil infestations (*Scyphophorus acupunctatus*, Coleoptera: Curculionidae). The relational for this stochastic modeling was the steady temporal density peaks and local pest spreading (CP-LANREF. Not published). Thus, such an approach is not recommended for highly sensible pests to slight variations on the *epidemiological system*, as in *H. vastatrix* – *C. arabica* (Coria-Contreras *et al.*, 2015b). However, if this approach is required, statistical adjustment of these models can be carried out directly in special web modules, which allows streamlining the temporal recalculation of these algorithms (Kuang *et al.*, 2012). As in the coffee ESS, in agave, *dynamic numerical algorithms* were also included.

Consequently, a web-based ESS is not restrictive in type and number of algorithms. Instead, depending on the systemic complexity of the phytosanitary problem (Figure 2). Another type of algorithms with great potential in web-based ESS, mainly with big structured data, is derived from *automated machine learning* with two main trends: *support vector machines* and *artificial neural networks* (Kaundal *et al.*, 2006). However, the use of these algorithms has been limited and oriented mainly to disease diagnosis and severity assessments (Golhani *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2018).

In the *holistic-systemic* conception, a web-based ESS can be conceived as a complex system of *dynamic modeling programming* where time and space are included in the intrinsic calculations of *n-numerical* and *n-relational* algorithms. It allows to understand and analyze interactions among variables and subsystems of the *epidemiological system* in addition to automatic outputs of early risk alerts or forecasts for regional decision making (Figure 1, 4, and 5).

SAS (Statistical Analyses System), para el cálculo de infestaciones de picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*, Coleoptera: Curculionidae). La racionalidad de estos modelos estocásticos fue la estabilidad temporal de picos poblacionales y la fuerte dispersión local (CP-LANREF. No publicado). Consecuentemente, este enfoque no es recomendable para plagas muy sensibles a variaciones del sistema epidemiológico como en *H. vastatrix* – *C. arabica* (Coria-Contreras *et al.*, 2015b). Operativamente, el ajuste estadístico de éstos modelos puede realizarse directamente en módulos web especiales, lo cual permite dinamizar el recálculo temporal de estos algoritmos (Kuang *et al.*, 2012). Al igual que en SVE cafeto, en agave también se incluyeron algoritmos numéricos dinámicos. Consecuentemente, un SVE web no es restrictivo en tipo y número de algoritmos. Estos dependen de la complejidad sistémica del problema fitosanitario (Figura 2). Otro tipo de algoritmos con gran potencial aplicativo en SVE web, principalmente con datos masivos, se basan en aprendizaje automatizado con dos principales tendencias: máquinas de vector soporte y red neuronal artificial (Kaundal *et al.*, 2006). Sin embargo, estos algoritmos se han limitado y orientado principalmente al diagnóstico de enfermedades y evaluación de severidad foliar (Golhani *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2018).

En la concepción holística-sistémica, un SVE web puede ser concebido como un sistema complejo de modelación - programación dinámica donde tiempo y espacio están incluidos en los cálculos intrínsecos de n -algoritmos numéricos y n -relacionales permitiendo comprender y analizar interacciones entre variables y subsistemas del sistema epidemiológico, además de la generación automática de alertas tempranas de riesgo o pronósticos para tomas de decisiones regionales (Figura 1, 4 y 5).

Epidemiological Surveillance System type 3 applied to coffee rust

Epidemic increase of *Hemileia vastatrix*. The causal agent of coffee rust, *H. vastatrix*, was detected in the 1980's in Mexico. The fungus was established in coffee-growing areas at a sub-endemic level without economic consequences (SENASICA, 2016). However, between 2007 and 2012, the increase in epidemic intensity in Central America and southeastern Mexico alerted the productive coffee sector and NPPOs. In 2012, a regional epidemiological diagnosis evidenced the socioeconomic risk due to the distribution, incidence, and severity of the disease; predominant inventory of *Coffea arabica* varieties susceptible to the fungus; and plantations aged over 20 years with limited agronomic management in an estimated 639,000 ha (SIAP, 2018; Acevedo-Sánchez *et al.*, 2015). With these backgrounds, the Directorate General of Plant Health (DGSV in Spanish) and the Laboratory for Analysis of Phytosanitary Epidemiological Risk of COLPOS (CP-LANREF) conceived a type 3 web-based ESS which was called Program for the Epidemiological and Phytosanitary Surveillance of Coffee (PVEF-Cafeto, in Spanish). The Program was established in 2013 with a strategy of gradual coverage to all coffee growing areas (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). The objectives of the PVEF-Cafeto were: A) Develop a web-based ESS that would allow precision and real-time information on the epidemic status of coffee rust, climatic inductivity, phenology dynamics, and productive management; B) Generate regional models for epidemic risk alerts and epidemiological indicators to design preventive and protective action strategies for decision-makers at the federal,

Sistema de Vigilancia Epidemiológico tipo 3 aplicado a la roya del café

Incremento epidémico de *Hemileia vastatrix*. El agente causal de la roya del café, *H. vastatrix*, se detectó en los 80's en México. El hongo se estableció en zonas cafetaleras a nivel subendémico sin consecuencias económicas (SENASICA, 2016). Sin embargo, entre 2007 y 2012, el incremento de intensidad epidémica en Centroamérica y sureste de México alertó al sector productivo cafetalero y ONPFs. En 2012, un diagnóstico epidemiológico regional evidenció el riesgo socioeconómico debido a la distribución, incidencia y severidad de la enfermedad; inventario predominante de variedades de *Coffea arabica* susceptibles al hongo; y plantaciones envejecidas con edad superior a 20 años con limitado manejo agronómico en un estimado de 639 000 ha (SIAP, 2018; Acevedo-Sánchez *et al.*, 2015). Con este sustento, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y el Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario del COLPOS (CP-LANREF) concibieron un SVE tipo 3 en interfaz web, el cual se denominó Programa de Vigilancia Epidemiológico Fitosanitario del Café (PVEF-Café). El Programa se estableció en 2013 con una estrategia de cobertura gradual a la totalidad de zonas cafetaleras (Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). Los objetivos del PVEF-Café fueron: A) Desarrollar un SVE que permitiera conocer con precisión y en tiempo real el estatus epidémico de la roya del café, inductividad climática, dinámica fenológica y manejo productivo; B) Generar modelos regionales de alertas de riesgo epidémico e indicadores epidemiológicos para diseñar estrategias de accionabilidad *preventiva* y *protectiva* orientadas a tomadores de decisión a niveles federal, estatal y productivo; y C) Incorporar gradualmente

state, and productive levels; and (C) Gradually incorporate *n*-pests of the coffee plant of quarantine and economic importance to support a *holistic-systemic* phytosanitary model with the plant (crop) as the integrating axis of a novel epidemiology system (Figure 1).

Characteristics of the PVEF-Café. The PVEF-Café is a web-based ESS type 3, designed to automate risk management, analysis, and communication processes in a web environment (Mora-Aguilera *et al.*, 2015a, b; Coria-Contreras *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). The classic paradigm of monitoring specific pests was transformed into an integrative and *holistic-systemic* one based on a novel *epidemiological system* with the plant as the production and phytosanitary process (Figure 1 and 6). The ESS was conceived to mitigate the potential impact of coffee rust with predominantly *preventive* regional actions. The PVEF-Café web architecture is multi-modular with public and private access interfaces (Figure 7 and 8).

Public and private web access. The public interface reveals the operational status of the surveillance in real-time (Figure 7A) and the epidemic status of rust through official reports and weekly phytosanitary alerts (Figure 7B). Similarly, protocols, methodological videos, and operational manuals can be freely consulted. This enables technical audits and the eventual harmonization of the ESS with other NPPOs (Figure 7C). The private interface allows accredited users to view automatic subregional maps and graphs with the highest epidemic risk in a period-*i* or configure queries generating specific spatial and/or temporal outputs.

n-plagas del café de importancia cuarentenaria y económica para sustentar un modelo holístico-sistémico fitosanitario con la planta (cultivo) como eje integrador de un novel *sistema epidemiológico*.

Características del PVEF-Cafeto. El PVEF-Cafeto es un SVE web tipo 3, diseñado para automatizar procesos de gestión, análisis y comunicación de riesgos en un entorno Web (Coria-Contreras *et al.*, 2015a; Mora-Aguilera *et al.*, 2015a, b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014d). El paradigma clásico del monitoreo de plagas específicas se transformó a uno integrador *holístico-sistémico* con base en un *sistema epidemiológico* con el cultivo como eje central del proceso productivo y fitosanitario (Figura 1 y 6). El SVE se concibió para mitigar el impacto potencial de la roya de café con acciones regionales predominantemente *preventivas*. La arquitectura web del PVEF-Cafeto es multimodular con interfaces de acceso público y privado (Figuras 7 y 8).

Acceso web público y privado. La interfaz pública trasparencia el estatus operativo de la vigilancia en tiempo real (Figura 7A) y la condición epidémica de la roya por medio de reportes oficiales y alertas fitosanitarias semanales (Figura 7B). Similarmente, pueden consultarse libremente protocolos, videos metodológicos y manuales operativos. Esto posibilita auditorías de carácter técnico y la eventual armonización del SVE con otros ONPF (Figura 7C). La interfaz privada permite a usuarios acreditados visualizar mapas y gráficas subregionales automáticas con el mayor riesgo epidémico en un periodo-*i* o configurar consultas específicas que generan gráficas espaciales y/o temporales.

Instrumentos de Vigilancia en la sección privada: Mapas. La Figura 8 ilustra el módulo de *Instrumentos de Vigilancia*, el cual automáticamente muestra espacialmente la **Condición Fitosanitaria**

Surveillance Instruments in private section: Maps. Figure 8 illustrates the *Surveillance Instruments* module, which automatically shows spatially the **Phytosanitary Condition** of Veracruz, one of the most important Mexican coffee states, with municipal divisions colored by the level of damage caused by coffee rust on a scale of 0 - 70% (**Classes**) (Figure 8A). The lack of orange or red color indicates that there are no subregions that require mitigation actions in the current stage of the production cycle since the maximum average severity range was 4 - 15%. Areas that require and implement rust mitigation can be viewed in the **RCA** option (Regional Control Areas). The correct box is a pest selector that changes the map accordingly (Figure 8A). Other custom options are shown in the top menu.

Surveillance Instruments in private section: Temporal dynamics. In Figure 8B, the municipalities of Veracruz that are most inductive to coffee rust (Tepetlán, Teocelo, and Altotonga) at the current stage of the production cycle are automatically shown with temporal traceability to previous cycles (2016-2021). The red bars in the lower box represent at weekly/month interval the *number of favorable hours* (FH) for *H. vastatrix* infection associated with the epidemic process of the most inductive municipality (Teocelo) (Figure 8C), automatically calculated with a *dynamic numerical algorithm* (Figure 5). Below FH bars, actual continuous temperature and relative humidity (blue line) can also be exhibited upon selection. This climatic data is obtained from coffee field sensors strategically distributed in a subregion. Ellipses and superimposed red arrows represent the exploratory association of differential inductive epidemic effect of a sustained interval of FH between May and August, with an increase in rust severity in Teocelo between August and late



Figura 6. Subsistemas *Planta - Plaga* asociado a PVEF-Cafeto (Figura 7). La *Planta* de cafeto constituye el eje de integración fitosanitaria y es el centro del novel *Sistema Epidemiológico* propuesto para SVE tipo 3 (Figura 1). Línea punteada exterior azul resalta las plagas de importancia cuarentenaria de interés para México. La línea punteada negra destaca plagas prevalentes de importancia económica. PVEF-Cafeto permite vigilar cambios de intensidad epidémica / incursión de patógenos, nematodos, insectos y ácaros acorde con el enfoque SVE *holístico-sistémico* aplicado a la *prevención* y *protección* de plagas.

Figure 6. *Plant - Pest* subsystems associated with PVEF-Cafeto (Figure 7). The coffee *Plant* constitutes the axis of phytosanitary integration, and the center of the novel *Epidemiological System* proposed for ESS type 3 (Figure 1). Blue outer dotted line highlights pests of quarantine importance of interest to Mexico. The black dotted line highlights prevalent pests of economic importance. PVEF-Cafeto allows surveillance of epidemic intensity changes / incursion of pathogens, nematodes, insects and mites according to a *holistic-systemic* ESS approach applied to pest *prevention* and *protection*.

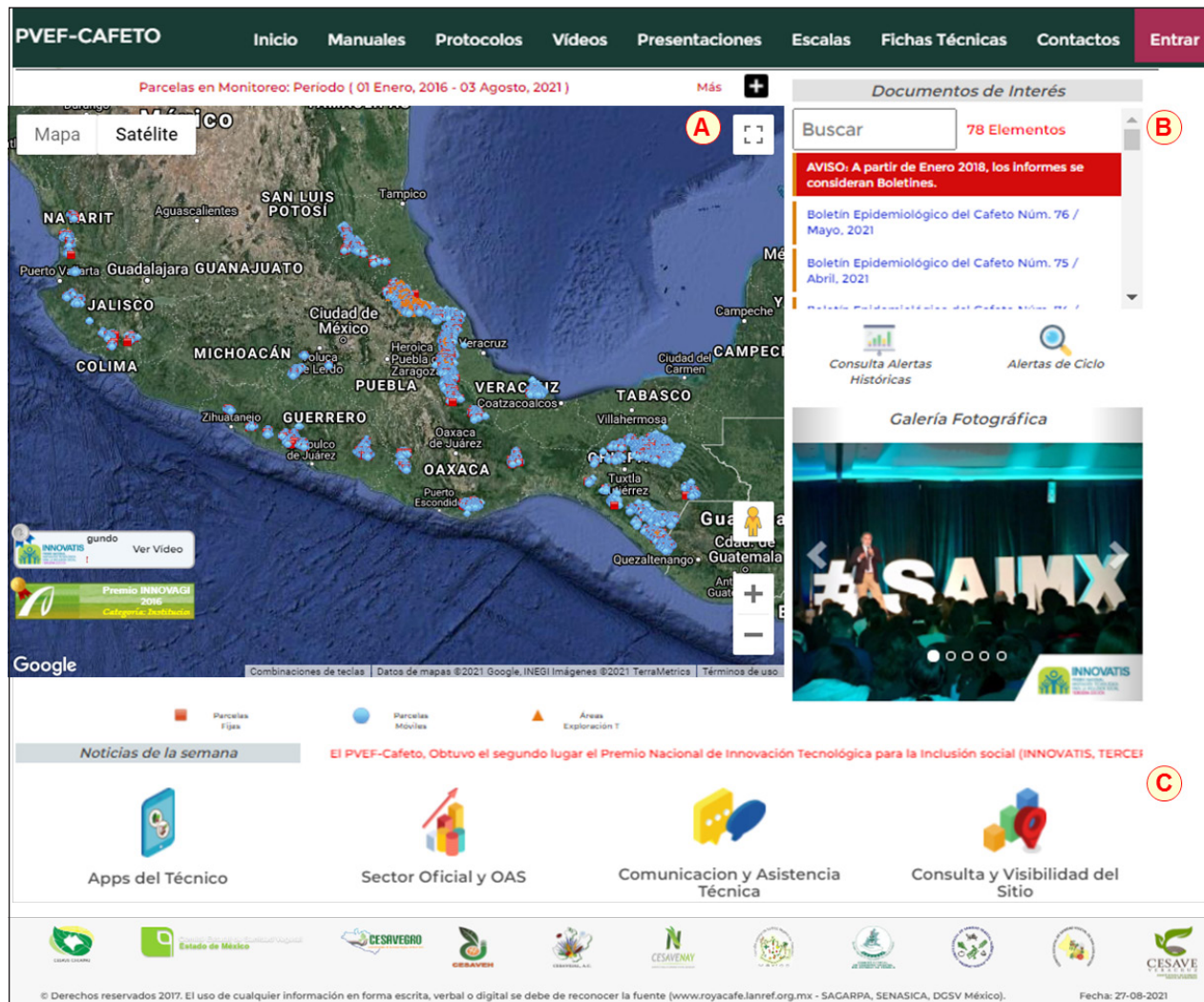


Figura 7. Interfaz web para visualizar información de interés público del Programa de Vigilancia Epidemiológico del Cafeeto (PVEF-Cafeto). Sección de representación del estatus en tiempo real del muestreo (puntos azules) y monitoreo (puntos rojos) sincrónico de plagas del cafeeto (Figura 6). El usuario puede personalizar el mapa con opciones del menú 'Mas +' (A). Sección de consulta de comunicación de riesgos: Boletines epidemiológicos y Alertas fitosanitarias. En recuadro inferior se indican algunos elementos informativos dinámicos de tipo operativo, metodológico y fitosanitario (B). Sección especializada para personal responsable del muestreo y monitoreo en campo, oficiales ONPF e investigadores acreditados (C).

Figure 7. Web interface for viewing information of public interest from the Coffee Epidemiological Surveillance Program (PVEF-Cafeto). Section shows real-time synchronic sampling status (blue points) and monitoring (red points) of coffee pests (Figure 6). The user can customize the map with options of the menu 'Mas +' (A). Query section for risk communication releases: Epidemiological bulletins and phytosanitary alerts. Some informational elements of operational, methodological, and phytosanitary nature are indicated in lower dynamic boxes (B). Specialized section for those responsible for sampling and monitoring in the field, ONPF's officials, and accredited researchers (C).

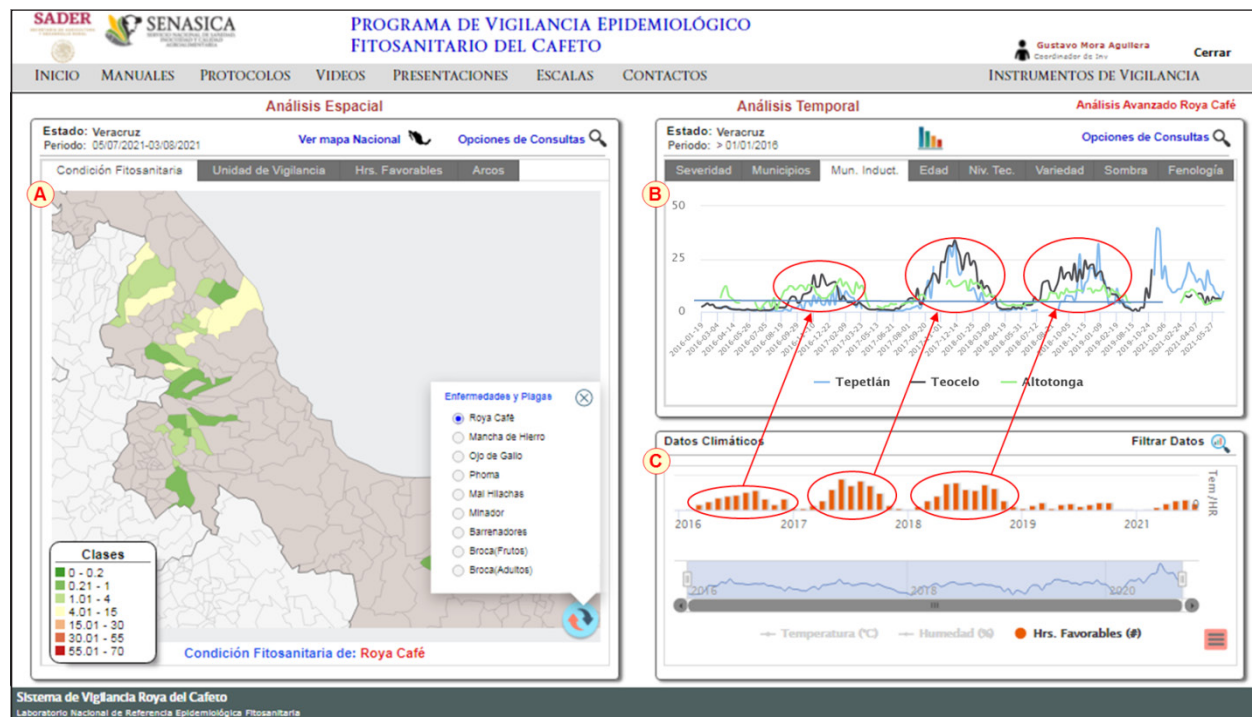


Figura 8. Interfaz web para consulta privada de módulos avanzados de análisis epidemiológicos automatizados en PVEF-Cafeto. Se visualiza el módulo de *Instrumentos de Vigilancia*. Sección *espacial* con *Opciones de Consulta* personalizada espacio-tiempo, tipo de plaga y escala de daño para generar mapas estatales o nacionales de riesgo-prevalencia (A). Sección *temporal* con *Opciones de Consulta* análogas (B) y Sección *temporal* de monitoreo climático para cálculo de algoritmos de inductividad (C), (Figura 5). Otras explicaciones generales del menú superior en Figura 7.

Figure 8. Web interface for private consultation of advanced modules for automated epidemiological analyses in PVEF-Cafeto. The *Surveillance Instruments* module is displayed. *Spatial* section with custom space-time, pest type, and damage scale query options to generate state or national risk-prevalence maps (A). *Temporal* section has options for analogous queries (B) and the *Temporal* section of climate monitoring for calculating inductivity algorithms (C), (Figure 5). Other general *menu* explanations on Figure 7.

de Veracruz, uno de los estados cafetaleros mexicanos más importantes, con divisiones municipales coloreados por nivel de daño, causado por la roya del café en una escala de 0 - 70% (**Clases**) (Figura 8A). Ausencia de color naranja o rojo indica que no existen subregiones que requieran acciones de mitigación al estatus actual del ciclo productivo ya que el rango de severidad promedio máximo es de 4 - 15% (amarillo). Áreas que requieren y realizan mitigación para roya se pueden visualizar en la opción **Arcos** (Áreas Regionales de Control). El

December (maximum), in three coffee productive cycles. The time lag represents the effect of incubation and latency period (*lag*) on the fungus infection (Figure 5). Data and graphs can be exported to generate user customize reports.

Analytical algorithms. Descriptive analyses are automatically generated with *relational algorithms* and allow for online epidemiological diagnoses and advanced reports. Rust alerts, at weekly intervals, are intended to determine

recuadro derecho es un selector de plaga que cambia concordantemente el mapa (Figura 8A). Otras opciones personalizadas se muestran en menú superior.

Instrumentos de Vigilancia en la sección privada: Dinámicas temporales. En la Figura 8B, automáticamente se muestran los municipios de Veracruz más inductivos a la roya del cafeto (Tepetlán, Teocelo y Altotonga) al avance del ciclo productivo actual con trazabilidad temporal a ciclos previos (2016-2021). Las barras rojas del recuadro inferior representan a intervalo semanal/mensual el *número de horas favorables* (HF) para infección de *H. vastatrix* asociado al proceso epidémico del municipio más inductivo (Teocelo) (Figura 8C), calculados automáticamente con un *algoritmo numérico dinámico* (Figura 5). Bajo las barras HF, líneas continuas (azul) de temperatura y humedad relativa pueden opcionalmente mostrarse. Estos insumos climáticos son generados a partir de sensores a nivel de plantaciones de café estratégicamente distribuidos en una subregión. Elipses y flechas roja sobrepuestas representan la asociación exploratoria del efecto diferencial inductivo epidémico de un intervalo sostenido de HF entre mayo-septiembre con un incremento de severidad de roya en Teocelo entre mitad de agosto y finales de diciembre (nivel máximo) en tres ciclos productivos de café. El desfasamiento de tiempo representa el efecto del periodo de incubación y latencia (*lag*) en la infección del hongo (Figura 5). Los datos y gráficas pueden ser exportables para generar reportes personalizados.

Algoritmos analíticos. Los análisis descriptivos son generados automáticamente con *algoritmos relacionales* y permiten realizar diagnósticos epidemiológicos en línea y elaborar reportes avanzados. Las alertas a roya, a intervalos semanales, tienen

differentiated risks, at the municipality level, in the formation of regional foci; typify the epidemic process as an *early* or *late* focus, or as an *active* epidemic (regional dispersion); and define the actionability criteria for mitigation with *preventive* or *protective* products previously evaluated (Mendoza-Ramos *et al.*, 2015b). Risk analyses, also automated, are generated with *dynamic quantitative algorithms* (Figure 5).

Continuous innovation. PVEF-Cafeto, an ESS type 3, had a dynamic and continuous scientific-technological innovation. Thus, as examples, algorithm adjustments were made for the gradual integration of 10 pests of economic importance and nine under quarantine to monitor a total of 19 pests (Figure 6). A regional monitoring module of varietal resistance to *H. vastatrix* was integrated, and the module to calculate favorable hours of climatic inductivity was optimized to include *n*-pests, such as the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae). These pests can also be analyzed online with criteria analogous to rust. A PVEF-Cafeto multi-pest conferred integrality technological, optimized general resources, and was highly influential in the traceability of phytosanitary risks.

Implementation and operability. PVEF-Cafeto operated from 2013 to 2019 through duly trained technical personnel from the Plant Health State Committees (CESV in Spanish), contributing to the NPPO. It ended once the coffee rust problem was regionally mitigated in 11 coffee-producing states, but it keeps its historical databases on the webserver. It included a total of 240 municipalities selected with criteria of epidemic inductivity (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2016), which represented 85% of the country's coffee-growing area. The management of regional foci of rust showed its

como propósito determinar riesgos diferenciados, a nivel municipio, en la conformación de focos regionales; tipificar el proceso epidémico como foco temprano o tardío, y epidemia activa (dispersión regional); y definir los criterios de accionabilidad para mitigación con productos *preventivos* y/o *protectivos* previamente evaluados en campo (Mendoza-Ramos *et al.*, 2015b). Estos análisis de riesgo, también automatizados, se generan con *algoritmos cuantitativos dinámicos* (Figura 5).

Innovación continua. PVEF-cafeto, en concordancia con un SVE tipo 3, tuvo un desarrollo de innovación científica-tecnológica dinámica y continua. Así, por ejemplo, se realizaron adecuaciones de algoritmos para gradual integración de 10 plagas de importancia económica y nueve cuarentenarias para vigilar un total de 19 plagas (Figura 6); se integró un módulo de monitoreo regional de la resistencia varietal a *H. vastatrix*; y se optimizó el módulo para cálculo de horas favorables de inductividad climática de *n*-plagas insectiles como la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae). Estas plagas también pueden ser analizadas en línea con criterios análogos a la roya. La condición multiplaga de PVEF-cafeto confirió integralidad tecnológica, optimizó recursos generales y fue altamente efectivo en trazabilidad de riesgos fitosanitarios.

Implementación y operatividad. PVEF-Cafeto operó de 2013 a 2019 mediante personal técnico debidamente capacitado de Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV), entidad coadyuvante del ONPF. Finalizó una vez que se logró mitigar regionalmente el problema de roya del café en 11 entidades productoras de café, pero conserva sus bases de datos históricas en servidor web. Incluyó un total de 240 municipios seleccionados con criterios de inductividad epidémica (Acevedo-Sánchez y Mora-Aguilera 2016), los cuales representaron el

effectiveness by gradually reducing the leaf severity and prevalence regarding the 2013 outbreak (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2015), reaching since 2017 low epidemic intensity levels. Thus the state average in June 2017 exhibited 8% plant severity and 5% leaf severity. Subregionally (municipality), there was 20% ($\pm 8\%$) of average plant severity and 6% ($\pm 3\%$) of leaf severity. The epidemic trends of the most inductive municipalities, in general, remained constant with low levels (severity $<5\%$). No additional pests had actionable risk levels, and any pests of quarantine interest were detected during the referred period. However, the digital architecture and operational model of PVEF-Cafeto allows its rapid reactivation (1-3 months) in the event of any phytosanitary emergency. Thus, from the 2020 production cycle to the present, PVEF-Cafeto operates for preventive purposes in Veracruz with 12 technicians attached to the CESV and the technical-scientific support from CP-LANREF. The PVEF-Cafeto has structured big phytosanitary data with 15,773,140 records comprised of 199,660 field evaluations, including pest damage, phenology, and agronomical managements weekly/biweekly intervals; and 87,469,624 climatic records from Temperature / RH sensors established *in situ*. This big structured data is the basis for phytosanitary management in time-space, establishing actionable criteria and generating phytosanitary alerts at different time horizons (Figure 7 and 8). PVEF-Cafeto was awarded for its technological-scientific innovation by the National Council of Science and Technology of Mexico CONACYT (INNOVATIS 2018) and the Inter-American Institute for Cooperation in Agriculture IICA (INNOVAGRO, 2016).

PERSPECTIVES

In its *holistic-systemic* conception, epidemiological surveillance represents the future

85% de la superficie cafetalera del país. El manejo de focos regionales de la roya mostró su efectividad al reducir gradualmente severidad foliar y prevalencia respecto al brote 2013 (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2015), lográndose desde 2017 niveles de baja intensidad epidémica. Así, el promedio estatal en junio 2017 exhibió 8% de severidad en planta y 5% de severidad foliar. Subregionalmente (municipal), se tuvo un 20% ($\pm 8\%$) de severidad en planta promedio y 6% ($\pm 3\%$) de severidad foliar. Las tendencias epidémicas de los municipios más inductivos, en general se mantuvieron constantes con niveles bajos (Severidad $< 5\%$). Ninguna plaga adicional tuvo niveles de riesgo accionables y no se detectaron plagas de interés cuarentenario durante el periodo referido. Sin embargo, la arquitectura digital y modelo operativo de PVEF-Cafeto permite su rápida reactivación (1-3 meses) ante una emergencia fitosanitaria. Así, del ciclo productivo 2020 al presente, PVEF-Cafeto opera con fines preventivos en Veracruz con 12 técnicos adscritos al CESV y con soporte técnico-científico de CP-LANREF. El PVEF-cafeto posee un gran volumen de datos fitosanitarios con 15,773,140 registros provenientes de 199,660 evaluaciones de campo, incluyendo daño de plagas, fenología y manejo agronómico, a intervalos semanales y quincenales; y 87,469,624 registros climáticos provenientes de sensores de Temperatura / HR establecidos *in situ*. Este 'big-data' estructurado es base para la gestión fitosanitaria en tiempo-espacio, establecer criterios de accionabilidad y generar alertas fitosanitarias a diferentes horizontes de tiempo (Figura 7 y 8). PVEF-Cafeto fue premiado por su innovación técnico-científica por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, CONACYT (INNOVATIS, 2018), y por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA (INNOVAGRO, 2016).

of plant health applied to risk mitigation. The speed of epidemic processes at a global level has escalated in time and space. Classic field management is becoming less efficient and profitable in environmental terms and productive assets, forcing regional strategies. Mobility and increased pest density pressure due to productive and commercial activities, human passage, variability, and climate change (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017; Mora Aguilera *et al.*, 2014a, b, c), as well as the social demand for safe food production, lower carbon footprint and traceability of the environmental impact, will constitute the complex operational phytosanitary framework. Web-based ESS type 3, due to its *holistic-systemic* conception, support in decision algorithms, and predominantly *preventive* purpose, embraces the most suitable option to face these challenges. Type 1 and 2 epidemiological surveillance will continue in force but with an impact limited to the regulatory framework. Advances in digital technology have revolutionized the acquisition, management, and use of phytosanitary data, enabling the development and implementation of web-based ESS applied to regional management of phytosanitary risks (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora Aguilera *et al.*, 2014d). The optimization, harmonization, and quality indicators of all the processes intrinsic to a comprehensive ESS are equally feasible (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). However, the perspectives will be limited by classical scientific views, fragmented production models, and traditional phytosanitary policies. The adoption of new phytosanitary paradigms and scientific-technological innovation will determine the future of *holistic-systemic* ESS. For instance,

PERSPECTIVAS

La *vigilancia epidemiológica*, en su concepción *holística-sistémica*, representa el futuro de la fitosanidad aplicada a la mitigación de riesgos. La velocidad de procesos epidémicos a nivel global ha escalado en tiempo y espacio. Los manejos parcelarios clásicos son cada vez menos eficientes y rentables en términos ambientales y de activos productivos obligando a la búsqueda de estrategias regionales. La movilidad e incremento de carga de plagas por la actividad productiva y comercial, trasiego humano, variabilidad y cambio climático (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Carbajal-Yepez *et al.*, 2019; Parnell *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, b, c); así como la exigencia social por una producción inocua de alimentos, menor huella de carbono y trazabilidad del impacto ambiental constituirán el complejo marco operativo de la fitosanidad. Los SVE tipo 3 base web, por su concepción *holística-sistémica*, soporte en algoritmos de decisión y propósito predominantemente preventivo, constituye la opción más idónea para enfrentar estos retos. La vigilancia epidemiológica tipo 1 y 2 seguirá vigente, pero con impacto acotado al marco normativo. Claramente, los avances de la tecnología digital han revolucionado la adquisición, manejo y uso de datos fitosanitarios posibilitando el desarrollo e implementación de SVE web aplicados al manejo regional de riesgos fitosanitarios (Coria-Contreras *et al.*, 2019; Mora aguilera *et al.*, 2014d). La optimización, armonización e indicadores de calidad de todos los procesos intrínsecos a un SVE integral son igualmente factibles (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). Las perspectivas estarán, sin embargo, acotadas por visiones científicas clásicas, modelos productivos fragmentados y políticas fitosanitarias tradiciones. La adopción de nuevos paradigmas fitosanitarios y la innovación

classical epidemiology focused on studies at limited farm production units; the *epidemiological triangle* or *tetrahedron* adoption; and the conception of damage dependent solely on infectious processes constitute restrictive premises that are not compatible with an ESS focused on crop health in the broad productive sense.

CONCLUSIONS

In 1975, Krause and collaborators predicted that: *'The future in plant disease prediction will perhaps be centralized national, regional, or state facilities, equipped with data processing machinery linked to remote data acquisition units. These facilities could monitor environmental parameters and process data for diseases, pests, and growing conditions on many crops. Such a network could make disease predictions, issue warnings, and perhaps make definitive disease control recommendations as they are necessary'*. Spurred on by the digital revolution, this foresight has been clearly demonstrated. Successful web-based ESS type 3 cases operated by NPPOs, RPPOs, and producer associations have shown the assertiveness of space-scaled digital phytosanitary management. However, strong scientific-technological innovation challenges still prevail with pertinent normative and operational frameworks. Due to its *holistic-systemic* and *preventive* nature, a web-based ESS type 3 emphasizes the crop's health under a sustainable and resilient approach. The *protection* principle as understood with the classical view of intervening an epidemic to decrease its intensity, i.e., its epidemic rate, is subordinated to the *preventive* principle optimized through economic-biological decision thresholds. Digital technology is a vital component of innovation, but it does not define the success

científica-tecnológica determinarán el futuro de la VE. Por ejemplo, la epidemiología clásica enfocada a estudios en unidades productivas parcelarias; adopción del *triángulo o tetraedro epidemiológico*; y la concepción del daño dependiente únicamente de procesos infecciosos, constituyen premisas restrictivas. No compatibles con SVE enfocados a la salud de cultivos en el amplio sentido productivo.

CONCLUSIONES

En 1975, Krause y colaboradores predijeron que: *'The future in plant disease prediction will perhaps be centralized national, regional, or state facilities, equipped with data processing machinery linked to remote data acquisition units. These facilities could monitor environmental parameters and process data for diseases, pests, and growing conditions on many crops. Such a network could make disease predictions, issue warnings, and perhaps make definitive disease control recommendations as they are necessary'*. Incentivada por la revolución digital, esta previsión ha quedado claramente demostrada. Casos exitosos de SVE tipo 3 base web operados por ONPFs, ORPFs y asociaciones de productores han mostrado la asertividad de un manejo fitosanitario digital escalado en espacio. Sin embargo, aún prevalecen fuertes retos de innovación científica-tecnológica con marcos normativos y operativos pertinentes. Por su naturaleza sistémica y preventiva, un SVE tipo 3 enfatiza la salud del cultivo bajo un enfoque sustentable y resiliente. El principio de *protección*, entendido con el enfoque clásico de intervenir una epidemia para disminuir su intensidad, i.e., su tasa epidémica, queda subordinado al principio *preventivo* optimizado mediante umbrales económico-biológicos de decisión. La tecnología digital es un fuerte componente de innovación, pero no define el éxito de

of an Epidemiological Surveillance Program. The *holistic-systemic* epidemiological conception of the phytosanitary problem focused on the crop's health, understood and validated in the field by interdisciplinary teams, determines the applicability and relevance of a comprehensive ESS.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Directorate General of Plant Health of SENASICA for the financial support to develop and provide the technical-scientific support to PVEF-Cafeto. To the technical staff of the State Plant Health Committees of Chiapas, Puebla, Veracruz, SLP, Guerrero, Colima, Nayarit, Oaxaca, Hidalgo, Querétaro, Jalisco and Edo. de Mexico, for their professionalism and commitment in the operation of the PVEF-Cafeto. And to Miranda Mora for her assistance on the English translation. To coffee producers who, without any restriction, allowed access to their properties. To COLPOS to support the execution of PVEF-Cafeto project.

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

un Programa de Vigilancia Epidemiológico. La concepción epidemiológica *holística-sistémica* del problema fitosanitario enfocado a la salud del cultivo, comprendido y validado en el campo por equipos interdisciplinarios, determina la aplicabilidad y pertinencia de un SVE integral.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA por el apoyo financiero para desarrollar y aportar el sustento técnico-científico de PVEF-Cafeto. Al personal técnico de Comités Estatales de Sanidad Vegetal de Chiapas, Puebla, Veracruz, SLP, Guerrero, Colima, Nayarit, Oaxaca, Hidalgo, Querétaro, Jalisco y Edo. de México, por su profesionalismo y

compromiso en la operación del PVEF-Cafeto. Por la asistencia en traducción al inglés a Miranda Mora. A productores de café que sin restricción permitieron el acceso a sus predios. A COLPOS por el soporte para la ejecución del proyecto PVEF-Cafeto.

## LITERATURA CITADA

- Aanensen DM, Huntley DM, Feil EJ, al-Own FA and Spratt BG. 2009. EpiCollect: Linking smartphones to web applications for epidemiology, ecology and community data collection. *Plos one* 4(9): e6968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006968>
- Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, López-Bautista V, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L y Mora-Aguilera G. 2017. Criterios epidemiológicos para implementar una red de monitoreo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en regiones agaveras de Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35S: 176-177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Acevedo-Sánchez G y Mora-Aguilera G. 2016. Desarrollo de REG-N Café v1.0 para determinar n-sitios de monitoreo-muestreo regional de roya del café en México usando criterios epidemiológicos ponderados. In. 49º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 29 agosto–01 septiembre. Alagoas, Maceio, Brasil.
- Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, López-Muratalla Y, González-Gómez R y López-Buenfil A. 2015. Vulnerabilidad epidemiológica, productiva y socioeconómica en la cadena productiva del café en Chiapas, Veracruz y Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33S: 120. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Carvajal-Yepes M, Cardwell K, Nelson A, Garrett KA, Giovani B, Saunders DGO, Kamoun S, Legg JP, Verdier V, Lessele J, Neher RA, Day R, Pardey P, Gullino ML, Records AR, Bextine B, Leach JE, Staiger S and Tohme J. 2019. A global surveillance system for crop diseases. *Science* 364 (6447): 1237-1239. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1572>
- Casacuberta D. 2013. Innovación, big data y epidemiología. *Revista Iberoamericana de Argumentación* 7: 1-12. <https://revistas.uam.es/ria/article/view/8176/8515>
- Chiavegatto ADP. 2015. Uso de big data em saúde no Brasil: perspectivas para um futuro próximo. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 24(2): 325-332. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000200015>
- Coakley SM, McDaniel LR and Shaner G. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75: 1245-1251. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n11\\_1245.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n11_1245.PDF)
- 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://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L y Mora-Aguilera G. 2015a. APLI-K v1.0: Sistema automatizado para la planeación de aplicación de productos químicos contra roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 33S: 121. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen332015/Suplemento332015FULL.pdf>
- Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G y Martínez-Bolaños M. 2015b. Modelos de pronóstico de ocurrencia regional de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en el Soconusco Chiapas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33S: 121. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen332015/Suplemento332015FULL.pdf>
- De Wolf ED and Isard SA. 2007. Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annual Review of Phytopathology* 45: 203-220. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143329>
- Drew DA, Nguyen LH, Steves CJ, Menni C, Freydin M, Varsavsky T, Sudre CH, Cardoso MJ, Ourselin S, Wolf J, Spector TD, Chan AT and Consortium C. 2020. Rapid implementation of mobile technology for real-time epidemiology of COVID-19. *Science* 368: 1362-1367. <https://doi.org/10.1126/science.abc0473>
- Firanj Sremac A, Lalić B, Marčić M and Dekić L. 2018. Toward a weather-based forecasting system for fire blight and downy mildew. *Atmosphere* 9(12): 1-17. <https://doi.org/10.3390/atmos9120484>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kukc E, López-Arroyo JJ, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanlongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101: 1119-112. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Golhani K, Balasundram SK, Vadamalai G and Pradhan B. 2018. A review of neural networks in plant disease detection using hyperspectral data. *Information Processing in Agriculture* 5(3): 354-37. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2018.05.002>
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado O, 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* 35S: 184. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN\\_35\\_SUPLEMENTO\\_2017.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN_35_SUPLEMENTO_2017.pdf)
- Huber L and Gillespie TJ. 1992. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. *Annual Review of Phytopathology* 30: 553-577. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.30.090192.003005>
- Kang WS, Hong SS, Han YK, Kim KR, Kim SG and Park EW. 2010. A web-based information system for plant disease forecast based on weather data at high spatial resolution. *The Plant Pathology Journal* 26(1): 37-48. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.1.037>

- Kaundal R, Kapoor AS and Raghava GPS. 2006. Machine learning techniques in disease forecasting: a case study on rice blast prediction. BMC Bioinformatics 7:485. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-485>
- Kim HS, Do KS, Park JH, Kang WS, Lee YH and Park EW. 2020. Application of numerical weather prediction data to estimate infection risk of bacterial grain rot of rice in Korea. Plant Pathology Journal 36(1): 54-66. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2019.0281>
- Krause RA, Massie LB and Hyre RA. 1975. Blitecast: a computer forecast of potato late blight. Plant Disease Reporter 59(2): 95-98. <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=chi.23661187&view=1up&seq=112>
- Kuang W, Liu W, Ma Z and Wang H. 2012. Development of a web-based prediction system for wheat stripe rust. Pp. 324-335. In: 6th Computer and Computing Technologies in Agriculture (CCTA), Oct 2012, Zhangjiajie, China. <https://hal.inria.fr/hal-01348115/document>
- 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(1): 79-106. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092020000100105&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092020000100105&script=sci_arttext&tlng=en)
- Ma J, Du K, Zheng F, Zhang L, Gong Z and Sun Z. 2018. A recognition method for cucumber diseases using leaf symptom images based on deep convolutional neural network. Computers and Electronics in Agriculture 154: 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.08.048>
- Madden L, Pennypacker SP and MacNab AA. 1978. FAST, a forecast system for *Alternaria solani* on tomato. Phytopathology 68: 1354-1358. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n09\\_1354.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n09_1354.pdf)
- Magarey RD and Isard SA. 2017. A Troubleshooting guide for mechanistic plant pest forecast models. Journal of Integrated Pest Management 8(1): 1-7 <https://doi.org/10.1093/jipm/pmw015>
- 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. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v39n1/2007-8080-rmfi-39-01-94-en.pdf>
- Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G y Mora-Aguilera G. 2015a. Comportamiento aerobiológico de esporas de *Hemileia vastatrix* en la región nororiental de Puebla-Veracruz. Revista Mexicana de Fitopatología 33S: 238. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen332015/Suplemento332015FULL.pdf>
- Mendoza-Ramos C, Jiménez-González LR, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Martínez-Bolaños M y Mora-Aguilera G. 2015b. Efecto de ingrediente activo y dosis en la esporulación y expansión de lesión de *Hemileia vastatrix*. Revista Mexicana de Fitopatología 33S: 135. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen332015/Suplemento332015FULL.pdf>
- Mora-Aguilera G, Cortez-Madrigal H and Acevedo-Sánchez G. 2017. Epidemiology of entomopathogens: Basis for rational use of microbial control of insects. Southwestern Entomologist 42(1): 153-169. <https://doi.org/10.3958/059.042.0116>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Santana-Peñaloza B, González-Gómez R, López-Buenfil A, López-Javier M y Carranza P. 2016a. Criterios epidemiológicos de accionabilidad regional para control de la roya del café en México. Revista Mexicana de Fitopatología 34S: 23. [https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Suplemento\\_34\\_2016.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Suplemento_34_2016.pdf)
- Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Martínez-Bolaños M, Acevedo-Sánchez G y Santana-Peñaloza B. 2016b. Gradientes regionales de dispersión de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en el Soconusco, Chiapas, México. In. 49º Congreso Brasileiro de Fitopatología. 29 agosto - 01 septiembre. Alagoas, Maceio, Brasil.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, González-Gómez R, López-Buenfil A y Javier-López MA. 2015a. Alertas tempranas regionales para manejo de focos de roya del café en México. Revista Mexicana de Fitopatología 33S: 64. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ, López-Muratalla Y, López-Buenfil A y González-Gómez R. 2015b. C@FE-RISK v1.0: Simulador de riesgos regionales fitosanitarios, epidemiológicos y productivos en la cadena productiva del café en México. Revista Mexicana de Fitopatología 33S: 119. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Calderón-Estrada G, Flores-Sánchez J, Domínguez-Monje S, Baker P and González-Gómez R. 2014a. Epidemiological considerations of climate change on tropical crops health. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 147-167. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092014000200147&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092014000200147&script=sci_arttext&tlng=en)
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salín C, Flores-Olivas A, González-Gómez R and Robles-García P. 2014b. Epidemiological surveillance and current status of coconut lethal yellowing, potato purple top and citrus huanglongbing (HLB) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 120-131. [https://www.researchgate.net/publication/300533174\\_Epidemiological\\_Surveillance\\_and\\_Current\\_Status\\_of\\_Coconut\\_Lethal\\_Yellowing\\_Potato\\_Purple\\_Top\\_and\\_Citrus\\_Huanglongbing\\_HLB\\_in\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/300533174_Epidemiological_Surveillance_and_Current_Status_of_Coconut_Lethal_Yellowing_Potato_Purple_Top_and_Citrus_Huanglongbing_HLB_in_Mexico)
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JL, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge D and González-Gómez R. 2014c. Current situation and perspectives in management of citrus HLB. Mexican Journal of Phytopathology 32(2): 108-119. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge D, Coria-Contreras JJ, Hernández-Hernández E, González-Gómez R, López-Buenfil A, Sánchez-Anguiano H, García-

- Feria J, Trujillo-Arriaga J, López-Pérez E, Méndez-Ramos A, Matuz-Conde J and Martínez-Bolaños M. 2014d. Epidemiological surveillance system for coffee rust disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: A regional approach. In: The 25th International Conference on Coffee Science. 8-13 Septiembre. Armenia, Colombia. 1-6pp. [https://www.researchgate.net/publication/306347540\\_Epidemiological\\_Surveillance\\_System\\_for\\_Coffee\\_Rust\\_Disease\\_Hemileia\\_vastatrix\\_in\\_Mexico\\_A\\_Regional\\_Approach](https://www.researchgate.net/publication/306347540_Epidemiological_Surveillance_System_for_Coffee_Rust_Disease_Hemileia_vastatrix_in_Mexico_A_Regional_Approach)
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez J, Hernández R, González-Gómez R and Robles-García P. 2014e. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. In: Abstracts 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia “Desafios Futuros”. 17-22 agosto. Londrina, Paraná, Brasil. [https://www.researchgate.net/publication/301204091\\_Regional\\_Epidemiology\\_A\\_new\\_frontier\\_and\\_challenge\\_in\\_plant\\_pathology](https://www.researchgate.net/publication/301204091_Regional_Epidemiology_A_new_frontier_and_challenge_in_plant_pathology)
- Moschini RC, Carranza MR and Carmona MA. 2004. Meteorological-based predictions of wheat head blight epidemic in the southern Argentinean pampas region. Cereal Research Communications 32: 45–52. <https://doi.org/10.1007/BF03543279>
- Newlands NK. 2018. Model-based forecasting of agricultural crop disease risk at the regional scale, integrating airborne inoculum, environmental, and satellite-based monitoring data. Frontiers in Environmental Science 6: 1-16. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00063>
- Park EW, Seem RC, Gadoury DM and Pearson RC. 1997. DM-CAST: a prediction model for grape downy mildew development. Viticulture and Enological Science 52: 182–89 [https://www.researchgate.net/publication/258219975\\_DMCast\\_a\\_prediction\\_model\\_for\\_grape\\_downy\\_mildew\\_development](https://www.researchgate.net/publication/258219975_DMCast_a_prediction_model_for_grape_downy_mildew_development)
- Parnell S, van den Bosch F, Gottwald T and Gilligan CA. 2017. Surveillance to inform control of emerging plant diseases: An epidemiological perspective. Annual Review of Phytopathology 55: 591–610. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035334>
- Pethybridge SJ and Nelson SC. 2018. Estimate a new ipad application for assessment of plant disease severity using photographic standard area diagrams. Plant Disease 102: 276-281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1094-SR>
- Pethybridge SJ and Nelson SC. 2015. Leaf Doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity. Plant Disease 99: 1310-1316. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0319-RE>
- Rosa M, Genesio R, Gozzini B, Maracchi G and Orlandini S. 1993. PLASMO: a computer program for grapevine downy mildew development forecasting. Computers and Electronics in Agriculture 9(3): 205-215. [https://doi.org/10.1016/0168-1699\(93\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0168-1699(93)90039-4)
- Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, González-Gómez R y López-Buenfil A. 2015. CALCULA-HF v1.0: Estimación de horas favorables de inductividad epidémica debido a la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*. Revista Mexicana de Fitopatología 33S: 119. <https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen332015/Suplemento-332015FULL.pdf>
- SENASICA. 2016. Roya del caféto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 40. 23 p. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya%20cafeeto/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20Roya%20del%20cafeeto.pdf>
- SIAP (Servicio de Información Agrícola y Pesquera). 2018. Cierre de la producción agrícola por estados. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Tsukahara RY, Marcelli H and Canteri MG. 2008. Relationship between climate and the progress of the asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in two micro-regions of Paraná State. Ciências Agrárias 29: 47-52. <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744087005.pdf>



# Strain of *Pseudomonas syringae* causes bacterial leaf spot in marigold plants (*Tagetes erecta*) in Mexico

## Cepa de *Pseudomonas syringae* causante de la mancha bacteriana en cempasúchil (*Tagetes erecta*) en México

**Luis David Maldonado-Bonilla**, CONACYT-Universidad del Mar, Instituto de Genética, Carretera Vía Sola de Vega S/N, C.P. 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México; **Gustavo Hernández-Guzmán**, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Campus Irapuato-Salamanca, km 9, Carretera Irapuato-Silao, Colonia El Copal, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México; **Norma Angélica Martínez-Gallardo, José Luis Hernández-Flores, John Paul Délano-Frier**, CINVESTAV-Unidad Irapuato, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Km 9.6 del Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; **José Humberto Valenzuela-Soto\***, CONACYT-Centro de Investigación en Química Aplicada, Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Boulevard Enrique Reyna Hermosillo 140, C.P. 25294, Saltillo, Coahuila, México. \*Autor para correspondencia: [humberto.valenzuela@ciqa.edu.mx](mailto:humberto.valenzuela@ciqa.edu.mx)

Recibido: 25 de Abril, 2021.

Aceptado: 10 de Junio, 2021.

Maldonado-Bonilla LD, Hernández-Guzmán G, Martínez-Gallardo NA, Hernández-Flores JL, Délano-Frier JP and Valenzuela-Soto JH. 2021. Strain of *Pseudomonas syringae* causes bacterial leaf spot in marigold plants (*Tagetes erecta*) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 493-502.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-5>

Primera publicación DOI: 06 de Julio, 2021.

First DOI publication: July 06, 2021.

**Resumen.** El cempasúchil (*Tagetes erecta*) es una planta asterácea comúnmente utilizada como flor ornamental y ceremonial durante la temporada de otoño en México. Las plantas de cempasúchil cultivadas en el campo presentaron síntomas de la enfermedad de la mancha foliar bacteriana. Se aisló una cepa bacteriana que potencialmente causa la

**Abstract.** Marigold (*Tagetes erecta*) is an Asteraceae plant commonly used as an ornamental and ceremonial flower during the fall season in Mexico. Marigold plants cultivated in the field presented bacterial leaf spot disease symptoms. A bacterial strain that potentially causes spot disease was isolated. The main goal of this research was to classify this bacterium and assess its pathogenicity towards marigold and other plant species. The biochemical profiling identified this strain as *Pseudomonas syringae* LF2012. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed a close relation with *Pseudomonas* genomospecies. The I-CeuI macro-restriction profile of the chromosomal confirmed its high degree of similarity with distinct *P. syringae* pathovars. *P. syringae* LF2012 causes spot disease when inoculated by spray in marigold leaves. Infection assays towards plants

enfermedad de las manchas. El objetivo principal de esta investigación fue clasificar esta bacteria y evaluar su patogenicidad en cempasúchil y otras especies vegetales. El perfil bioquímico identificó esta cepa como *Pseudomonas syringae* LF2012. El análisis filogenético del gen ARNr 16S reveló una estrecha relación con genomoespecies de *Pseudomonas*. El perfil de macrorestricción I-CeuI del cromosoma confirmó su alto grado de similitud con distintos patovares de *P. syringae*. *P. syringae* LF2012 causa la enfermedad de las manchas cuando se inocula por aspersión en hojas de cempasúchil. Los ensayos de infección de plantas de otras familias (Asteraceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Poaceae y Solanaceae) sugirieron que la enfermedad podría limitarse al cempasúchil. Además, esta cepa provoca respuestas de tipo hipersensible en hojas de *Nicotiana tabacum*.

**Palabras clave:** bacteria, fitopatógeno, virulencia, respuesta hipersensible, 16S ARNr.

El cempasúchil (*Tagetes erecta*) es una planta anual de la familia de las Asteraceae, originaria de México. Las flores son fuente de pigmentos amarillo-naranjas de carotenoides; especialmente de xantófilas, tales como la luteína (Deineka *et al.*, 2007). Además de pigmentos, el cempasúchil también produce metabolitos con actividad antioxidante, hepatoprotectiva y nematocida (Gopi *et al.*, 2012) y peculiarmente se usa como adorno en los rituales del Día de los muertos en México (Brandes, 1998).

Debido a la importancia del cempasúchil como fuente de metabolitos secundarios y componente del patrimonio cultural mexicano, se requiere información sobre los patógenos microbiales para definir estrategias de protección a los cultivos y prevenir pérdidas económicas, sobre todo para

from other families (Asteraceae, Brassicaceae, Amaranthaceae, Poaceae y Solanaceae) suggested that disease might be limited to marigold plants. Furthermore, this strain causes hypersensitive-like responses in *Nicotiana tabacum* leaves.

**Key words:** bacteria, phytopathogen, virulence, hypersensitive response, 16S rRNA.

The marigold (*Tagetes erecta*) is an annual plant from the Asteraceae family, native to Mexico. The flowers are a source of carotenoid yellow-orange pigments, mostly xanthophylls such as the lutein (Deineka *et al.*, 2007). Besides pigments, marigold also produces metabolites with antioxidant, hepatoprotective, and nematocidal activity (Gopi *et al.*, 2012), and, peculiarly, it is used as ornament in the rituals of the Day of the Death in Mexico (Brandes, 1998).

Due to the importance of marigold as a source of secondary metabolites and as component of the Mexican cultural heritage, information about microbial pathogens is required to set strategies of crop protection and prevent economical losses, especially in small-scale producers. Marigold seedlings cultivated in the field are susceptible to damping-off caused by the fungal pathogen *Ceratobasidium* sp. (Saroj *et al.*, 2013). Unlike damping-off, diseases caused by bacteria might not prevent flower production if emerge in the late stages of plant development, and the commercialization of diseased plants contributes to the dispersal of disease. Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* and bacterial leaf spot produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* are among the most damaging bacterial diseases in marigold (Horst, 2013). *P. syringae* pv. *tagetis* was first reported as *Pseudomonas tagetis* (Hellmers, 1955), and causes apical chlorosis in

productores de pequeña escala. Las plántulas de cempasúchil cultivadas en el campo son susceptibles a Damping-off causado por el patógeno fúngico *Ceratobasidium* sp. (Saroj *et al.*, 2013). A diferencia del Damping-off, las enfermedades causadas por bacterias podrían no impedir la producción de flores si emergen en las etapas tardías del desarrollo de la planta, y la comercialización de plantas enfermas contribuye a la propagación de la enfermedad. La marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*, así como las manchas foliares causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* están entre las enfermedades bacteriales más dañinas para el cempasúchil (Horst, 2013). *P. syringae* pv. *tagetis* fue reportada por primera vez como *Pseudomonas tagetis* (Hellmers, 1955) y causa clorosis apical en girasol (*Helianthus annuus*) y en la alcachofa de Jerusalén (*Ambrosia tuberosa*) (Gulya *et al.*, 1982; Shane y Baumer, 1984). Además de sus efectos perjudiciales, este patógeno tiene el potencial de ser usado como agente de biocontrol, ya que causa clorosis y necrosis al ser inoculado en hierbas tales como el cardo de Canadá (*Cirsium arvense*) (Gronwald *et al.*, 2002) y en la ambrosia arvense *Ambrosia grayi* (Sheikh *et al.*, 2001). La clorosis quizá sea producida por la tagetitoxina, un inhibidor de la polimerasa de ARN plastidial (Mathews y Durbin, 1990).

Una nueva cepa bacteriana que se asemeja a *Pseudomonas syringae* llamada LF2012 inicialmente fue aislada por el Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados) de plantas de cempasúchil enfermas. Se inocularon  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> por aspersión en tres plantas para demostrar los postulados de Koch. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz (aproximadamente  $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), temperatura (27 °C), fotoperiodos (16 h luz/8 h oscuridad) y humedad relativa (75%). Este experimento se repitió tres veces. En

sunflower (*Helianthus annuus*) and Jerusalem artichoke (*Ambrosia tuberosa*) (Gulya *et al.*, 1982; Shane and Baumer, 1984). Besides its detrimental effects, this pathogen has the potential to be used as a biocontrol agent as causes chlorosis and necrosis when inoculated in weeds such as the Canada thistle (*Cirsium arvense*) (Gronwald *et al.*, 2002) and wollyleaf bur ragweed (*Ambrosia grayi*) (Sheikh *et al.*, 2001). Chlorosis is likely produced by tagetitoxin, an inhibitor of the plastidial RNA polymerase (Mathews and Durbin, 1990).

A novel bacterial strain that resembles *Pseudomonas syringae* and named LF2012 was initially isolated from diseased marigold plants by Dr. Leopoldo Fucikovsky+ (Colegio de Posgraduados). Spray inoculation of  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> into three plants was performed to prove the Koch's postulates. After inoculation, the plants were maintained in a growth chamber under controlled conditions for light (approximately  $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), temperature (27 °C), photoperiod (16 h light/8 h dark), and relative humidity (75 %). This experiment was repeated three times. In this set of experiments, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 was used as reference of causal agent of disease in Arabidopsis and tomato, and *P. syringae* pv. *syringae* 61 was included as non-host strain as it causes no disease in the plant species tested.

Chlorosis, accompanied by a necrotic halo, became visible five days after inoculation in the three plants tested in every experiment (Figure 1). Bacteria were re-isolated from the diseased plant, which confirms this strain is pathogenic towards marigold. Host range assays were performed in plants belonging to five different families, including Asteraceae, Amaranthaceae, Brassicaceae, Poaceae, and Solanaceae (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). Other phytopathogenic strains were included as controls. The results are summarized in Table 1. LF2012 only caused symptoms in marigold plants

este conjunto de experimentos se usó *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 como referencia del agente causal de enfermedades en *Arabidopsis* y tomate, y se incluyó a *P. syringae* pv. *syringae* 61 como una cepa sin huésped, ya que no causa enfermedad en la especie vegetal estudiada.

La clorosis, acompañada de un halo necrótico, se volvió visible cinco días después de su inoculación en las tres plantas examinadas en cada experimento (Figura 1). Las bacterias fueron re-aisladas de la planta enferma, lo que confirma que esta cepa es patogénica hacia el compasúchil. Se realizaron ensayos de rango de huéspedes en plantas pertenecientes a cinco familias diferentes, incluyendo Asteraceae, Amaranthaceae, Brassicaceae, Poaceae y Solanaceae (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). Otras cepas fitopatogénicas fueron incluidas como testigos. Los resultados se encuentran resumidos en el Cuadro 1. LF2012 solo causó síntomas en plantas de compasúchil, pero no así en otras plantas,

but did not in other plants, including sunflower (*H. annuus*) “small flower” that also belongs to Asteraceae, and it has been reported as a host of *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel and Durbin, 1985). We tested three different cultivars of sunflower, in any case LF2012 caused disease in sunflower, hence, we ruled out the possibility to name the strain as *P. syringae* pv. *tagetis*.

These results suggest that LH2012 is an adapted pathogen causing disease in marigold, but it is non-adapted to access into the other plant species. Non-adapted pathogens do not cause a reaction when inoculated by spray because they do not access into the plant. But if the pathogen is forced to invade mesophyll, it will be perceived by the plant as hazardous agent, and a strong defense response will be induced. Detection of pathogen-derived molecules triggers the non-host resistance, often characterized by hypersensitive response or cell death at the site of infiltration that restricts



Figura 1. Síntomas de la enfermedad de manchas foliares en compasúchil (*Tagetes erecta*) causada por *P. syringae* LF2012 (LF2012) cinco días después de inocular con aspersor. Las plantas con tratamientos simulados fueron rociadas con un amortiguador de fosfato (simulacro). Las plantas se mantuvieron bajo un fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad), con luz de aproximadamente  $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $28^\circ\text{C}$  y una humedad relativa de 75%.

Figure 1. Disease symptoms of leaf spot disease on marigold (*Tagetes erecta*) caused by *P. syringae* LF2012 (LF2012) five days after spray inoculation. Mock treated plants were sprayed with phosphate buffer (Mock). Plants were kept under a photoperiod (16 h light/8 h dark), light of approximately  $300 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $28^\circ\text{C}$ , and relative humidity of 75%.



**Cuadro 1. Determinación del rango de huésped de *Pseudomonas syringae* LF2012.** Los ensayos se realizaron al rociar una inoculación de suspensión bacterial ( $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) y se roció un amortiguador de fosfato como simulacro. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se usó como cepa virulenta de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*. *P. syringae* pv. *syringae* 61 se usó como testigo sin huésped.

**Table 1. Determination of host range of *Pseudomonas syringae* LF2012.** Assays were performed by spray inoculation of bacterial suspensions ( $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), and phosphate buffer was sprayed as mock control. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 was used as virulent strain of *A. thaliana* and *S. lycopersicum*. *P. syringae* pv. *syringae* 61 was used as non-host control.

| Experimental host |                                           | LF2012 | <i>P. s.</i> pv. <i>tomato</i><br>DC3000 | <i>P. s.</i> pv. <i>syringae</i><br>61 | Mock |
|-------------------|-------------------------------------------|--------|------------------------------------------|----------------------------------------|------|
| Asteraceae        | <i>Tagetes erecta</i>                     | +      | -                                        | -                                      | -    |
|                   | <i>Helianthus annuus</i> “small flower”   | -      | -                                        | -                                      | -    |
| Brassicaceae      | <i>Brassica oleracea</i> cv. Grandeur     | -      | -                                        | -                                      | -    |
|                   | <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0         | -      | +                                        | -                                      | -    |
| Amaranthaceae     | <i>Amaranthus hypochondriacus</i>         | -      | -                                        | -                                      | -    |
|                   | <i>Amaranthus hybridus</i>                | -      | -                                        | -                                      | -    |
| Poaceae           | <i>Zea mays</i> cv A188                   | -      | -                                        | -                                      | -    |
|                   | <i>Sorghum bicolor</i>                    | -      | -                                        | -                                      | -    |
| Solanaceae        | <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Río Fuego | -      | +                                        | -                                      | -    |
|                   | <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi       | -      | +                                        | -                                      | -    |

incluyendo girasol (*H. annuus*) “flor pequeña” que también pertenece a Asteraceae, y ha sido reportada como huésped de *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel y Durbin, 1985). Se realizaron ensayos con tres cultivares diferentes de girasol y en cualquier caso LF2012 no causó enfermedades en girasol, por lo que descartamos la posibilidad de nombrar la cepa como *P. syringae* pv. *tagetis*.

Estos resultados sugieren que LH2012 es un patógeno adaptado causante de enfermedades en cempasúchil, pero es no adaptado para el acceso a las demás especies vegetales. Los patógenos no adaptados no causan una reacción cuando son inoculados con aspersión porque no acceden hacia adentro de la planta. Sin embargo, si el patógeno es forzado a invadir la mesófila, será percibido por la planta como un agente de riesgo y se inducirá una fuerte respuesta de defensa. La detección de moléculas derivadas de patógenos dispara la resistencia

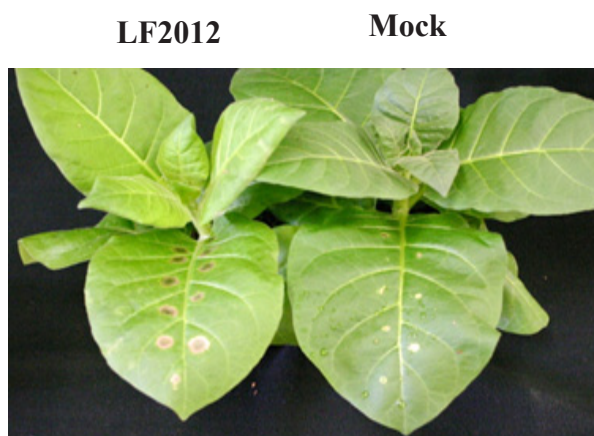
the pathogen’s propagation (Lee *et al.*, 2017). To confirm that LH2012 has features of non-adapted pathogen towards other species, we performed infiltrations of  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> of LH2012 into tobacco leaves. LF2012 triggers hypersensitivity reaction (HR) like spots (Figure 2). As expected to this reaction, it was limited to the infiltration site no matter how long the plants were incubated. This result suggests that when LH2012 is recognized as pathogen in a non-host plant when is directly inoculated in mesophyll.

The metabolic profile was performed by the BIOLOG test as a first approach to identify the species of LF2012. LF2012 was inoculated in the Biolog universal growth medium and incubated at 28 °C. The data were acquired and analyzed with the MicroLog version 4.2 data software. The profile as related to *P. syringae* pathovars. Furthermore, the utilization of *myo*-inositol, D-sorbitol, D-mannose,

del no-huésped, que suele caracterizarse por una respuesta hipersensible o la muerte celular en el sitio de infiltración que restringe la propagación del patógeno (Lee *et al.*, 2017). Para confirmar que LH2012 tiene características de patógeno no adaptado hacia otras especies, se realizaron infiltraciones de  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> de LH2012 en hojas de tabaco. LF2012 causó puntos semejantes a una reacción de hipersensibilidad (RH) (Figura 2). Como se esperaba para esta reacción, se limitó al sitio de infiltración, sin importar el tiempo de incubación de las plantas. Este resultado sugiere que se reconoce a LH2012 como un patógeno en una planta no huésped cuando se inocula directamente en la mesófila.

El perfil metabólico se llevó a cabo con la prueba BIOLOG como una primera aproximación para identificar a las especies de LF2012. LF2012 se inoculó en el medio de crecimiento universal Biolog y se incubó a 28 °C. Los datos fueron obtenidos y analizados con el software de datos MicroLog versión 4.2. El perfil se relaciona con patovares de *P. syringae*. Asimismo, el uso de *myo*-inositol, D-sorbitol, D-manosa, D-fructosa,  $\alpha$ -D-glucosa, sacarosa, L-fucose y maltosa como fuentes de carbono fueron similares a las fuentes reportadas para *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel y Durbin, 1985). La identificación como *P. syringae* pv. *tagetis* no fue posible, ya que el perfil metabólico de este patovar no está incluido en la base de datos disponible.

La secuencia del gen ARNr 16S es ampliamente usado como un gen codificado y es usado en la construcción de relaciones filogenéticas dentro de las procariontas. Específicamente, en *Pseudomonas* ha sido útil para redistribuir algunas especies de *Pseudomonas* en otros géneros (Mulet *et al.*, 2010). El género de *Pseudomonas* se divide en dos linajes: *aeruginosa* y *fluorescens*. *Pseudomonas syringae* se clasifica en el linaje de *fluorescens* y siete genomoespecies (Gs) dentro de *P. syringae* son



**Figura 2.** *P. syringae* LF2012 causa una respuesta similar al RH en hojas infiltradas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (LF2012). Las plantas testigo fueron infiltradas con amortiguador de fosfato (simulación). Las plantas en macetas se matuvieron bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Las fotografías de las plantas fueron tomadas 5 días después de infiltrarse.

**Figure 2.** *P. syringae* LF2012 causes an HR-like response in infiltrated tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*) (LF2012). Control plants were infiltrated with phosphate buffer (Mock). Potted plants were kept under controlled conditions of light, temperature, and humidity. Plants were photographed 5 days after infiltration.

D-fructose,  $\alpha$ -D-glucose, sucrose, L-fucose, and maltose as carbon sources were similar to the sources reported to *P. syringae* pv. *tagetis* (Rhodehamel and Durbin, 1985). Identification as *P. syringae* pv. *tagetis* was not possible as the metabolic profile of this pathovar is not included in the available database.

The sequence of the 16S rRNA gene is widely used as a barcode gene, and it is used to the construction of phylogenetic relationships within prokaryotes. Specifically, in *Pseudomonas* has been useful to redistribute some *Pseudomonas* species into other genera (Mulet *et al.*, 2010). The *Pseudomonas* genus is divided into two lineages: *aeruginosa* and *fluorescens*. *Pseudomonas*

discernibles por análisis filogenético (Marcelletti y Scortichini, 2014).

El gen ARNr 16S de LF2012 se amplificó y clonó con los siguientes procedimientos experimentales reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). El plásmido purificado fue sujeto a una secuenciación capilar en un Analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) usando el promotor T7 y los oligonucleótidos en reversa M13 que coinciden con las secuencias flanqueantes de pCR-XL-TOPO (Invitrogen). La secuencia fue depositada en el GenBank bajo el número de Acceso KP796138.1. La secuencia de ARNr 16S de LF2012 y las secuencias correspondientes de las cepas representativas de ambos linajes de *Pseudomonas* fueron alineadas con el algoritmo ClustalW. Una vez alineados, se creó un árbol filogenético con el método de unión de vecinos. Ambos procedimientos bioinformáticos fueron llevados a cabo en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). El árbol filogenético muestra que la secuencia de ARNr 16S de LF2012 está agrupada en el linaje de *fluorescens* y tiene una estrecha relación con las genomoespecies Gs3, Gs6, Gs8, Gs9 (Figura 3). Las secuencias del linaje de *aeruginosa* están claramente separadas de *fluorescens*. Las genomoespecies con relación estrecha con LF2012 pertenecen al grupo *P. syringae* (Mulet *et al.*, 2010). La secuencia de referencia de *P. syringae* pv. *tagetis* usada en el presente análisis (AB001449.1) está agrupada con otras cepas fitopatogénicas, pero *P. syringae* LF2012 está excluido de este subárbol. El árbol también muestra que LF2012 tiene menos relación con otros linajes de especies *fluorescens* tales como *P. putida* y *P. savastanoi*. Por lo tanto, clasificamos a esta cepa como *Pseudomonas syringae* LF2012. Se requiere analizar otros marcadores para determinar la relación con *P. syringae* pv. *tagetis* o secuencias de cepas de referencias para las genomoespecies 7, tales como *P. syringae* pv. *helianthi*, que hasta ahora es insuficiente.

*syringae* is classified into the *fluorescens* lineage, and seven genomospecies (Gs) within *P. syringae* are distinguishable by phylogenetic analysis (Marcelletti and Scortichini, 2014).

The 16S rRNA gene of LF2012 was amplified and cloned by the following experimental procedures reported before by our workgroup (Valenzuela-Soto *et al.*, 2015). The purified plasmid was subject to capillary sequencing in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) using the T7 promoter and M13 Reverse oligonucleotides that match flanking sequences of pCR-XL-TOPO (Invitrogen). The sequence was deposited in the GeneBank under the Accession Number KP796138.1. The 16S rRNA sequence of LF2012 and the corresponding sequences from representative strains of the two *Pseudomonas* lineages were aligned by the ClustalW algorithm. After alignment, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method. Both bioinformatics procedures were conducted in MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). The phylogenetic tree shows that the 16S rRNA sequence of LF2012 is clustered into the *fluorescens* lineage, and it is closely related to genomospecies Gs3, Gs6, Gs8, Gs9 (Figure 3). The sequences from the *aeruginosa* lineage are clearly separated from *fluorescens*. The genomospecies closely related to LF2012 belong to the *P. syringae* group (Mulet *et al.*, 2010). The reference sequence of *P. syringae* pv. *tagetis* used in our analysis (AB001449.1) is clustered with other phytopathogen strains, but *P. syringae* LF2012 is excluded from this subtree. The tree also shows that LF2012 is less related to other species *fluorescens* lineage such a *P. putida* and *P. savastanoi*. Therefore, we classified this strain as *Pseudomonas syringae* LF2012. Analysis of other markers is necessary to determine the relationship with *P. syringae* pv. *tagetis* or sequences of reference strains for the genomospecies 7, such as *P. syringae* pv. *helianthi*, which so far is lacking.

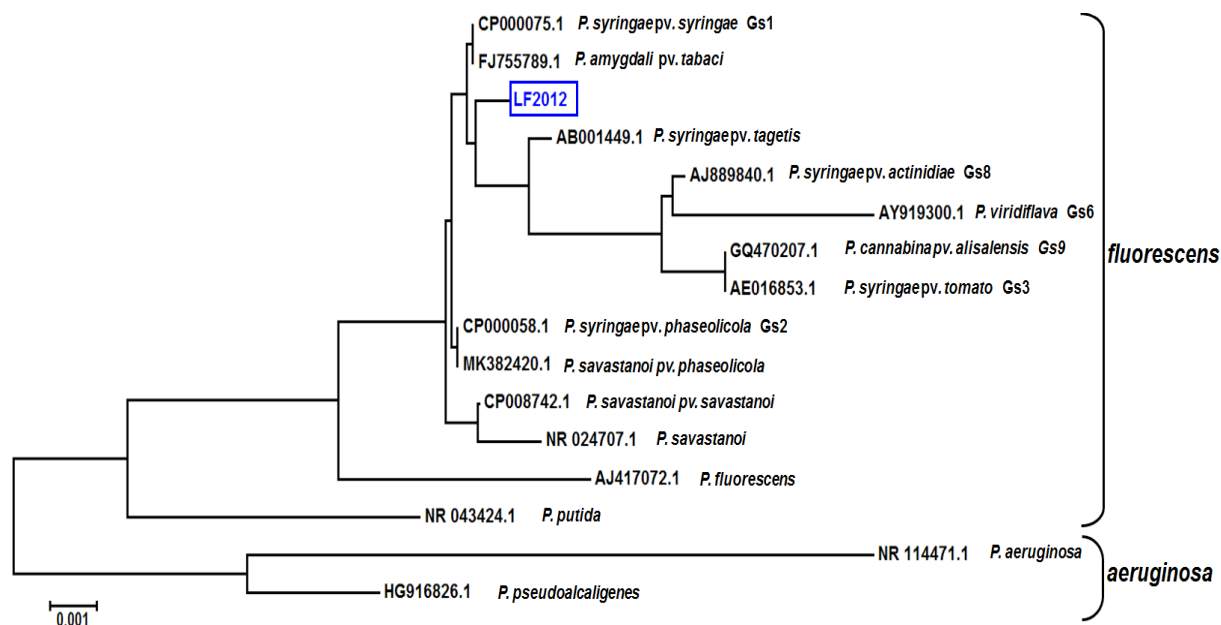


Figura 3. Árbol filogenético que muestra la relación del *Pseudomonas syringae* LF2012 aislado de plantas de cempasúchil con un subconjunto de cepas y especies de relación cercana. El número de acceso de cada secuencia usada está indicado en la rama antes del nombre.

Figure 3. Phylogenetic tree showing the relationship of the *Pseudomonas syringae* LF2012 isolated from marigold plants within a subset of closely related strains and species. The accession number of every sequence used is indicated in the branch before the name.

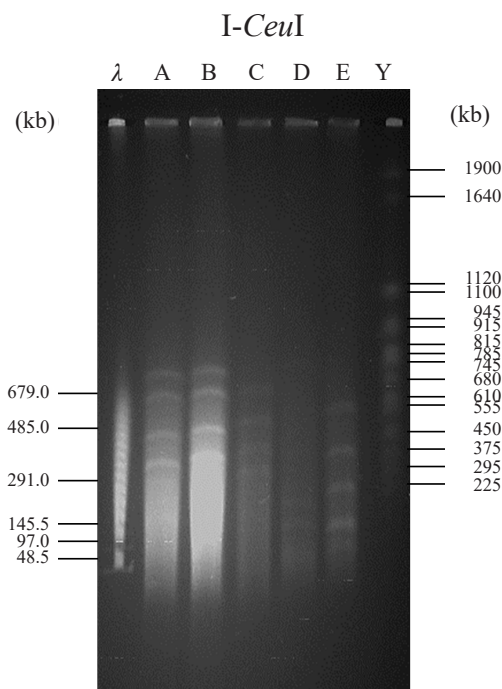
Se llevó a cabo un perfil de macrorestricción al digerir el ADN genómico de LF2012 y nuestras cepas testigo con I-CeuI. Los productos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) (Figura 4). El patrón de restricción de LF2012 (línea A, Figura 4) fue como el perfil de *P. syringae* pv. *syringae* 61 del Gs1 (línea B, Figura 4), pero no se detectaron fragmentos comunes entre LF2012 y *P. syringae* pv. *glycinea* (línea C, Figura 4), miembro del grupo *amygdali* dentro del linaje de *fluorescens* (Gomila *et al.*, 2017). Las diferencias y semejanzas en estos patrones de restricción respaldan la clasificación de la cepa como *P. syringae* LF2012.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio para el perfil bioquímico y el análisis molecular permitieron identificar a esta bacteria como *Pseudomonas syringae* LF2012, un

A macro-restriction profile was performed by digesting the genomic DNA of LF2012 and our control strains with I-CeuI. Restriction products were separated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (Figure 4). The restriction pattern of LF2012 (line A, Figure 4) was like the profile of *P. syringae* pv. *syringae* 61 from the Gs1 (line B, Figure 4), but no common fragments were detected between LF2012 and *P. syringae* pv. *glycinea* (line C, Figure 4) a member of the *amygdali* group within the *fluorescens* lineage (Gomila *et al.*, 2017). Differences and similarities in these restriction patterns supports the classification of the strain as *P. syringae* LF2012.

In conclusion, results obtained here from biochemical profile and molecular analysis permitted identifying this bacterium as *Pseudomonas syringae* LF2012, a pathogen that





**Figura 4.** Perfiles de macrorestricción de Electroforesis en gel de campo Pulsado (PFGE) producidos por *P. syringae* LF2012 y otras bacterias fitopatógenas. El ADN cromosómico DNA fue digerido con la endonucleasa de corte raro I-CeuI y luego separado con PFGE. ( $\lambda$ ) Marcador de tamaño de escalera Lambda. Patrones de PFGE de: (A) *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* LF2012; (B) *P. syringae* pv. *syringae* 61; (C) *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180; (D) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; (E) *Pectobacterium cacticidum* FHLGJ22 y (Y) cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae* YPH80; (kb) tamaños en kilo pares de base.

**Figure 4.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) macrorestriction profiles produced by *P. syringae* LF2012 and other phytopathogenic bacteria. Chromosomal DNA was digested with the rare-cutting endonuclease I-CeuI and subsequently separated by PFGE. ( $\lambda$ ) Lambda ladder size marker. PFGE patterns of: (A) *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* LF2012; (B) *P. syringae* pv. *syringae* 61; (C) *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180; (D) *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; (E) *Pectobacterium cacticidum* FHLGJ22, and (Y) *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 chromosome; (kb) sizes in kilo base-pairs.

patógeno que causa síntomas de la enfermedad de manchas foliares en el cempasúchil. Es avirulenta en otra planta Asteraceae y plantas de otras familias, y dispara reacciones semejantes a HR en hojas de tabaco infiltradas. La secuenciación de genoma completo de esta nueva cepa permitirá determinar la clasificación precisa que ayuda en métodos moleculares de patógenos de cempasúchil y en la identificación de factores de virulencia que ilustran la base molecular de la enfermedad. Debido a la relación con *P. syringae* pv. *tagetis*, su potencial como biocontrol de malezas puede ser explorado.

causes leaf spot disease symptoms in marigold. It is avirulent in another Asteraceae plant and plants from other families and triggers HR-like reaction in infiltrated tobacco leaves. The whole-genome sequencing of this novel strain will help determine the accurate classification that helps in molecular methods of marigold pathogens and the identification of virulence factors that illustrate the molecular basis of the disease. Due to the relation to *P. syringae* pv. *tagetis* its potential as biocontrol of weeds might be explored.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Leopoldo Fucikovskyy+ (Colegio de Posgraduados) por la donación de la cepa *P. syringae* LF2012. LDMB y JHVS obtuvieron el apoyo del Programa de Investigación “Cátedras CONACYT”, Becas No. 538 y No. 1333, respectivamente.

## LITERATURA CITADA

- Brandes S. 1998. The Day of the Dead, Halloween, and the quest for mexican national identity. *The Journal of American Folklore* 111: 359. <https://doi.org/10.2307/541045>.
- Deineka VI, Sorokopudov LA, Deineka LA and Tretyakov MY. 2007. Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41:540. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0007-z>.
- Gomila M, Busquets A, Mulet M, García-Valdés E and Lalucat J. 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology* 8: 2422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>.
- Gopi G, Elumalai A and Jayasri P. 2012. A concise review on *Tagetes erecta*. *International Journal of Phytopharmacy Research* 3: 16–19.
- Gronwald JW, Plaisance KL, Ide DA and Wyse DL. 2002. Assessment of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* as a biocontrol agent for Canada thistle. *Weed Science* 50(3): 397–404. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0397:aopspt\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0397:aopspt]2.0.co;2).
- Gulya TJ, Urs R and Banttari EE. 1982. Apical chlorosis of sunflower caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 66: 598–600. <https://doi.org/10.1094/PD-66-598>.
- Hellmers E. 1955. Bacterial leaf spot of african marigold (*Tagetes erecta*) caused by *Pseudomonas tagetis* sp. n. *Acta Agriculturae Scandinavica* 5(1): 185–200. <https://doi.org/10.1080/00015125509441439>.
- Horst RK. 2013. *Field Manual of Diseases on Garden and Greenhouse Flowers*. Springer. Dordrecht. 157p
- Lee HA, Lee HY, Seo E, Lee J, Kim SB, Oh S, Choi E, Choi E, Lee SE and Choi D. 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(1): 5–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-16-0213-CR>.
- Li Y, Shen J, Pan BH, Guo MX, Wang QX, Ouyang CB, Yan DD and Cao AC. 2014. First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on marigold (*Tagetes erecta*) in Beijing, China. *Plant Disease* 98(8): 1153. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-1005-PDN>.
- Marcelletti S and Scortichini M. 2014. Definition of plant-pathogenic *Pseudomonas* genomospecies of the *Pseudomonas syringae* complex through multiple comparative approaches. *Phytopathology* 104(2): 1274–1282. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0344-R>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Leopoldo Fucikovskyy+ (Colegio de Posgraduados) for the donation of the *P. syringae* LF2012 strain. LDMB and JHVS are supported by the “Cátedras CONACYT” Research Program, Grants No. 538, and No. 1333, respectively.

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

- Mathews DE and Durbin RD. 1990. Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 265(1): 493–498. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40258-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40258-5)
- Mulet M, Lalucat J and García-Valdés E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12(6): 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>.
- Rhodehamel NH and Durbin RD. 1985. Host range of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 69(7): 589–591. <https://doi.org/10.1094/PD-69-589>.
- Saroj A, Kumar A, Saeed ST, Samad A and Alam M. 2013. First Report of *Tagetes erecta* damping off caused by *Ceratosporium* sp. from India. *Plant Disease* 97(9): 1251–1251. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0145-PDN>.
- Shane WW and Baumer JS. 1984. Apical chlorosis and leaf spot of Jerusalem artichoke incited by *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Plant Disease* 68: 257–260. https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n03_257.PDF
- Sheikh T, Wheeler TA, Dotray PA and Zak JC. 2001. Biological control of woollyleaf bursage (*Ambrosia grayi*) with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Weed Technology* 15(2): 375–381. [https://doi.org/10.1614/0890-037x\(2001\)015\[0375:bcowba\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0890-037x(2001)015[0375:bcowba]2.0.co;2).
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Valenzuela-Soto H, Maldonado-Bonilla LD, Hernández-Guzmán, G, Rincón-Enríquez G, Martínez-Gallardo NA, Ramírez-Chávez E, Hernández IC, Hernández-Flores JL and Délano-Frier JP. 2015. Infection by a coronatine-producing strain of *Pectobacterium cacticidum* isolated from sunflower plants in Mexico is characterized by soft rot and chlorosis. *Journal of General Plant Pathology* 81: 368–381. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0606-y>.

Etiology of habanero pepper (*Capsicum chinense*) wilt in Tabasco, Mexico

Etiología de la marchitez del chile habanero (*Capsicum chinense*) en Tabasco, México

Karina Moctezuma-Bautista, Carlos Fredy Ortiz-García*, David Jesús Palma-López, Luis Alberto Cerón-Hernández, Colegio de Postgraduados, Periférico Carlos A. Molina, Km 3.5. Carretera Cárdenas-Huimanguillo, Cárdenas, Tabasco, CP 86500, México; **Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Gerardo Rodríguez-Alvarado**, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, CP. 58880, México; **Nadia Landero-Valenzuela**, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Domicilio conocido s/n. Tepatepec, Francisco I. Madero, Hidalgo, C.P. 42660, México. *Autor para correspondencia: cfortiz@colpos.mx

Recibido: 04 de Marzo, 2021.

Aceptado: 15 de Julio, 2021.

Moctezuma-Bautista K, Ortiz-García CF, Palma-López DJ, Cerón-Hernández LA, Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G and Landero-Valenzuela N. 2021. Etiology of habanero pepper (*Capsicum chinense*) wilt in Tabasco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(3) 503-514.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-5>

Primera publicación DOI: 30 de Julio, 2021.

First DOI publication: July 30, 2021.

Resumen. El objetivo de este estudio fue detectar el agente causal de la marchitez del chile habanero en cuatro municipios de Tabasco, en las áreas cacaoteras donde se está incentivando la producción de chile habanero. Se realizaron muestreos en cuatro municipios: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) y Centro (3). Las muestras se

Abstract. The objective of this study was to detect the causal agent of habanero bell pepper wilt in four municipalities of Tabasco, in cocoa-growing areas where habanero bell pepper production is being encouraged. Sampling was carried out in four municipalities: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) and Centro (3). Samples were sown and isolated for morphological and molecular identification. Six *Phytophthora* (1) and *Fusarium* (5) isolates obtained from 15 habanero pepper plantations were tested for pathogenicity. The *Phytophthora* isolate (CH132) was pathogenic in the pathogenicity test on two-month-old habanero pepper seedlings; however, none of the *Fusarium* isolates showed pathogenicity. The *Phytophthora* strain was identified as *P. capsici* using morphological characteristics and the use of the COI sequence. *P. capsici* strains were not shown to be pathogenic on cocoa pods. *P. capsici* was not detected habanero peppers seedlings in the

sembraron y aislaron para la identificación morfológica y molecular. Se realizaron pruebas de patogenicidad con seis aislamientos: *Phytophthora* (1) y *Fusarium* (5) obtenidos de 15 plantaciones de chile habanero. El aislado *Phytophthora* (CH132) fue patogénica en la prueba de patogenicidad, en plántulas de chile habanero de dos meses de edad y, ninguno de los aislados de *Fusarium* mostró patogenicidad. La cepa de *Phytophthora* fue identificada como *P. capsici* empleando características morfológicas y el uso de la secuencia del COI. Las cepas de *P. capsici* no se mostraron patogénicas en mazorcas de cacao. No se detectó a *P. capsici* en las plántulas de chile de los municipios cacaoteros de Huimanguillo, Cárdenas y Cunduacán en la subzona hidrológica 1, pero *P. capsici* sí está presente en Acachapa y Colmena, Centro, Tabasco.

Palabras clave: *Phytophthora capsici*, cacao, morfología, amplificación, ADN, COI.

Dentro de las especies de chile cultivadas en México se encuentra el chile habanero (*Capsicum chinensis*) producido en Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Tabasco. En 2015 la producción de chile habanero en Tabasco fue de 3,055.5 t (SIAP, 2015). Sin embargo, en los últimos años, este cultivo se ha introducido a municipios propiamente cacaoteros. En México, se ha reportado la marchitez del chile, atacando diferentes tipos de chiles y causando pérdidas hasta un 40% en varios estados de la república mexicana (Silva-Rojas *et al.*, 2009; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Sin embargo, en Tabasco se presume la presencia de *P. capsici* con la marchitez del chile habanero (López-López *et al.*, 2018) basados en la sintomatología, por lo que se requiere la corroboración de la presencia de *P. capsici*. Montes y de los Santos, (1989) y Ortiz-García (1996) señalan la presencia

cacao-growing municipalities of Huimanguillo, Cárdenas and Cunduacán in hydrological subzone 1, but *P. capsici* is present in Acachapa and Colmena, Centro, Tabasco.

Key words: *Phytophthora capsici*, cacao, morphology, amplification, DNA, COI.

One of the chili pepper species planted in Mexico is the habanero (*Capsicum chinensis*), produced in Campeche, Quintana Roo, Yucatan and Tabasco. In 2015, the production of habanero peppers in 3,055.5 t (SIAP, 2015). However, in recent years this crop has been introduced into cocoa-producing municipalities. In Mexico, wilt has been reported in chili pepper plants, attacking different types of peppers and causing losses of up to 40% in several states in Mexico (Silva-Rojas *et al.*, 2009; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Nevertheless, the presence of *P. capsici* is suspected in Tabasco with the wilt of habanero peppers (López-López *et al.*, 2018) based on the symptomatology, therefore the presence of *P. capsici* must be corroborated. Montes and de los Santos (1989) and Ortiz-García (1996) indicate the presence of *P. capsici* in cocoa trees, according to the criteria of Tsao and Alizadeth (1988), later pointed out by Uchida *et al.* (1992) as *P. tropicalis*, considering that the species of *Phytophthora* that attack both the cocoa trees and the pepper plants are phylogenetically related in clade 2 (Martin *et al.*, 2012). Likewise, Donahoo and Lamour (2008) point out that when populations are superimposed, hybridization can take place after generation F1 both species of *Phytophthora*; this situation was documented *in vitro* by Hurtado-González and Lamour (2009) with cucumber and pumpkin strains in the USA, in the same way that Ortiz-García (1996) did with pumpkin *Phytophthora*

de *P. capsici* en cacao de acuerdo con los criterios de Tsao y Alizadeth (1988) posteriormente señalada por Uchida *et al.* (1992) como *P. tropicalis*. Considerando que las especies de *Phytophthora* que atacan tanto al cacao y al chile están filogenéticamente relacionadas en el clado 2 (Martin *et al.*, 2012). Asimismo, Donahoo y Lamour (2008) señalan que cuando existen poblaciones superpuestas, de ambas especies de *Phytophthora*, puede darse la hibridación después de la generación F; situación que documenta *in vitro* Hurtado-González y Lamour (2009) con cepas de pepino y calabaza en USA, al igual que Ortiz-García (1996) con cepas de *Phytophthora* de calabaza de Francia y de cacao de México. Con base a lo anterior, y dada la importancia que tiene el cacao en Tabasco, y la ampliación de la superficie cultivada del chile habanero en la zona cacaotera de Tabasco, hizo imprescindible determinar el agente causal de la marchitez del chile habanero en las áreas cacaoteras donde se está incentivando la producción de chile habanero, en municipios de Tabasco.

Área de estudio. El área de estudio fue un transecto de 82 km que inicia en el C-34, Huimanguillo y finaliza en Acachapa y Colmena, Centro, en dirección oeste-este, pasando por comunidades cacaoteras de Huimanguillo, Cárdenas y Cunduacán en la subzona hidrológica 1 y llegando a la subzona 2, en Acachapa y Colmena, Centro Tabasco (Figura 1) en cuyas vecindades se ubican comunidades tradicionalmente cacaoteras con plantaciones de chile habanero.

Colecta y aislamiento. De enero a mayo de 2018, se visitaron 15 plantaciones de chile habanero en cuatro municipios de Tabasco: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) y Centro (3) donde las plantas de chile con síntomas de diferente grado de marchitez se colectaron. Para aislar los

strains of france in France and cocoa of Mexico. Based on this, and given the importance of the cocoa tree in Tabasco, as well as the expansion of the plantation areas of the habanero pepper in the cocoa-producing area of Tabasco, it became crucial to determine the causal agent of the wilting of the habanero pepper plant in cocoa-producing areas in which the production of the habanero pepper is being incentivized in municipalities of Tabasco.

Area of Study. The area of study was an 82 km transect beginning in C-34, Huimanguillo, and ending in Acachapa and Colmena, Centro, from west to east, covering cocoa-producing areas of Huimanguillo, Cárdenas and Cunduacán in hydrological area 1 and reaching subzone 2 in Acachapa y Colmena, Centro Tabasco (Figure 1) in the vicinities of which are traditionally cocoa-producing communities with habanero pepper plantations.

Collection and isolation. From January to May 2018, 15 habanero pepper plantations in four municipalities of Tabasco were visited: Huimanguillo (1), Cárdenas (2), Cunduacán (9) and Centro (3), in which plants with symptoms of different degrees of wilt were collected. To isolate the associated microorganisms, small fragments of tissue were cut, disinfected, washed and dried in a V8-Agar culture medium and incubated at 25 ± 1 °C in the dark for 7 days in a Prendo® incubator. The cultures were purified using the hypha tip method, following the method by Ortiz-García (1996). Identification at the genus level adhered to the keys by Barnett and Hunter (1972) for *Fusarium* and by Erwin and Ribeiro (1996) for *Phytophthora*.

Pathogenicity tests in habanero chili plants. The pathogenicity test was carried out with each microorganism isolated from wilting plants in

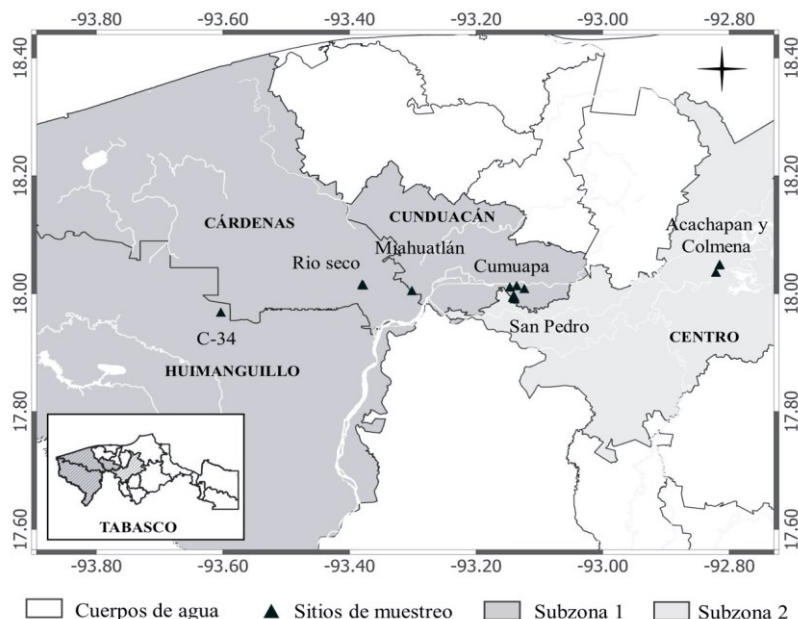


Figura 1. Transecto de comunidades de los municipios de Huimanguillo, Cárdenas, Cunduacán en la subzona 1, y del Centro, en la subzona 2 en Tabasco, donde se colectaron plantas de chile habanero con marchitamiento, en la zona hidrológica Grijalva.

Figure 1. Transect of communities of the municipal areas of Huimanguillo, Cárdenas, Cunduacán in subzone 1, and of Centro, in subzone 2 in Tabasco, where habanero pepper plants with wilt were collected, in the Grijalva hydrological zone.

microrganismos asociados, se cortaron pequeños fragmentos de tejido, desinfectados, lavados y secos se sembraron en medio de cultivo V8-Agar y se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad durante siete días en una incubadora Prendo®. Los cultivos se purificaron utilizando el método de punta de hifa siguiendo la metodología de Ortiz-García (1996). La identificación a nivel de género se apejó a las claves de Barnett y Hunter (1972) para *Fusarium* y Erwin y Ribeiro (1996) para *Phytophthora*.

Pruebas de patogenicidad en plantas de chile habanero. La prueba de patogenicidad se realizó con cada microorganismo aislados de plantas marchitas de chile habanero de 60 días de edad, *Phytophthora* CH132; *Fusarium* CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16, además, se empleó la cepa de *P. capsici*

60-day old habanero pepper plants, *Phytophthora* CH132; *Fusarium* CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16. Additionally, we used the *P. capsici* strain CPV302, from national collections. In this way, a pair of disks, 0.5 cm in diameter from young cultures, were stuck to the bottom of the base of the stem to infect it by mycelial contact, then incubated in a wet chamber. Daily supervision helped register the morphological changes in the 35 habanero plants used in this test with the seven isolations (five plants per isolation) for a period of 16 days, along with five non-inoculated plants taken as a control.

Pathogenicity tests on cocoa fruits. Using strains CH132 (*Phytophthora* isolated from a habanero pepper plant), PC161.2, PC219 (*P. capsici* isolated

CPV302 de colecciones nacionales. Así, un par de discos de 0.5 cm de diámetro, de colonias jóvenes, se colocaron adherido a la base del tallo para infectarlo por contacto micelial e incubadas en cámara húmeda. La supervisión diaria permitió registrar los cambios morfológicos en las 35 plantas de chile habanero empleadas en esta prueba con los siete aislamientos (cinco plantas por aislamiento) por un periodo de 16 días; además, de cinco plantas no inoculadas tomadas como testigo.

Prueba de patogenicidad sobre mazorca de cacao. Con las cepas CH132 (*Phytophthora* aislada de chile habanero), PC161.2, PC219 (*P. capsici* aisladas de chile empleadas como referencia) y CPM04 (de *Phytophthora* aisladas de cacao de Tabasco como testigos positivos), se realizó la prueba de patogenicidad sobre mazorcas de cacao. Para esta prueba se emplearon mazorcas, en etapa de madurez fisiológica de cacao del ecotipo Guayaquil. Éstas, después de lavadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y, después lavadas en tres recipientes con agua destilada estéril, fueron introducidas en una caja plástica igualmente esterilizada, con una tela esterilizada y húmeda en el fondo para aclimatarlas por 12 horas. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, fueron tomados y depositados sobre la epidermis de las mazorcas (sin heridas y en línea recta) cuatro discos de 0.5 mm de diámetro de la zona de crecimiento de las colonias de *Phytophthora*, con cinco días de crecimiento. Las cajas se taparon e incubaron a 25±1 °C en obscuridad durante siete días en una incubadora Prendo®.

Identificación morfológica. La formación de esporangios se indujo de acuerdo con Pérez-Acevedo *et al.* (2017). El aislamiento obtenido del chile habanero (CH132) se confrontó con los tipos de compatibilidad conocidos de A1 (PVM-161.2) y

from chili pepper plants used as a reference) and CPM04 (from *Phytophthora* isolated from Tabasco cocoa as positive controls), a pathogenicity test was carried out on cocoa fruits. The fruits used for these tests were in a stage of physiological maturity, and of the Guayaquil ecotype. After washing by immersion in 1% sodium hypochlorite for one minute, followed by another wash in three containers filled with sterile distilled water, the fruits were placed in an also sterilized plastic box, with a piece of cloth in the bottom to acclimatize them for 12 hours. Next, in a laminar flow cabinet, four disks, each one of which was 0.5 mm in diameter, were taken from the growth area of the *Phytophthora* cultures after five days of growth and placed on the epidermis of the fruits (without lesions and in a straight line). The boxes were covered and incubated at 25±1 °C in the dark for seven days in a Prendo® incubator.

Morphological identification. The formation of sporangia was induced following Pérez-Acevedo *et al.* (2017). The isolation obtained from the habanero chili pepper (CH132) was confronted with the known types of compatibility for A1 (PVM-161.2) and A2 (CPV-219) of *P. capsici*. In a dish with a Green Bean-Agar medium culture, a 5 mm disk of isolation CH132 was placed 1 cm away from the reference isolation (A1 or A2). The dishes were kept at 25±1 °C in a Prendo® incubator in the dark for 2 weeks and examined under the Cole Parmer® compound microscope (Fernández-Pavía *et al.*, 2004). The morphological characteristics were compared with those obtained by Stamps *et al.* (1990).

Molecular identification. In order to extract the DNA, the protocol by Leslie and Summerell (2006) was followed, with modifications. The region of the COI (cytochrome oxidase c subunit 1) mitochondrial

A2 (CPV-219) de *P. capsici*. En una caja con medio de cultivo Ejote-Agar, se colocó un disco de 5 mm del aislamiento CH132 a 1 cm de distancia del aislamiento de referencia (A1 o A2). Las cajas se mantuvieron a 25±1 °C en una incubadora Prendo® en oscuridad por dos semanas y se examinaron al microscopio compuesto Cole Parmer® (Fernández-Pavía *et al.*, 2004). Las características morfológicas se compararon con Stamps *et al.* (1990).

Identificación molecular. Para extraer el ADN se siguió el protocolo de Leslie y Summerell (2006) con modificaciones. La región del gen mitocondrial COI (citocromo oxidasa c subunidad 1) fue amplificada con los iniciadores COIF-1 (5'–TCAWCWGMGATGGCTTTTTTCAAC–3') y COIR-1 (5'–RRHWACKTGACTDATRATACCAA–3') que amplifican 727 pb. Las amplificaciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient. Las condiciones para la amplificación fueron: 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min (Robideau *et al.*, 2011). Los fragmentos de ADN fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron secuenciados en Macrogen (Seúl, República de Corea). Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron usando el programa PreGap y Gap. Se creó una secuencia consenso, y se alinearon empleando el software ClustalX2. La identidad de las secuencias primero se realizó por medio del programa web Blast® blastn suite en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para confirmar la identidad de los aislados con secuencias ex-tipo, se llevó a cabo un análisis genético en MEGA® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) aplicando el método Máxima Verosimilitud con 100 repeticiones bootstrap. Se utilizó el modelo de Tamura-Nei para

gene was amplified with primers COIF-1 (5' – TCAWCWGMGATGGCTTTTTTCAAC–3') and COIR-1 (5'–RRHWACKTGACTDATRATACCAA–3'), which amplified 727 pb. The PCR amplifications were carried out in an Eppendorf MasterCycler® Gradient thermocycler. The conditions for the amplification were: 2 min at 95 °C, followed by 35 one-minute cycles at 95 °C, 1 min at 55 °C and a final extension step at 72 °C for 10 min (Robideau *et al.*, 2011). The DNA fragments were purified using the Wizard® SV Gel kit and the PCR Clean-Up System-Promega, following the manufacturer's instructions. The PCR products were sequenced in Macrogen (Seoul, South Korea). The sequences obtained were assembled and edited using the program PreGap y Gap. A consensus sequence was created, and they were aligned using the software ClustalX2. The identity of the sequences was first carried out using the web program Blast® blastn suite on NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To confirm the identity of the isolations with ex-type sequences, a genetic analysis was carried out using MEGA® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), applying the Maximum Likelihood method with 100 bootstrap repetitions. The model by Tamura-Nei was used to infer the evolution (Tamura and Nei, 1993), and *Pythium oopapillum* was used as an external group.

Isolations obtained. The communities of hydrological subzone 1, from which diseased habanero pepper plants were collected, were C-34, in Huimanguillo (S16), Rio Seco (S2) in Cárdenas, Miahuatlán (S11), Cumuapa (S3) and San Pedro (S7) in Cunduacán, where the isolations of *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16) were found to be related. The collected plants displayed slight wilting in the foliage without necrosis in the leaves or stem. In the three sampling

inferir la evolución (Tamura y Nei, 1993), se utilizó a *Pythium ooparium* como grupo externo.

Aislados obtenidos. Las comunidades de la subzona hidrológica 1, de donde se colectaron plantas de chile habanero enfermas fueron C-34, en Huimanguillo (S16), Rio Seco (S2) en Cárdenas, Miahuatlán (S11), Cumuapa (S3) y San Pedro (S7) en Cunduacán, donde se encontraron asociados los aislados de *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16). Las plantas colectadas mostraron marchitamiento ligero en el follaje sin necrosamiento foliar o necrosis de tallo. En los tres sitios de muestreos del municipio de Centro, se colectaron plantas con necrosis foliar y daños tal como señala Pérez-Moreno *et al.* (2005), y donde se obtuvo el aislado CH132 de *Phytophthora*, en Acachapa y Colmena (S13).

Pruebas de patogenicidad en plántulas de chile.

A los seis ddi (días después de la inoculación) con las cepas CH132 se registraron puntos necróticos en la base del tallo y marchitez del follaje (Figura 2 A). A los 16 días se observó una necrosis del tallo y hojas secas (Figura 2 B).

De las plantas marchitas y necrosis en el tallo, se re-aisló *Phytophthora* confirmando los postulados de Koch, señalando a CH132 como patógena y causante la marchitez del chile. Los daños de marchitez y necrosamiento en la base del tallo causada por la cepa CH132 (*Phytophthora*) fue similar al causado por la cepa CPV302 de *P. capsici*. Las plantas testigo y las plantas inoculadas con cepas e de *Fusarium* (CH2, CH3, CH7, CH11 y CH16) no mostraron síntomas.

Prueba de Patogenicidad en mazorcas de Cacao.

Las mazorcas de cacao inoculadas con los discos de micelio de las colonias aisladas de cacao (CPMO 04) a los cuatro días de incubación, dos de los cuatro

sites of the municipal area of Centro, plants with foliar necrosis were gathered, along with plants with other damages as indicated by Pérez-Moreno *et al.* (2005), as well as where the *Phytophthora* isolation CH132 was obtained, in Acachapa and Colmena (S13).

Pathogenicity tests in chili pepper seedlings.

Six dai (days after inoculation) with the strains CH132, necrotic spots were registered on the base of the stem, along with wilting of the foliage (Figure 2 A). Sixteen days later, necrosis was found on the stem and dry leaves (Figure 2 B).

From the wilted plants and with necrosis on the stem, *Phytophthora* was reisolated, confirming Koch's postulates, indicating CH132 as a pathogen and the cause of the wilting of the plant. The damages caused by wilting and necrosis on the base of the stem caused by strain CH132 (*Phytophthora*) was similar to the one caused by *P. capsici* strain CPV302. The control plants and the plants inoculated with e *Fusarium* strains (CH2, CH3, CH7, CH11 and CH16) showed no symptoms.

Pathogenicity tests in cocoa fruits.

In the cocoa fruits inoculated with the mycelium discs of the isolated cocoa cultures (CPMO 04) four days after incubation, two of the four points of inoculation displayed the typical symptoms of the black spot (Ortiz-García, 1996). However, the *Phytophthora* strains isolated from chili peppers from Tabasco and the strains used as a reference displayed no damage on the surface.

Morphological characterization.

Isolation CH132 displayed cenocytic mycelium, caducous sporangia, with a predominance of ovoid and obpyriform. The average length and width for 50 sporangia was 73.72 μm and 37.3 μm respectively; and a length/width ratio of 2.02. Papilla 4.91 μm

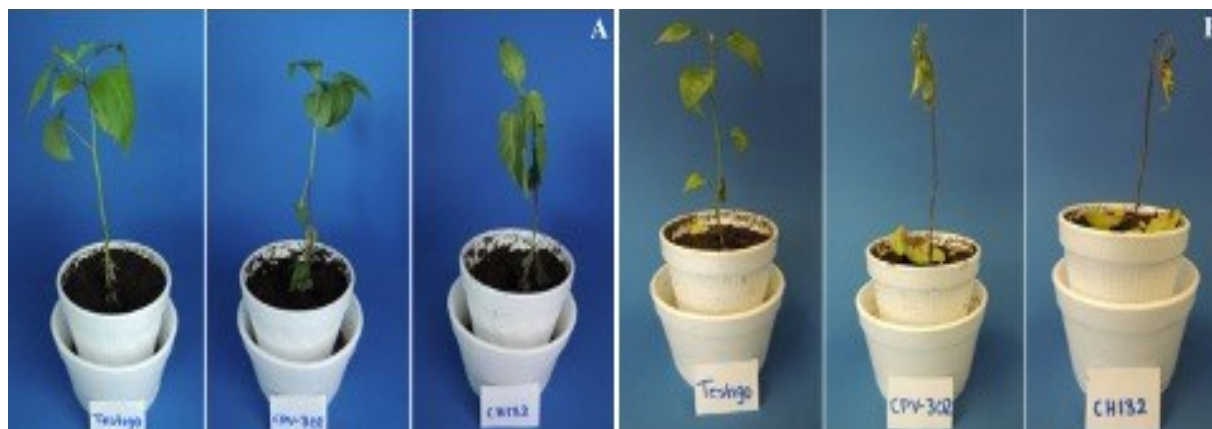


Figura 2. Prueba de patogenicidad de cepas de *Phytophthora*: Testigo, CPV302 y CH132 (de izquierda a derecha) en plántulas de chile habanero. Síntomas a los nueve ddi (A). Síntomas a los 16 ddi (B).

Figure 2. Pathogenicity tests of *Phytophthora* strains: Control, CPV302 and CH132 (from left to right) in habanero chili pepper seedlings. Symptoms nine dai (A). Symptoms 16 dai (B).

puntos de inoculación mostraron los síntomas típicos de ataque de la mancha negra (Ortiz-García, 1996). Sin embargo, las cepas de *Phytophthora* aisladas de chile de Tabasco y las cepas empleadas como referencia, no presentaron daño sobre la corteza.

Caracterización morfológica. El aislamiento CH132 presentó micelio cenocítico, esporangios caducos, con predominio de formas obpiriforme y limoniforme. El promedio de 50 esporangios fue 73.72 μm de largo y 37.3 μm de ancho; y relación largo/ancho de 2.02. Papila de 4.91 μm y pedicelos largos de 189.8 μm , y sin clamidosporas. La oospora es esférica, plerótica, con un promedio de 25.04 μm de largo, 24.57 μm ancho y 3.07 μm de grosor (Figura 3). Anteridio anfigino, con un promedio de 12.6 μm de largo y 11.5 μm ancho. El oogonio mostró un promedio de 29.5 μm de largo y 27.8 μm de ancho. Dimensiones son similares a lo reportado para *P. capsici* por Stamps *et al.* (1990). El tipo de compatibilidad del aislamiento CH132 es heterotálica, tipo A2.

long and pedicels 189.8 μm long, and without chlamydospores. The oospore is spherical, plerotic, with an average length of 25.04 μm , 24.57 μm wide and 3.07 μm thick (Figure 3). The amphigynous antheridium, with an average length of 12.6 μm and 11.5 μm wide. The oogonium displayed an average length of 29.5 μm and a width of 27.8 μm . These dimensions are similar to those reported for *P. capsici* by Stamps *et al.* (1990). The type of compatibility of isolation CH132 is heterothalic, type A2.

Molecular characterization. The DNA amplification of isolation CH132 by PCR with oligonucleotides COIF-1 and COIR-1 created a 727 pb PCR product. The sizes of the PCR products are similar to those reported by Choi *et al.* (2015) with the use of COI. The BLAST analysis helped determine that isolation CH132 has a similarity of 100% with the species of *P. capsici* (Accession numbers AY129166, MH136864, MH013474, MH013475 and HQ261267). This was confirmed with the phylogenetic analysis under the criterion



Figura 3. Características morfológicas del aislamiento CH132. A: Esporangios papilados ($\geq 3.5 \mu\text{m}$) de forma limoniforme y obpiriforme y con pedicelo largo ($>20 \mu\text{m}$). B: Oospora esférica y plerótica, pared del oogonio lisa y anteridio anfígino. Barras $20 \mu\text{m}$.

Figure 3. Morphological characteristics of isolation CH132. A: Papillated sporangia ($\geq 3.5 \mu\text{m}$), ovoid and obpyriform with a long pedicel ($>20 \mu\text{m}$). B: Spherical and pleurotic oospore, smooth oogonium wall and amphigynous antheridium. Bars $20 \mu\text{m}$.

Caracterización molecular. La amplificación del ADN del aislamiento CH132, mediante PCR con los oligonucleótidos COIF-1 y COIR-1 originó un producto de PCR de 727 pb. El tamaño de los productos de PCR son similares a lo reportado por Choi *et al.* (2015) con el uso de COI. El análisis BLAST permitió determinar que el aislamiento CH132 tiene un 100% de similitud con las especies de *P. capsici* (No. de accesoión AY129166, MH136864, MH013474, MH013475 y HQ261267). Esto se confirmó con el análisis filogenético bajo el criterio de máxima verosimilitud, donde se observa la similitud del aislado CH132 con dos de *P. capsici* aislados *Capsicum annuum* (Figura 4).

of maximum likelihood, which shows the similarity of isolation CH132 with two *P. capsici* of *Capsicum annuum* isolations (Figure 4).

The detection of the strain of *P. capsici* represents a warning, because it is a soil inhabitant, where it can survive for several years, as well as the diversity of plants it attacks (Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Erwin and Ribeiro, 1996). Also, the wide dispersion it may have with the use of infected seeds (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002). The low incidence of wilted plants in the sampling sites could have been due to 100% of the chili pepper plantations established with the grafting of seedlings in a nursery, and which have been

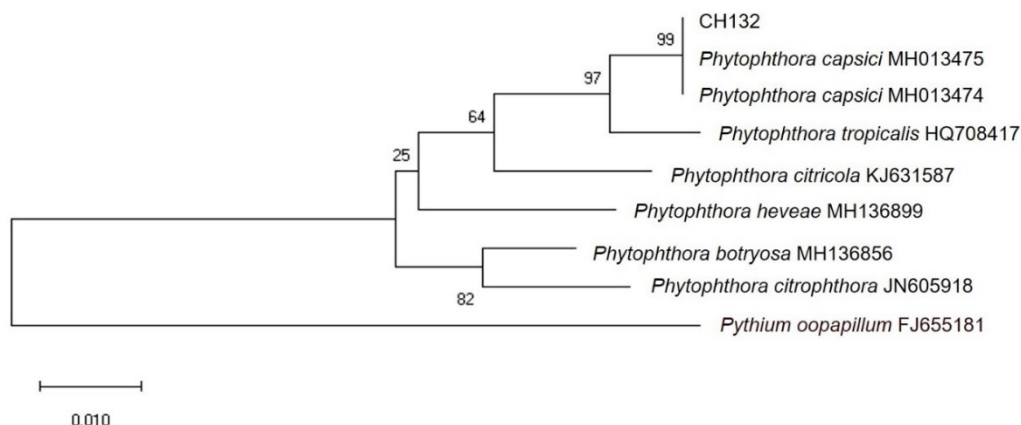


Figura 4. Análisis filogenético, de máxima verosimilitud de *Phytophthora capsici* con otras especies de *Phytophthora* del clado 2 con *Pythium oopapillum* grupoexterno. Los valores bootstrap (1000 repeticiones) de máxima verosimilitud en porcentajes se indican en los puntos de la rama. La barra de la escala indica 0.010 sustituciones por sitio por rama.
Figure 4. Maximum likelihood phylogenetic analysis of *Phytophthora capsici* with other *Phytophthora* species of clade 2 and *Pythium oopapillum* external group. The maximum bootstrap (1000 repetitions) values are indicated as percentages in the points of the branch. The bar of the scale indicates 0.010 substitutions per site per branch.

La detección de cepa de *P. capsici*, representa un hecho de alerta, debido a que es habitante del suelo, donde sobrevive por varios años; además de la diversidad de hortalizas que ataca (Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Erwin y Ribeiro, 1996). Asimismo, la amplia dispersión que se puede tener al emplear semillas infectadas (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002). La baja incidencia de plantas marchitas en los sitios de muestreo, pudo deberse a que el 100% de las plantaciones de chile se establecieron por trasplante de plántulas desarrolladas en vivero, y que son áreas abiertas al cultivo de chile uno o dos años atrás, por lo que se puede esperar que aún no sea alta la incidencia del patógeno en dichas zonas. La marchitez en plantas de chile no es exclusiva del ataque de *Phytophthora*, también puede deberse al ataque de otros patógenos como *Fusarium* o *Rhizoctonia* (Vásquez *et al.*, 2009; Anaya-López *et al.*, 2011; Lozano *et al.*, 2015; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Esto puede ser posible porque en el suelo habitan una gran diversidad de microorganismos como hongos, bacterias con la capacidad de

areas open to the planting of chili pepper plants for one or two year ago, therefore the incidence of the pathogen in the area can expected to be low. Wilting in chili pepper plants is not exclusive to the attack of *Phytophthora*, but can also be due to the attack of other pathogens, such as *Fusarium* or *Rhizoctonia* (Vásquez *et al.*, 2009; Anaya-López *et al.*, 2011; Lozano *et al.*, 2015; Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). This may be possible because in the soil there are a large diversity of microorganisms such as fungi or bacteria with the ability to cause wilt in the chili pepper crop (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). There are non-pathogenic species of *Fusarium* or special proven ways to reduce the incidence and severity of diseases. It is important to understand that widening the chili pepper crop to the cocoa-producing areas favors a scenario of overpopulation of *Phytophthora* in cocoa and chili peppers which, in the medium term, could undergo severe losses due to the sexual reproduction between both species (Hurtado-González and Lamour, 2009), given the evidence that *P. capsici* is near the cocoa-

causar marchitez en el cultivo de chile (Pérez-Acevedo *et al.*, 2017). Existen especies de *Fusarium* no patogénicas o formas especiales que han sido probadas para reducir la incidencia y severidad de enfermedades. Es importante comprender que la ampliación del cultivo de chile hacia las zonas cacaoteras, favorece un escenario con sobrepoblaciones de *Phytophthora* de cacao y chile, que a mediano plazo, podría lamentarse por la reproducción sexual entre ambas especies (Hurtado-González y Lamour, 2009) dada la evidencia que *P. capsici* está cerca de la zona cacaotera, con signo de compatibilidad A2 y que *P. capsici* Tsao y Alizadeh (1988), cuya proporción de compatibilidad A1 supera el 95% en la planicie y de 70% en las partes altas de Tabasco (Ortiz-García, 1996).

En conclusión, se identificó a *P. capsici* en plantas de chile habanero en zonas previamente cacaoteras (Acachapa y Colmena, Centro, Tabasco), donde el aislamiento de *Phytophthora* (CH132) fue patogénico en plantas de chile y no así de aislamientos de *Fusarium* en la prueba de patogenicidad. Por lo anterior, se sugiere que la producción de chile debe canalizarse en zonas no cacaotera de Tabasco.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que le otorgaron para la realización de sus estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Albañil JJA, Mariscal ALA, Martínez MTO, Anaya L JL, Cisneros LHC y Pérez RHA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Pub. Esp. 11:2191-2197. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263138103017>
- 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

producing areas, with signs of A2 compatibility and *P. capsici* Tsao and Alizadeh (1988), proportion of A1 surpasses 95% in the plains and 70% in the highlands of Tabasco (Ortiz-García, 1996).

In conclusion, *P. capsici* was identified in habanero pepper plants in previously cocoa-producing areas (Acachapa and Colmena, Centro, Tabasco), where the isolation of *Phytophthora* (CH132) was pathogenic in chili pepper plants and was not the case for *Fusarium* isolations in the pathogenicity test. Due to this, the chili pepper production is suggested to be channeled to areas other than the cocoa-producing areas of Tabasco.

ACKNOWLEDGEMENTS

The main author would like to thank the National Science and Technology Council (CONACYT) for the scholarship granted to complete his Master's.

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

- resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(3): 373-383. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263119714006>
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota, USA. 273 p.
- Choi Y, Beakes G, Glockling S, Kruse J, Nam B, Nigrelli L, Ploch S, Shin H, Shivas RG, Telle S, Voglmayr H and Thines M. 2015. Towards a universal barcode of oomycetes – a comparison of the *cox1* and *cox2* loci. *Molecular Ecology Resources* 15(6):1275–1288. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12398>
- Dandurand LM and Menge JA. 1992. Influence of *Fusarium solani* on citrus root rot caused by *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora*. *Plant and Soil* 144:13-21. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00018840.pdf>
- Donahoo RS and Lamour KH. 2008. Interspecific hybridation and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycology* 100: 911-920.
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562p.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. 2017. Countries by commodity. [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity\\_imports](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_imports) (consulta, junio 2019).

- Fernández-Pavía SP, Biles CL, Waugh ME, Onsurez-Waugh K, Rodríguez-Alvarado G and Liddell CM. 2004. Characterization of southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:82-89. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222111>
- Hurtado-González OP y Lamour KH. 2009. Evidence for inbreeding and apomixis in close crosses of *Phytophthora capsici*. *Plant pathology* 58(4): 715-722. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02059.x>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Blackwell Publishing. Iowa USA 388p.
- López-López R, Inzunza-Ibarra MA, Fierro-Álvarez A y Palma-López DJ. 2018. Fechas de trasplante y productividad del chile habanero con riego por goteo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(1): 51-64. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.847>
- Lozano AN, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta ME, Aguilar RVH y Ayala EV. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en la Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 31-53. <http://redalyc.org/articulo.oa?id=61240687003>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Montes-Belmont R y De los Santos L. 1989. Especies de *Phytophthora* aisladas de cacao en México y su distribución geográfica. *Turrialba* 39(4): 473-476. Morales-Valenzuela G, Redondo-Juárez E, Covarrubias-Prieto J y Cárdenas-Soriano E. 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici* Leo. en semilla de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 94-97.
- Ortiz-García CF. 1996. Etude le la diversité genetique de populations de *Phytophthora* pathogenes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*cocos nucifera* L.). These Doctorat, (Science) Université Paul Sabatier de Toulouse, France. 85p.
- Pérez-Acevedo CE, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Perales-Segovia C, Enríquez del V R y Villegas-Aparicio Y. 2017. Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(2): 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>
- Pérez-Moreno L, Casillas-Barajas AS y Ramírez-Malagón R. 2005. El cultivo del chile y su importancia económica en el norte del estado de Guanajuato, México. Universidad de Guanajuato. ICA. Guanajuato. México. 109pp.
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, Chitty DW, Désaulniers N, Eggertson QA, Gachon CMM, Hu CH, Küpper FC, Rintoul TL, Sarhan E, Verstappen ECP, Zhang Y, Bonants PJ, Ristaino JB and Lévesque CA. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11(6): 1002-1011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- SIAP, Sistema de Información Agrícola y Pecuaria. 2015. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp) (consulta, junio 2019).
- 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 annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 134-147. <http://redalyc.org/articulo.oa?id=61212195006>
- Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ and Hall GS. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycology Papers* 162:1-28.
- Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tsao PH and Alizadeh A. 1988. Recent advances in the taxonomy and nomenclature of the So-Called “*Phytophthora palmivora*” MF4 occurring on cocoa and other tropical crops. Santo Domingo, Dominican Republic. 441-445pp.
- Vásquez LA, Tlapal BB, Yáñez MMJ, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del ‘chile de agua’ (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fito-tecnia Mexicana* 32(2): 127-134. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61011222007>

# *In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*

## Biocontrol *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* con antagonistas

Sarahi Rubio-Tinajero, Eduardo Osorio-Hernández\*, Benigno Estrada-Drouaillet, José Hugo Tomás Silva-Espinosa, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Centro Universitario Adolfo López Mateos, C.P. 87140, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México; Ma. De Lourdes Rodríguez-Mejía, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología, Carretera México - Texcoco Km. 38.5, 56230 Texcoco de Mora, México; Raúl Arnulfo Nava-Juárez, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62730. Autor para correspondencia: eosorio@docentes.uat.edu.mx.

Recibido: 09 de Abril, 2021.

Aceptado: 20 de Julio, 2021.

Rubio-Tinajero S, Osorio-Hernández E, Estrada-Drouaillet B, Silva-Espinosa JHT, Rodríguez-Mejía MDL and Nava-Juárez RA. *In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 515-528.  
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-1>

Primera publicación DOI: 10 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 10, 2021.

**Resumen.** El objetivo fue evaluar el efecto antagonístico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* y dos aislados de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi*. Se identificó morfológicamente a *Bacillus*, aislado de muestras de suelo de plantaciones de *Aloe vera* y se realizó una confrontación de cultivos duales modificada, colocando en el centro de la caja Petri *F. oxysporum* y en

**Abstract.** The objective was to evaluate the antagonistic effect *in vitro* of native strains of *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* and two isolates of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. *Bacillus*, isolated from soil samples of *Aloe vera* plantations, was morphologically identified and a modified dual culture confrontation was carried out, placing the *F. oxysporum* in the center of the Petri dish and *Bacillus* in the four cardinal points; it was arranged under a completely randomized experimental design with five repetitions, the variables registered were percentage of antagonism, inhibition halo and concentration of conidia. For *Trichoderma* they were confronted against *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi* with a dual confrontation, a percentage of inhibition and antagonism classification were determined. In the confrontation of *T. asperellum* it obtained a percentage of inhibition of 70.5% against *F. oxysporum* and 41.9% against *D.*

los cuatro puntos cardinales las bacterias de *Bacillus*; para esto se dispuso bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, las variables registradas fueron porcentaje de antagonismo, halo de inhibición y concentración de conidios. Para *Trichoderma* se confrontaron frente a *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* con una confrontación dual y se determinó porcentaje de inhibición y clasificación de antagonismo. En la confrontación de *T. asperellum* obtuvo un porcentaje de inhibición de 70.5 % frente a *F. oxysporum* y 41.9 % frente a *D. chrysanthemi*. En cuanto a los halos de inhibición de *Bacillus* (B5 y B4) obtuvieron 4 mm. En la concentración de conidios B5 mostró 1.3, B4 2.6 y el testigo 12.6 esporas por dilución. *Trichoderma* y *Bacillus* representan una alternativa viable para el control de *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi*.

**Palabras claves:** Control biológico, hongo, bacteria, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *Bacillus* spp.

El *Aloe vera* es un cultivo de gran importancia económica y relevancia para la agricultura y la industria en el mundo. México destaca como principal país productor y exportador de materia prima de sábila (Álvarez *et al.*, 2012). Tamaulipas es considerado el estado con mayor producción en el país y una superficie de siembra que va en aumento; sin embargo, se ha detectado la presencia de microorganismos fitopatógenos (Rubio *et al.*, 2020). Una de las limitantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos se deben al ataque de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Pectobacterium* spp. (Jiménez, 2015), de los cuales *F. oxysporum* se considera uno de los hongos fitopatógenos en *Aloe vera*, causante de la podredumbre de la base del tallo, amarillamiento, marchitamiento de las hojas y por consiguiente la muerte de la planta. Por otra parte, el género *Erwinia* se reportan en diferentes

*chrysanthemi*. Regarding the inhibition halos of *Bacillus* (B5 and B4), they obtained 4 mm. In the conidia concentration B5 showed 1.3, B4 2.6 and the control 12.6 spores per dilution. *Trichoderma* and *Bacillus* represent a viable alternative for the control of *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi*.

**Key words:** Biological control, fungus, bacteria, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *Bacillus* spp.

*Aloe vera* is a crop of great economic importance and relevance to agriculture and industries around the world, and Mexico stands out as the main producing and exporting country of aloe raw material (Álvarez *et al.*, 2012). Tamaulipas is considered the state with the highest production rate in the country and a production surface area on the rise, although the presence of phytopathogenic microorganisms has been found (Rubio *et al.*, 2020). One of the limitations that increase losses and affect yields is the attack of *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Pectobacterium* spp. (Jiménez, 2015), one of which, *F. oxysporum*, is considered as one of the phytopathogenic fungi in aloe that causes rotting of the stem base, yellowing, wilting of the leaves and therefore, the death of the plant. On the other hand, the genus *Erwinia* is reported in several areas of the world as the causal agent of bacterial rot in roots, stem and leaves of *Aloe* spp. (Rubio *et al.*, 2020).

Diseases caused by phytopathogens are controlled using chemical products and the most common active ingredients against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* are Carbendazim, Mancozeb, Fosetyl-Al, Hymexazol, Chinosol and Metalaxyl-M + Mancozeb (Mannai *et al.*, 2018). However, the use of agrochemicals has caused several controversies due to their high costs, toxicity levels and environmental damages (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Due to this,



partes del mundo como agente causal de la pudrición bacteriana en raíz, tallo y hojas del *Aloe* spp. (Rubio *et al.*, 2020).

Las enfermedades causadas por fitopatógenos son controladas mediante productos químicos y los ingredientes activos más comunes contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum* son Carbendazim, Mancozeb, Fosetyl-Al, Hymexazol, Chinosol y Metalaxyl-M + Mancozeb (Mannai *et al.*, 2018). Sin embargo, el empleo de agroquímicos, ha generado diversas controversias debido a sus altos costos, toxicidad y daños ambientales (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Debido a esto se han buscado alternativas de control biológico, puesto que no genera efecto residual y contaminación (Pappas *et al.*, 2020). Existe un grupo importante de microorganismos que presentan efectos antagónicos frente a otros microorganismos fitopatógenos (Sánchez-León y Bustos, 2020), entre los que destacan *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. que se caracterizan por ser microorganismos que muestran efectos antagónicos (Fiorentino *et al.*, 2016). Por ejemplo, *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* se han utilizado por poseer mecanismos de acción contra *Fusarium solani* (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). Además, tiene efecto antagónico frente a bacterias fitopatógenas pectolíticas ya que es capaz de inhibirlas un 32.4% (Astorga-Quirós *et al.*, 2014). Lo cual podría deberse gracias a sus propiedades enzimáticas, ya que secreta proteasas, quitinasas y glucanasa, que dañan la pared celular del hongo fitopatógeno causando una lisis que facilita el micoparasitismo (Ribeiro *et al.*, 2019). Por otro lado, *Bacillus* spp. es capaz de inducir crecimiento en plantas, aun cuando esta tenga su sistema radicular afectado por *Fusarium* spp. (Castro *et al.*, 2019). Además, se han reportado antagonismo en la confrontación de *B. subtilis* frente a *Fusarium* spp. (Solano-Báez *et al.*, 2021), ya que produce antibióticos y enzimas, así también ayuda a

searches for biological control alternatives have been carried out, since they produce no residual effects or contamination (Pappas *et al.*, 2020). There is an important group of microorganisms that display antagonistic effects on other phytopathogenic microorganisms (Sánchez-León and Bustos, 2020), including *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp., which characteristically display antagonistic effects (Fiorentino *et al.*, 2016). For example, *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* have been used for their action mechanisms against *Fusarium solani* (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). It also has an antagonistic effect against pectolytic phytopathogenic bacteria, since it is able to inhibit them by 32.4% (Astorga-Quirós *et al.*, 2014). This may be due to its enzymatic properties, since it secretes proteases, chitinases and glucanase, which damage the cell wall of the phytopathogenic fungus, causing a lysis that facilitates mycoparasitism (Ribeiro *et al.*, 2019). On the other hand, *Bacillus* spp. can induce growth in plants, even when their root systems have been affected by *Fusarium* spp. (Castro *et al.*, 2019). Antagonism has also been reported in the confrontation of *B. subtilis* with *Fusarium* spp. (Solano-Báez *et al.*, 2021), since it produces antibiotics and enzymes and also helps in the solubilization of phosphates and the biological fixation of nitrogen (Miljaković *et al.*, 2020). Due to this, the aim of this investigation was to determine the antagonistic effect of native strains of *Bacillus* spp., *T. asperellum* and *T. harzianum* against *F. oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi* under *in vitro* conditions.

The tests were carried out in the microbiology lab of the Central Integral de Laboratorios (CILO), in the Faculty of Engineering and Sciences of the Autonomous University of Tamaulipas in August, 2019. Native, previously identified microorganisms were used, which were a part of the ceparium of the microbiology laboratory: *T.*

la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno (Miljaković *et al.*, 2020). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antagónico de cepas nativas de *Bacillus* spp., *T. asperellum* y *T. harzianum* frente a *F. oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* bajo condiciones de *in vitro*.

Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología de la Central Integral de Laboratorios (CILO), en la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas en agosto del 2019. Se utilizaron microorganismos nativos previamente identificados, pertenecientes al cepario del laboratorio de microbiología: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* que fueron aislados de lotes con plantas de *Aloe barbadensis*.

Para obtener aislados de *Bacillus* se procedió a la recolección de muestras de suelo, se usó el método de cinco de oros, obteniendo cinco muestras de suelo de 1 kg de dos lotes de plantaciones de *Aloe vera* en la localidad de Padilla, Tamaulipas (23° 59' 26.1" N, 98° 56' 39.0" W). De cada muestra se tomaron 10 g de suelo y se resuspendieron en 90 mL de agua destilada estéril, se realizaron diluciones seriadas hasta  $1 \times 10^{-3}$  y fue sometida a un tratamiento térmico de 85 °C durante 15 min, posteriormente se extrajeron 100 µL y se inocularon en medio papa dextrosa agar (PDA), se incubaron a  $27 \pm 1$  °C durante un lapso de 24 a 48 h, transcurrido este tiempo se obtuvieron colonias de bacterias de morfología variada, las cuales fueron seleccionadas por sus características de inhibición.

Cada especie fue descrita macroscópicamente de acuerdo a la morfología de las colonias, forma, borde, elevación, superficie, tamaño, color, consistencia y acompañado de un registro fotográfico; además, se determinó su morfología celular mediante la tinción Gram y el tipo de pared de las especies a las 24 y 48 h de incubación, con el fin de

*asperellum*, *T. harzianum*, *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi*, which were isolated from plots with *Aloe barbadensis* plants.

In order to obtain *Bacillus* isolations, samples were collected from the soil using the five of gold method, and five samples were taken from 1 kg of soil from two *Aloe vera* plantations in Padilla, Tamaulipas (23° 59' 26.1" N, 98° 56' 39.0" W). From each sample, 10 g of soil were taken and resuspended in 90 mL of sterile distilled water; serial dilutions were performed until  $1 \times 10^{-3}$  and it underwent a thermal treatment at 85 °C for 15 min. Next, 100 µL were extracted and inoculated in a potato-dextrose-agar (PDA) medium, incubated at  $27 \pm 1$  °C for 24 to 48 h, after which bacterial cultures of varied morphologies were obtained, which were chosen for their inhibition characteristics.

Each species was described macroscopically according the morphology of the cultures: shape, edges, elevation, surface, size, color, consistency, and a photograph was also taken; in addition, its cell morphology was determined by Gram's staining, with the type of cell walls, after 24 and 48 h of incubation, in order to observe the microscopic morphology at 100X (Calvo and Zúñiga, 2010). Once the presence of bacterial endospores was verified, a sample was taken and placed in nutritious agar (AN) for 24 h to  $27 \pm 1$  °C. Tests were carried out for maltose, xylose, mannitol, citrate use, starch hydrolysis de starch, gelatin hydrolysis, growth in NaCl at 7% and growth in anaerobic agar in order to identify *B. subtilis* cultures following the methodology proposed by Reinoso *et al.* (2006). To determine the bacterial species following the methodology by Schaad *et al.* (2001), the bacteria were tested to see if they were able to hydrolyze gelatin, starch, as well as using sugars, citrate and alcohols.

The antagonistic ability of *Bacillus* spp. (B4 and B5) against *F. oxysporum* was evaluated with

observar la morfología microscópica a 100X (Calvo y Zúñiga, 2010). Una vez que se comprobó la presencia de endosporas bacterianas, se tomó una muestra y se colocó en agar nutritivo (AN) durante 24 h a  $27 \pm 1$  °C. Se realizaron las pruebas de maltosa, xilosa, manitol, utilización de citrato, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, crecimiento en NaCl al 7% y crecimiento en agar anaerobio con el fin de identificar colonias de *B. subtilis* según la metodología propuesta por Reinoso *et al.* (2006). Para determinar las especies de bacterias de acuerdo con la metodología de Schaad *et al.* (2001), las bacterias fueron sometidas a pruebas para ver si eran capaces de hidrolizar gelatina, almidón, así como utilizar azúcares, citrato y alcoholes.

La capacidad antagonista de *Bacillus* spp. (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* fue evaluada mediante dos tratamientos (B4 y B5) con cinco repeticiones cada uno a dos temperaturas de incubación. Para esto, se utilizó la metodología modificada de Corrales *et al.* (2011), que consistió en la siembra de *F. oxysporum* en el centro de las cajas Petri con medio PDA y AN; para el caso de *Bacillus* spp. se colocaron en los cuatro puntos cardinales. Para el caso del testigo solo se inóculo *F. oxysporum*. Enseguida se incubaron a  $25 \pm 1$  °C y  $27 \pm 1$  °C. Posteriormente, se midió el crecimiento radial de *F. oxysporum* cada 24 h, hasta que llenó la caja Petri y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y se empleó la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020) y, según los resultados se estableció la escala propuesta por Corrales *et al.* (2011). Además, se determinó el número de esporas, para ello se tomó un fragmento de medio PDA con *F. oxysporum* y se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de agua estéril, posteriormente se agitó durante 3 min, se realizó un conteo en una cámara de Neubauer y los resultados fueron sometidos a una comparación de medias.

Para *T. asperellum* y *T. harzianum* se colocaron 5 mm de micelio activo a 4 cm de distancia de

two treatments (B4 and B5) with five repetitions each at two incubation temperatures. In order to do this, the methodology by Corrales *et al.* (2011) was used, with modifications, which consisted in planting *F. oxysporum* in the center of the Petri dishes with PDA medium and AN. For the case of *Bacillus* spp., it was placed in the four cardinal points. In the case of the control, only *F. oxysporum* was inoculated. Afterwards, they were incubated at  $25 \pm 1$  °C and  $27 \pm 1$  °C. Next, the mycelial growth of *F. oxysporum* was measured every 24 h until it filled the Petri dish and using the data obtained, the percentage of root growth inhibition (PICR) was calculated, and the formula used by Ávila *et al.* (2020) was used. Based on the results, the scale proposed by Corrales *et al.* (2011) was established. In addition, the number of spores was determined by taking a piece of PDA medium with *F. oxysporum*, which was then placed in a test tube with 1 mL of sterile water. It was shaken for 3 min, then the spores were counted in a Neubauer chamber; the results underwent a comparison of means.

For *T. asperellum* and *T. harzianum*, 5 mm of active mycelium was placed 4 cm away from *F. oxysporum*. For the controls, *F. oxysporum* was planted in the center of the Petri dishes, incubated at  $25 \pm 1$  °C for 10 days and measurements were taken of the radial growth of the fungi every 24 h. The antagonism of *T. asperellum* and *T. harzianum* was evaluated with the percentage of inhibition, with the formula used by Ávila *et al.* (2020). In addition, the level of antagonism was determined according to the scale used by Bell *et al.* (1982).

To evaluate the antagonistic ability of *Bacillus* spp. against *D. chrysanthemi*, two treatments, B4 and B5, were established. The methodology consisted in using a 5 mm hole puncher to punch holes into the Petri dishes with AN medium. On the side, sterile AN was mixed with bacteria from the treatments (B4 and B5) at a concentration of  $1 \times 10^6$  UFC and the holes in the four cardinal points

*F. oxysporum*. Para los testigos se sembró *F. oxysporum* en el centro de las cajas Petri y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C por 10 días y se realizaron mediciones cada 24 h del crecimiento radial de los hongos. El antagonismo de *T. asperellum* y *T. harzianum* se evaluó mediante el porcentaje de inhibición empleando la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020). Además, se determinó el nivel de antagonismo de acuerdo a la escala utilizada por Bell *et al.* (1982).

Para evaluar la capacidad antagonista de *Bacillus* spp. frente a *D. chrysanthemi* se establecieron dos tratamientos B4 y B5. La metodología consistió en utilizar un sacabocado de 5 mm con la que se hicieron cuatro huecos en las cajas Petri con medio AN, aparte se preparó AN estéril mezclado con las bacterias de los tratamientos (B4 y B5) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC, se realizó el rellenado de los huecos en los cuatro puntos cardinales. Posteriormente, las cajas se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 24 h, se preparó una suspensión de *D. chrysanthemi* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC en un atomizador y se aplicó en cada tratamiento por aspersión. La variable a evaluar fue el halo de inhibición, y se midió el crecimiento cada 24 h durante una semana. Por otro lado, para medir la capacidad antagonista de *T. harzianum* y *T. asperellum* (TJ y TP) frente a *D. chrysanthemi* se utilizó la metodología de Corrales *et al.* (2011) con modificaciones, la cual consistió en colocar los aislados de *D. chrysanthemi* el centro de las cajas Petri y los de *Trichoderma* spp. en los cuatro puntos cardinales, para el testigo solo se inóculo *D. chrysanthemi* en el centro de la caja Petri y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C. Se realizaron mediciones del crecimiento radial de las colonias de *D. chrysanthemi* cada 24 h hasta que llenó la caja Petri. Posteriormente, se empleó la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020) para el cálculo del porcentaje de inhibición y se ubicó la escala de Bell *et al.* (1982).

El análisis estadístico de las confrontaciones de antagonismo de *Bacillus* spp. frente a *F. oxysporum*;

were filled. Next, the dishes were incubated at  $25 \pm 1$  °C for 24 h, a suspension of *D. chrysanthemi* was prepared at a concentration of  $1 \times 10^6$  UFC in a spray bottle and sprayed onto each treatment. The variable to evaluate was the inhibition halo and growth was measured every 24 h for one week. On the other hand, to measure the antagonistic ability of *T. harzianum* and *T. asperellum* (TJ and TP) against *D. chrysanthemi*, the methodology by Corrales *et al.* (2011) was used, with modifications, which consisted in placing the *D. chrysanthemi* isolations in the center of the Petri dishes and the *Trichoderma* spp. isolations in the four cardinal points. For the control, *D. chrysanthemi* was only inoculated in the center of the Petri dish and they were all incubated at  $25 \pm 1$  °C. Measurements of the radial growth of the *D. chrysanthemi* cultures were taken every 24 h until the Petri dish was full. Later, the formula used by Ávila *et al.* (2020) was used to calculate the percentage of inhibition and it was located on the scale by Bell *et al.* (1982).

The statistical analysis of the antagonistic confrontations between *Bacillus* spp. and *F. oxysporum*; *T. asperellum* and between *T. harzianum* and *D. chrysanthemi* and *F. oxysporum* were submitted to a covariance analysis test (ANCOVA). In the case of *Bacillus* spp. against *D. chrysanthemi*, an analysis of variance was used (ANOVA), as was the case for counting spores from the confrontations between *Bacillus* spp. and *F. oxysporum* with a temperature of  $27 \pm 1$  °C. In order to find differences between treatments, Tukey's comparison of means ( $P < 0.05$ ) was applied using the SAS statistical package SAS (version 9.0).

Twelve bacterial cultures with a variety of morphologies were isolated and two bacteria were selected (B4 and B5) for their inhibition characteristics, which displayed macroscopic characteristics of the *Bacillus* genus, producing whitish, large, extended and irregular cultures. They were Gram positive, with a bacillar shape,



*T. asperellum* y *T. harzianum* frente a *D. chrysanthemi* y *F. oxysporum* se sometieron a un análisis de covarianza (ANCOVA). En el caso de *Bacillus* spp. contra *D. chrysanthemi* se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), de igual manera para el conteo de esporas de las confrontaciones de *Bacillus* spp. frente a *F. oxysporum* con temperatura de  $27 \pm 1$  °C con el fin de detectar diferencias entre los tratamientos, se aplicó una comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ), con el paquete estadístico SAS (versión 9.0).

Se aislaron 12 colonias de bacterias de morfología variada, de las cuales se seleccionaron dos bacterias (B4 y B5) por sus características de inhibición, las cuales presentaron características macroscópicas del género *Bacillus*, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares. Fueron Gram positiva, forma bacilar, con motilidad y la posición de la spora central, la temperatura en la que se desarrollaron fue a 45 °C con un buen crecimiento y nulo a 65 °C; mostraron buen crecimiento a un pH de 5.7, se desarrollaron en NaCl al 7%. En la prueba de metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa no tuvieron un crecimiento aeróbico y si mostraron degradación de la glucosa, los resultados de maltosa, manitol, arabinosa, xilosa, utilización de citrato, hidrólisis almidón, hidrólisis gelatina y oxidasa dieron positivo indicando que la bacteria *Bacillus* spp. pertenece a la especie *subtilis*.

Los resultados de las dos cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* indicaron que no hubo diferencia significativa entre los aislados y ambas disminuyeron el radio de crecimiento (RCA) de *F. oxysporum*. No obstante, en la temperatura de incubación a  $25 \pm 1$  °C, B4 presentó 49.6% de inhibición y se extendió alrededor del hongo mostrando competencia por espacio y nutrientes. En cuanto a la escala utilizada mostró la clasificación media. Por el contrario, B5 obtuvo un porcentaje de

with motility and the position of the spore is central. The temperature at which they developed was 45 °C with an adequate growth, yet no growth was observed at 65 °C; they displayed an adequate growth rate at a pH of 5.7 and they developed in 7% NaCl. In the oxidative and/or fermentative glucose metabolism test, they displayed no aerobic growth, yet they did present glucose degradation. The tests for maltose, mannitol, arabinose, xylose, the use of citrate, starch hydrolysis, gelatin hydrolysis and oxidase were positive, indicating that the bacterium *Bacillus* spp. belongs to the species *subtilis*.

The results of both *B. subtilis* strains (B4 and B5) against *F. oxysporum* indicated no significant differences between isolations and both reduced the growth radii (RCA) of *F. oxysporum*. Nevertheless, in the incubation temperature of  $25 \pm 1$  °C, B4 presented 49.6% inhibition and it extended around the fungus, displaying competition for space and nutrients. Regarding the scale used, it presented itself in the middle classification. On the other hand, B5 obtained a percentage of antagonism of 39.7% with a low classification (Table 1) and its growth was slow. However, *F. oxysporum* displayed a less populated mycelium and a less intense color than the control.

In the incubation at  $27 \pm 1$  °C (Table 1), B5 proved to have an increase in the degree of inhibition with 43.0% and a middle classification, according to the scale proposed by Corrales *et al.* (2011) because the temperature had an influence on the production of metabolites, since a murky liquid was found, and with a bad odor. On the other hand, B4 reduced its degree of inhibition to 38.7% with a low classification and it produces metabolites that helped reduce the growth of the mycelia. In the latter experiment, B4 and B5 presented a reduction in the production of cottonlike mycelia in the top frontal part (Figure 1). These results were lower than those obtained by Corrales *et al.* (2011),

antagonismo de 39.7 % con una clasificación baja (Cuadro 1), su crecimiento fue lento; sin embargo, *F. oxysporum* mostró un micelio menos poblado y con una coloración de menor intensidad que en el testigo.

En la temperatura de incubación a  $27 \pm 1$  °C (Cuadro 1), se observó que B5 mostró un incremento en el grado de inhibición con un 43.0 % y clasificación media según la escala propuesta por Corrales *et al.* (2011), esto debido a que la temperatura influyó en la producción de metabolitos, ya que se encontró un líquido con turbidez y olor. Por el contrario, B4 disminuyó su grado de inhibición a 38.7 % con una clasificación baja, produjo metabolitos que le permitieron disminuir el crecimiento del micelio. En este último experimento se observó que B4 y B5 presentaron una disminución de la producción de micelio algodonoso en la parte superior frontal (Figura 1). Dichos resultados fueron por debajo de los obtenidos por Corrales *et al.* (2011), quienes reportaron porcentajes entre el 40 y 70 %, esta variabilidad se atribuye a que cada cepa cuenta con diferente adaptabilidad y quizás la síntesis de metabolitos secundarios sea dependiente de la temperatura de incubación, de tal manera que, dependiendo de la temperatura, se produzcan algunos metabolitos con menor o mayor efecto hacia este patógeno. En

who reported percentages of 40 to 70%. This variability can be explained by each strain having a different adaptability, and perhaps the synthesis of secondary metabolites depends on the incubation temperature so that, depending on the temperature, some metabolites may be produced with a greater or lower effect on that pathogen. In such results, *Bacillus* spp. behaves differently, which may be due to what was described by Sánchez *et al.* (2015), who mentioned that there is a wide phenotypic, biochemical, serological and genetic diversity, even amongst the members of the same species.

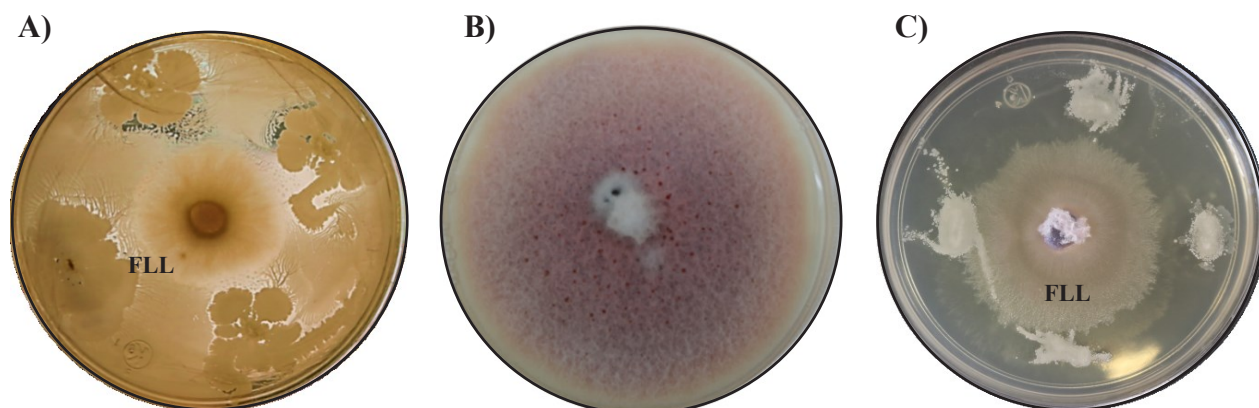
According to the conidial concentration results, a significant difference was observed between the treatments and the control, since the control displayed an average of 12.6 spores per dilution, unlike the B5 treatments which obtained 1.3 spores, and B4, 2.6 spores, which proves that the treatments caused a reduction in the concentration of spores and the color of *F. oxysporum* was reduced and paler. The effect of the antagonism of *B. subtilis* could be due to its large production of bioactive compounds, among which cyclic lipopeptides (CLP) such as surfactin, iturin and fengycin stand out (Cochrane and Vederas, 2016). Additionally, *Bacillus* spp. produces antibiotics and enzymes (Miljaković *et al.*, 2020).

**Cuadro 1. Porcentajes de antagonismo de cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) sobre *F. oxysporum* a dos temperaturas de incubación, bajo condiciones *in vitro*.**

**Table 1. Percentages of antagonism of *B. subtilis* strains (B4 and B5) over *F. oxysporum* at two incubation temperatures, under *in vitro* conditions.**

| Aislamiento | Inhibición (%) a 26 °C | Clasificación de antagonismo <sup>z</sup> | Inhibición (%) a 28 °C | Clasificación de antagonismo <sup>z</sup> |
|-------------|------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| B5          | 39.7 a <sup>y</sup>    | Baja                                      | 43.0 a <sup>y</sup>    | Media                                     |
| B4          | 49.6 a                 | Media                                     | 38.7 a                 | Baja                                      |

<sup>y</sup> Tratamientos con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ( $P=0.05$ ); F) *F. oxysporum*; B4 y B5) *B. subtilis*; <sup>z</sup> Escala de antagonismo según Corrales *et al.* (2011). / <sup>y</sup> Treatments with the same letter in the same column are statistically equal ( $P=0.05$ ); F) *F. oxysporum*; B4 and B5) *B. subtilis*; <sup>z</sup> Scale of antagonism according to Corrales *et al.* (2011).



**Figura 1.** Efecto antagonístico de cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* (FLL); A) Aislamiento B4 a una temperatura de  $25\pm 1$  °C, rodea *F. oxysporum* mostrando competencia por espacio y nutrientes; B) Testigo de *F. oxysporum*; C) Aislamiento B5 a una temperatura de  $27\pm 1$  °C rodeando a *F. oxysporum*, mostrando producción de metabolitos.

**Figure 1.** Antagonistic effect of *B. subtilis* strains (B4 and B5) against *F. oxysporum* (FLL); A) Isolation B4 at a temperature of  $25\pm 1$  °C, it surrounds *F. oxysporum* displaying competition for space and nutrients; B) Control of *F. oxysporum*; C) Isolation B5 at a temperature of  $27\pm 1$  °C surrounding a *F. oxysporum*, displaying a production of metabolites.

dichos resultados *Bacillus* spp. se comportan diferente, lo cual podría deberse a lo descrito por Sánchez *et al.* (2015), quienes mencionaron que existe una amplia diversidad fenotípica, bioquímica, serológica y genética incluso entre los miembros de una misma especie.

De acuerdo a los resultados de la concentración de conidios, se observó diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo; ya que el testigo obtuvo un promedio de 12.6 esporas por dilución, a diferencia de los tratamientos B5 obtuvo 1.3 y B4 2.6 esporas, esto prueba que los tratamientos causaron una disminución en la concentración de esporas y el color de *F. oxysporum* se vio disminuido y más tenue. El efecto del antagonismo de *B. subtilis*, podría deberse a su producción amplia de compuestos bioactivos, entre los que destacan los lipopéptidos cíclicos (CLP) como la surfactina, iturina y fengycina (Cochrane y Vederas 2016). Además, *Bacillus* spp. produce antibióticos y enzimas (Miljaković *et al.*, 2020).

In the analysis of covariance of de *T. asperellum* (TJ) and *T. harzianum* (TP) against *F. oxysporum*, there were no significant differences. The confrontation with TJ displayed a growth of 6.9 cm and an inhibition of 70.5% (Table 2), although TP displayed a growth of 6.6 cm and an inhibition of 69.2% and both treatments displayed competition for space and nutrients. Furthermore, the growth radii of *F. oxysporum* decreased as the growth radii for *T. asperellum* and *T. harzianum* grew, which suggests an antagonism. Additionally, both isolations covered half of the surface of the Petri dish on day three of the evaluation, due to its rapid growth, competition for space and nutrients. Likewise, they are classified as class two where *Trichoderma* spp. grows two thirds of the surface of the medium or, in other words, this fungus covers 65% of the Petri dish (Figure 2). These results were better than those reported by Rodríguez-García and Wang-Wong (2020), who confronted native *T. asperellum* strains with *F. oxysporum* and reported

En el análisis de covarianza de *T. asperellum* (TJ) y *T. harzianum* (TP) frente a *F. oxysporum* no hubo diferencias significativas. La confrontación de TJ presentó un crecimiento de 6.9 cm y un 70.5 % de inhibición (Cuadro 2); no obstante, TP presentó un crecimiento de 6.6 cm y un 69.2 % de inhibición, ambos tratamientos mostraron competencia por espacio y nutrientes; además, se observó que los radios de crecimiento de *F. oxysporum* disminuyeron conforme el radio de crecimiento de *T. asperellum* y *T. harzianum* crecía, por lo que se considera que hay antagonismo. Además, se observó que ambos aislados cubrieron la mitad de la superficie de la caja Petri en el día tres de la evaluación, gracias a su rápido crecimiento, competencia por espacio y nutrientes. Así mismo, se clasifican como clase dos donde *Trichoderma* spp. crece dos terceras partes de la superficie del medio; es decir, que este hongo cubre el 65 % de la caja Petri (Figura 2). Estos resultados fueron mejores a los reportados por Rodríguez-García y Wang-Wong (2020), quienes confrontaron cepas nativas de *T. asperellum* frente a *F. oxysporum* y reportaron hasta un 67 % de inhibición, siendo su mejor tratamiento ya que las cepas nativas mostraron ser las más agresivas contra

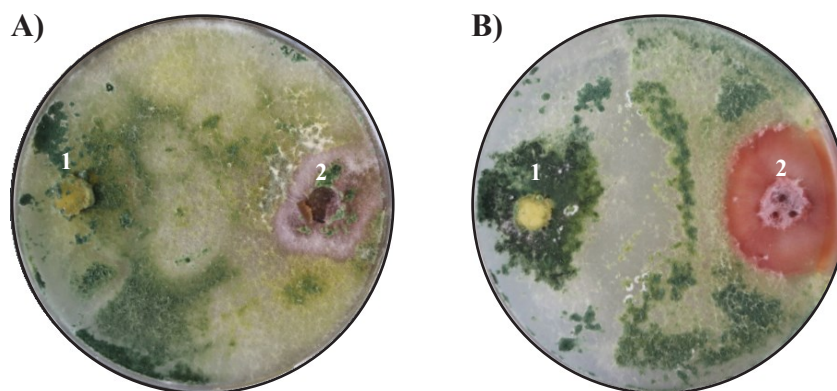
**Cuadro 2.** Porcentajes de antagonismo de *T. asperellum* y *T. harzianum* frente a *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* bajo condiciones *in vitro*.

**Table 2.** Percentages of antagonism of *T. asperellum* and *T. harzianum* against *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi* under *in vitro* conditions.

| Tratamiento | Inhibición (%)      | Clasificación de antagonismo <sup>z</sup> |
|-------------|---------------------|-------------------------------------------|
| TP-F        | 70.5 a <sup>y</sup> | 1                                         |
| TJ-F        | 69.2 a              | 2                                         |
| TP*D1       | 41.9 a              | 1                                         |
| TJ*D1       | 40.2 a              | 2                                         |

<sup>y</sup>Tratamientos con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ( $P=0.05$ ); F: *F. oxysporum*; TJ) *T. asperellum*; TP) *T. harzianum*; D1) *D. chrysanthemi*. <sup>z</sup>Escala de antagonismo según Bell *et al.* (1982). / <sup>y</sup>Treatments with the same letter in the same column are statistically equal ( $P=0.05$ ); F: *F. oxysporum*; TJ) *T. asperellum*; TP) *T. harzianum*; D1) *D. chrysanthemi*. <sup>z</sup>Scale of antagonism according to Bell *et al.* (1982).

a level of inhibition of up to 67%, which was their best treatment, since native strains proved to be the most aggressive against the phytopathogen. The results may be due to what was reported by Andrade-Hoyos *et al.* (2019), who mentioned that *Trichoderma* sp. has the ability of performing



**Figura 2.** A) *Trichoderma harzianum* (1) rodeando a *F. oxysporum* (2) manifestando competencia por espacio y nutrientes en medio PDA; (B) *T. asperellum* (1) rodeando a *F. oxysporum* (2) mostrando competencia por espacio.

**Figure 2.** A) *Trichoderma harzianum* (1) surrounding *F. oxysporum* (2) expressing competition for space and nutrients in a PDA medium; (B) *T. asperellum* (1) surrounding *F. oxysporum* (2) expressing competition for space.



el fitopatógeno. Los resultados podrían deberse a lo reportado por Andrade-Hoyos *et al.* (2019), quienes mencionaron que *Trichoderma* sp., cuenta con la facultad de ejercer micoparasitismo. Lo cual podría deberse a la producción de enzimas líticas, proteasas y la capacidad de producir una lisis en las hifas del hongo fitopatógeno penetrándolo, alimentándose de él, ya que las lecitinas que produce van degradando su pared celular. Además, produce quitinasa y las actividades -1, 3-glucanasa (Li *et al.*, 2018), degradando la pared celular fúngica, lo que limita el crecimiento del patógeno (Coban, 2020). Los mecanismos de biocontrol antes mencionados, le permitieron al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos (García-Espejo *et al.*, 2016). *Trichoderma* sp., puede controlar una amplia gama de hongos fitopatógenos como: *R. solani*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* (Martínez-Martínez *et al.*, 2020).

En el análisis de varianza de la evaluación de *B. subtilis* frente a *D. chrysanthemi* no se encontraron diferencias significativas. Se observó que B4 obtuvo un halo de 4.4 mm de ancho y B5 4.3 mm, causado por los metabolitos que produce la bacteria para inhibir *D. chrysanthemi*, mostrando antagonismo. Además, *B. subtilis* comenzó a colonizar y expandirse mostrando competencia por espacio y nutrientes sobrecreciendo a *D. chrysanthemi* (Figura 3). Resultados contrarios a los de Sneha y Anuradha (2017), evaluaron *B. subtilis* frente *Pectobacterium carotovorum*, y no encontraron la formación de halos de inhibición. Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento quedaron muy por debajo de los resultados reportado por Gerayeli *et al.* (2018), al evaluar *Bacillus* spp. frente a *P. carotovorum* reportaron halos de 10 mm. En dichos resultados *Bacillus* spp. se comporta diferente, este podría deberse a lo descrito por Sánchez *et al.* (2015) quienes mencionaron que en los miembros

mycoparasitism, which, in turn, may be due to the production of lytic enzymes, proteases and the ability to produce lysis in the hyphae of the phytopathogenic fungus, penetrating it and feeding off it, since the lethicins it produces degrade its cell wall. It also produces chitinase and the -1, 3-glucanase activities (Li *et al.*, 2018), degrading the fungal cell wall, which limits the growth of the pathogen (Coban, 2020). The previously mentioned biocontrol mechanisms helped the antagonist make better use of the nutrients in the medium and deprive the pathogen from using these resources (García-Espejo *et al.*, 2016). *Trichoderma* sp. can control a wide range of phytopathogenic fungi such as *R. solani*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* (Martínez-Martínez *et al.*, 2020).

In the analysis of variance of the evaluation of *B. subtilis* against *D. chrysanthemi* no significant differences were found. B4 was found to have developed a halo around it with a width of 4.4 mm in width, and B5, a 4.3 mm wide halo, both caused by the metabolites produced by the bacteria to inhibit *D. chrysanthemi*, displaying antagonism. In addition, *B. subtilis* began colonizing and expanding, in a display of competition for space and nutrients, overgrowing *D. chrysanthemi* (Figure 3). These results are opposite to those by Sneha and Anuradha (2017), who evaluated *B. subtilis* against *Pectobacterium carotovorum*, and found no inhibition halos. However, the results obtained in this experiment were quite lower than those reported by Gerayeli *et al.* (2018). In their evaluation of *Bacillus* spp. against *P. carotovorum*, they reported halos of 10 mm in width. In those results, *Bacillus* spp. behaves differently, probably due to a report by Sánchez *et al.* (2015), who mentioned that in the members of a same species there may be a wide phenotypic, biochemical, serological and genetic diversity. On the other hand, Sneha and Anuradha (2017) proved that *Bacillus*

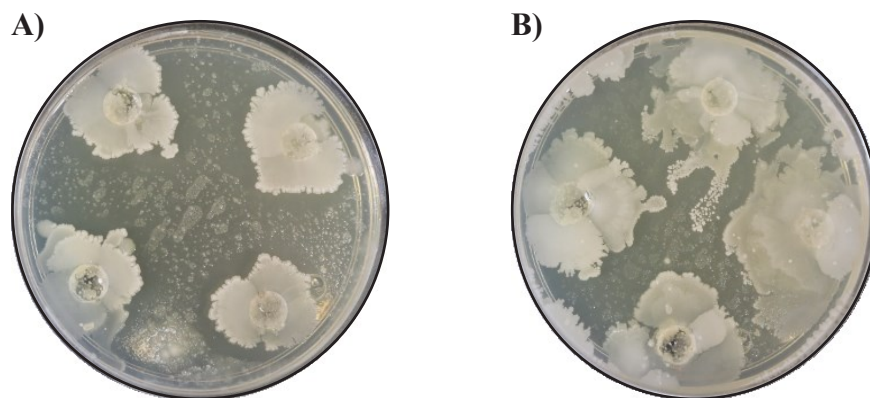


Figura 3. A) Halo de inhibición del crecimiento de *D. chrysanthemi* por efecto del aislamiento B4; B) Aislamiento B4 sobrecrece a la bacteria *D. chrysanthemi* mostrando competencia por espacio y nutrientes.

Figure 3. A) Halo of inhibition from the growth of *D. chrysanthemi* as an effect of isolation B4; B) Isolation B4 overgrows bacteria *D. chrysanthemi*, expressing competition for space and nutrients.

de una misma especie puede existir una amplia diversidad fenotípica, bioquímica, serológica y genética. Por otra parte, Sneha y Anuradha (2017) demostraron que *Bacillus* spp. tienen efecto antagónico frente a las bacterias pectolíticas como *P. carotovorum*.

En cuanto al análisis de covarianza de *Trichoderma* spp. frente a *D. chrysanthemi* se observó que no hay diferencia significativa entre tratamientos. El TJ mostró un porcentaje del 41.9 % y TP un 40.2 % y ambos rodearon *D. chrysanthemi*, los cuales presentaron competencia por espacio y nutrientes. Inicialmente, la bacteria era de apariencia cremosa, pero con el paso del tiempo se tornó con apariencia seca, su crecimiento se detuvo e incluso se observó un ligero crecimiento de micelio hasta el día de la evaluación. De acuerdo con la escala de Corrales *et al.* (2011), ambos tratamientos cuentan con una clasificación de antagonismo media. Dichos resultados fueron superiores a los reportados por Astorga-Quirós *et al.* (2014), quienes obtuvieron un 32.3 % de antagonismo al evaluar *Trichoderma* spp. frente a *Pseudomonas marginalis*, bacteria pectolítica que causan podredumbres blandas.

spp. has an antagonistic effect on pectolytic bacteria such as *P. carotovorum*.

Regarding the analysis of covariance performed on *Trichoderma* spp. against *D. chrysanthemi*, no significant differences were observed between treatments. TJ displayed a percentage of 41.9 and TP, 40.2% and both surrounded *D. chrysanthemi*, which showed signs of competition for space and nutrients. Initially, the bacterium has a creamy appearance, yet with time its appearance became dry, its growth stopped and there was even a slight growth of mycelia until the day of the evaluation. According to the scale by Corrales *et al.* (2011), both treatments have a middle antagonism classification. These results were higher than those reported by Astorga-Quirós *et al.* (2014), who obtained a 32.3% antagonism when evaluating *Trichoderma* spp. against *Pseudomonas marginalis*, a pectolytic bacterium that causes soft rot.

The native *T. asperellum* and *T. harzianum* strains resulted antagonistic, with inhibitions of 39.7 to 49.6% against *F. oxysporum*, and in the confrontation with *D. chrysanthemi*, inhibition rates of 40.2 to 41.9% were found. *B. subtilis*

Las cepas nativas de *T. asperellum* y *T. harzianum*, resultaron antagonistas con inhibición de 39.7 a 49.6 % contra *F. oxysporum* y en la confrontación con *D. chrysanthemi* se obtuvo porcentajes de inhibición de 40.2 a 41.9 %. Para el caso de *B. subtilis* alcanzó un nivel medio de antagonismo frente a *F. oxysporum* a pesar de ser una bacteria confrontada frente a un hongo, y obtuvo un halo de inhibición de 4.4 mm frente a *D. chrysanthemi*.

reached a middle level of antagonism against *F. oxysporum*, despite being bacteria confronted against a fungus, and it produced an inhibition halo of 4.4 mm against *D. chrysanthemi*.

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

LITERATURA CITADA

- Álvarez MG, Rodríguez RG y Flores AM. 2012. Efectos de la certificación sobre la competitividad de la industria de la sábila en México. *Revista Mexicana de Agronegocios* 30: 921-929. <https://www.redalyc.org/pdf/141/14123097013.pdf>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E, Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño HJ. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga VC, Brenes-Madriz J y Rivera-Méndez W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha* 27: 82-91. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- Ávila NDD, Velasco CR, Luna GE, Campos OJC, Cambero ACB and Estrada-Virgen MO. 2020. Identification and antagonistic activity *in vitro* isolation of bacteria against fungi of agricultural important. *Revista Bio Ciencias* 7: e803. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e803>
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology* 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Calvo P y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1): 31-39. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Castro ÁE, Hernández CFD, Gallegos MG, Ochoa FYM and Castillo RF. 2019. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* with endophytic bacteria formulation and its effect in the growth promotion in bean crop. *Revista Bio Ciencias* 6: 1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e416>
- Corrales LC, Sánchez LC, Cuervo J, Bautista D, González L y Guevara M. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 8(13): 63-75. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>
- Coban HB. 2020. Organic acids as antimicrobial food agents: Applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst* 43(4): 569-591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- Cochrane SA and Vederas JC. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* 36(1): 4-31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>
- Fiorentino N, Rosa AD, Gioia L, Senatore MD, Visconti L, Ottaiano V, Cenvinzo E, Cozzolino Y, Roupheal S, Woo MM and Fagnano M. 2016. Effects of *Trichoderma* on growth and nitrogen uptake of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *XLV Convegno della Società Italiana di Agronomia* 134-135. https://www.researchgate.net/publication/309174868_Effects_of_Trichoderma_on_Growth_and_Nitrogen_Uptake_of_Lettuce_Lactuca_sativa_L
- García-Espejo C, Mamani-Mamani N, Mercedes M, Chávez-Lizárraga GA and Álvarez-Aliaga MT. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1): 20-32. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100004
- Gerayeli N, Baghaee-Ravari S and Tarighi S. 2018. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Phytopathology* 150(4): 1049-1063. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1344-0>
- Jiménez CHE. 2015. Identificación de fitopatógenos asociados a las principales enfermedades del cultivo de sábila en los municipios de agua de Dios y Ricaurte (Cundinamarca). *Revista Tecnología y Productividad Girardot, Regional Cundinamarca* 1(1): 35-50. <http://revistas.sena.edu.co/index.php/rtyp/article/view/244/269>
- Li YT, Hwang SG, Huang YM and Huang CH. 2018. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Protection* 110: 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
- Mannai S, Horrigue-Raouani N and Boughalleb-MHamdi N. 2018. Effect of six fungicides against *Fusarium oxysporum* and *F. solani* associated with peach seedlings decline in Tunisian nurseries. *Annual Research & Review in Biology* 26(4): 1-11 <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/41295>
- Martínez-Martínez TO, Guerrero-Aguilar BZ, Pecina-Quintero B, Rivas-Valencia P, González-Pérez E y Angeles-Núñez JG. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante.

- Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(5): 1135-1147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325>
- Miljaković D, Marinković J and Balešević-Tubić S. 2020. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms* 8(7): 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA y Fernández-Pavía SP. 2021. Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(2): 228-247. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatidis P and Hens L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health* 148: 1-8 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Pappas ML, Baptista P, Broufas DG, Dalakouras A, Djjobbi W, Flors V, Msaad GM, Khayi S, Mentag R, Pastor V, Pereira JA, Sánchez-Bel P and Papadopoulou K. 2020. Biological and molecular control tools in plant defense. In: Mérillon JM and Ramawat KG (eds) *Plant Defense: Biological Control*. *Progress in biological control* 22: 3-43. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51034-3_1
- Reinoso PY, Casadesús LR, García AS, Gutiérrez P y Álvarez-Rivera VP. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10(3): 187-191. <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116108001.pdf>
- Ribeiro MS, Graciano de PR, Voltan AR, de Castro RG, Carraro CB, de Assis LJ, Stecca SA, Goldman GH, Silva RN, Ulhoa CJ and Monteiro VN. 2019. Endo- β -1,3-glucanase (GH16 Family) from *Trichoderma harzianum* Participates in Cell Wall Biogenesis but Is Not Essential for Antagonism Against Plant Pathogens. *Biomolecules* 9(12): 781. <https://doi.org/10.3390/biom9120781>
- Rodríguez-García D y Wang-Wong A. 2020. Efectividad a nivel *in vitro* de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense* 44(2): 2 <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>
- Rubio TS, Pérez SCA y Osorio HE. 2020. Sábila (*Aloe vera*): propiedades, usos y problemas. *Ciencia UANL* 23(99): 1-6. <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=9681>
- Sánchez AD, Barrera V, Reybet GE and Sosa MC. 2015. Biocontrol with *Trichoderma* spp. of *Fusarium oxysporum* causal of "seedling disease" in pre and post emergence in onion. *Magazine of the Faculty of Agronomy La Plata* 114(1): 61-70 <http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/396/178>
- Sánchez-León GL and Bustos A. 2020. Potencial antagonico de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos foliares de árboles en parques de los Cerros Orientales de Bogotá. *Revista Facultad De Ciencias Básicas* 15(2): 107-115. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3899>
- Schaad NW, Jonas JB and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. Ed APS PRESS Minnesota U.S.A. 373 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- Sneha SG and Anuradha SN. 2017. Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 9: 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.11.004>
- Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG, Núñez-Pastrana R, Quezada-Salinas A and Márquez-Liconae G. 2021. Biocontrol del ahogamiento de plántulas de calabacita con *Bacillus subtilis* QST 713. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(2): 302-313. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-2>

Incidence and effect on grain yield of the “monkey’s hand” disease in 29 maize genotypes

Incidencia y efecto de la enfermedad “mano de chango” en la producción de 29 genotipos de maíz

José Jesús Márquez-Diego, Estudiante de doctorado, Carlos De León-García de Alba*, Reyna Isabel Rojas-Martínez, Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; José Ricardo Sánchez-Pale, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, C.P. 50295. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Recibido: 28 de Junio, 2021.

Aceptado: 13 de Agosto, 2021.

Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI and Sánchez-Pale JR. Incidence and effect on grain yield of the “monkey’s hand” disease in 29 maize genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 529-537.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-2>

Primera publicación DOI: 27 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 27, 2021.

Resumen. Recientemente, se ha observado un incremento en la presencia de una posible nueva enfermedad en plantas de maíz que genera prolificidad de mazorcas que los agricultores denominan “mano de chango”. Estos síntomas se han observado en áreas tropicales, subtropicales y del altiplano de México. Observaciones iniciales, en los años 1960s, indicaron, sin pruebas, que esta enfermedad era causada por hongos, insectos, o deficiencias nutricionales con incidencia de hasta 100% y pérdidas en producción de grano. Este es el primer trabajo en

Abstract. Recently, an increase in the presence of symptom of a possible new disease on maize has been observed which farmers have called “mano de chango” (monkey’s hand) due to the prolificacy shown by the ears. Initial reports, in the 1960s, indicated, with no proofs, that this disease was caused by fungi, insects, or nutritional deficiencies with incidences up to 100% and losses in grain yield. This is the first work where evaluation of incidence of the disease, in 21 commercial hybrids in the Toluca Valley, State of Mexico, a comercial hybrid and a native variety in the Mezquital Valley, Hidalgo State, and six improved open pollinated in Montecillo, State of Mexico. The highest incidences and grain yield losses were recorded in the genotype Aspros HC8 and the native variety “Hidalgo”, in Mezquital Valley, Hidalgo State, where disease symptoms showed considerable yield reduction. It is necessary to continue studies to determine the etiology and generate information to select genetic resistance to this possible new disease.

que se evalúa la incidencia de la enfermedad en 21 híbridos comerciales en el Valle de Toluca, México, un híbrido comercial y una variedad nativa de polinización libre en el Valle del Mezquital, Hidalgo, y seis variedades mejoradas de polinización libre en Montecillo, Texcoco, México. La mayor incidencia y pérdidas en rendimiento de grano por la enfermedad se observó en los genotipos Aspros HC8 y la variedad nativa “Hidalgo”, en el Valle del Mezquital, Hidalgo, en donde la presencia de síntomas de la enfermedad mostró una considerable reducción en rendimiento. Es necesario continuar estudios para investigar su etiología y generar información para selección de resistencia genética a esta posible nueva enfermedad.

Palabras clave: Mano de chango, fitoplasmas, enfermedades de maíz.

El maíz es uno de los tres principales cereales cultivados, debido a sus cualidades alimenticias para humanos, animales y uso industrial. En México, tiene alta importancia económica, social y cultural (SAGARPA, 2017). Sin embargo, este cultivo es afectado por diversos problemas fitosanitarios que disminuyen considerablemente su producción, entre los que destacan especialmente las enfermedades de origen fungoso (CIMMYT, 2005). En los últimos años, un grupo de fitopatógenos de la clase Mollicutes, entre los que se incluyen los espiroplasmas y fitoplasmas, originalmente considerados como un grupo secundario, han cobrado importancia en diversos cultivos, incluyendo el maíz (Galvão *et al.*, 2020).

El término de achaparramiento (corn stunt) lo utilizó por primera vez Kunkel (Kunkel, 1946) quien atribuyó la sintomatología a un virus como agente causal. Doi *et al.* (1967) describió a este grupo como microorganismos parecidos a micoplasmas

Key words: Monkey’s hand, phytoplasmas, maize diseases.

Maize is one of the three main cereal crops grown due to its nutritional characteristics for humans and animals, as well as for industrial use. In Mexico it has great economic, social and cultural importance (SAGARPA, 2017). However, this crop is affected by diverse phytosanitary problems that considerably reduce its production, with fungal diseases being amongst the most important (CIMMYT, 2005). In recent years, a group of phytopathogens of the Mollicutes Class, including spiroplasmas and phytoplasmas, originally considered as a secondary group, have become increasingly important in diverse crops, including maize (Galvão *et al.*, 2020).

The term “corn stunt” was used for the first time by Kunkel (Kunkel, 1946), who attributed the symptoms to a virus as a causal agent. Doi *et al.* (1967) described this group as microorganisms similar to mycoplasmas, sensitive to tetracycline, which were initially named mycoplasma-like organisms (MLO) (CIPF, 2016). Davis (1973), in a phase contrast microscope, observed and reported helicoidal filaments that he associated as being the causal agent of corn stunt and named it “corn stunt spiroplasma”. In addition, as a result of observations carried out in Mexico on maize with symptoms of corn stunt, Davis (1974) published the possibility of leafhoppers being the causal agent of corn stunt, as well as another non-mobile organism that caused another disease in maize. The presence of an additional organism to spiroplasm in the vectors was confirmed by Bascopé (1977) and later by Nault (1980), after observing mycoplasma-like structures in phloem cells of infected plants related to corn stunt in the insect *Dalbulus* (Moya and Nault, 1998). The new disease reported by

animales, con sensibilidad a tetraciclina, a los cuales se les llamó inicialmente organismos parecidos a micoplasmas (MLO) (CIPF, 2016). Davis (1973), en observaciones en microscopio de contraste de fases, observó y reportó filamentos helicoidales que asoció como agente causal de la enfermedad del achaparramiento y denominó “corn stunt spiroplasma”. Además, como resultado de observaciones realizadas en México en maíz con síntomas de achaparramiento, Davis (1974) publicó la posibilidad de que las chicharritas fueran vectoras del agente causal del achaparramiento, así como de otro organismo no móvil que causaba otra enfermedad en maíz. La presencia de un organismo adicional al espiroplasma en los vectores, fue confirmado por Bascope (1977) y más tarde por Nault (1980), al observar estructuras tipo micoplasmas en células del floema de plantas infectadas asociadas al achaparramiento del maíz en el insecto *Dalbulus* (Moya y Nault, 1998). La nueva enfermedad reportada por estos autores se denominó enanismo arbustivo del maíz o “Maize Bushy Stunt Disease” (MBSD). Estas investigaciones demostraron que el “Corn Stunt Disease” (CSS) y el MBSD eran enfermedades diferentes transmitidas por insectos del género *Dalbulus*. Fue hasta la última década de siglo XX que, mediante pruebas moleculares basadas en el análisis del ARN ribosomal 16S, se estableció la filogenética de los fitoplasmas como miembros de la clase Mollicutes (Lee *et al.*, 1998).

Entre las enfermedades del maíz causadas por Mollicutes, Costa *et al.* (2019) mencionan al achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* y al enanismo arbustivo del maíz, esta última, según Pérez-López *et al.* (2018), detectada, sin base, por primera vez en México en 1955. Ambas enfermedades son transmitidas por varias especies de homópteros, siendo la principal la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*), un insecto presente en localidades del sur de México, considerado el centro de origen del género *Dalbulus* (Nault, 1980;

these authors was named “Maize Bushy Stunt Disease” (MBSD). These investigations showed that the “Corn Stunt Disease” (CSS) and MBSD were different diseases transmitted by insects of the genus *Dalbulus*. It was in the last decade of the 20th Century that, with molecular tests based on the analysis of ribosomal RNA 16S, the phylogenetics of phytoplasmas were established as members of the Mollicutes Class (Lee *et al.*, 1998).

Among the maize diseases caused by Mollicutes, Costa *et al.* (2019) mention corn stunt caused by *Spiroplasma kunkelii* and the maize bushy stunt disease, the latter of which was, according to Pérez-López *et al.* (2018), found, without a basis, for the first time in Mexico in 1955. Both diseases are transmitted by several species of homoptera, the main one being the maize leafhopper (*Dalbulus maidis*), an insect found in southern Mexico, considered the birthplace of the *Dalbulus* genus (Nault, 1980; Tsai and Miller, 1995; Casuso, 2017). In 1994, the Committee for the Taxonomy of Mollicutes, of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), established the name currently used of phytoplasmas (Kirkpatrick, 1994).

The symptoms of MBSD on maize include the formation of long lateral branches, a reduction in the development of ears and the proliferation of in the same rachis with the appearance of bracts, often twisted, with slanted edges showing chlorosis and reddening (Pecher *et al.*, 2013) even leading to the production of an ear without killing the plant. Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) indicated that the “monkey’s hand” disease is not a symptom that is related to MBSD, yet they describe that this disease does cause the death of the plant. The description of symptoms indicates a confusion and unawareness of the separation of corn stunt, MBSD and monkey’s hand (Figure 1). The latter disease was initially reported as “Manita” (little hand) by Cruz (1991) and later by Aguilar and Molina (1996).

Tsai y Miller, 1995; Casuso, 2017). Fue en 1994 que el Comité de Taxonomía de los Mollicutes, de la Organización Internacional de la Micoplasmaología (IOM por sus siglas en inglés), estableció el nombre actual de fitoplasmas (Kirkpatrick, 1994).

Los síntomas del MBSD en maíz incluyen la formación de largas ramas laterales, disminución en el desarrollo de mazorca y proliferación de mazorcas en el mismo raquis con aparición de brácteas a menudo torcidas con bordes rasgados mostrando clorosis y enrojecimiento (Pecher *et al.*, 2013) (Figura 1), llegando a producir la mazorca sin matar a la planta. Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) señalan que la enfermedad “mano de chango” del maíz no es un síntoma asociado al MBSD quienes describe que esta enfermedad sí causa la muerte a la planta. La descripción de síntomas indica una confusión y desconocimiento en la separación del achaparramiento, del MBSD y de la mano de chango. Esta última enfermedad fue inicialmente reportada inicialmente como “Manita” por Cruz (1991) y posteriormente por Aguilar y Molina (1996).

La enfermedad de “mano de chango” se ha vuelto destructiva, causando pérdidas variables en

The “monkey’s hand” disease has become destructive, causing variable losses in production, with reports of 35% in the Mezquital area, in Hidalgo, Mexico (Ortega, 2021. Personal communication) and up to losses of 35 to 93%, depending on the population of vector insects (González *et al.*, 2018).

For their management, several cultural strategies have been studied, including planting dates, the elimination of crop residues, treatments to seeds and control of possible vectors, which have displayed a low efficiency in the control of the MBSD, therefore the use of genetically resistant germplasm is accepted as the main alternative to reduce damages and the incidence caused by the phytoplasma, although there are few studies related to the identification of sources of resistance and of genetic control (Costa *et al.*, 2019), which is one of the aims of the present studies.

Locations of evaluation. The incidence and the effect of “monkey’s hand” were evaluated in commercial hybrids and free pollination varieties of maize in three locations. In the Experimental



Figura 1. Síntomas de la enfermedad mano de chango asociados a fitoplasmas en mazorcas de maíz.
Figure 1. Symptoms of monkey’s hand disease related to phytoplasms in maize ears.

la producción, reportándose, en la zona del Mezquital, Hidalgo, México, con pérdidas de 35% (Ortega, 2021. Comunicación personal) hasta pérdidas de 35 al 93% dependiendo de la población de insectos vectores (González *et al.*, 2018).

Para su manejo, se han estudiado diversas estrategias culturales, incluyendo las fechas de siembra, eliminación de restos de cultivo, tratamientos a semilla y control del vector, las cuales han mostrado baja eficiencia para controlar la enfermedad del enanismo arbustivo, por lo que actualmente se reconoce que el uso de germoplasma resistente es la principal alternativa para reducir los daños y la incidencia causada por el fitoplasma, aunque hay pocos estudios relacionados con la identificación de fuentes de resistencia y de control genético (Costa *et al.*, 2019), uno de los objetivos del presente estudio.

Localidades de evaluación. La incidencia y efecto de la “mano de chango” se evaluó en híbridos comerciales y variedades de polinización libre de maíz en tres localidades. En el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) en Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Edo. de México (19° 27' 56" N, 99° 39' 20" O, 2667 msnm) se evaluaron 21 híbridos comerciales en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Cada parcela se constituyó de dos surcos de 3 m de largo, 80 cm entre surcos y 22 cm entre plantas, para un total de 28 plantas por parcela. En el Centro de Innovación Tecnológica Cinta Larga, en Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' 52" N, 99° 12' 47" O, 2100 msnm) se establecieron un híbrido comercial (Aspros HC8) y la variedad nativa de polinización libre “Hidalgo”, que se sembraron en 20 surcos de 50 m de largo, a 80 cm entre surcos y 25 cm entre plantas, para una densidad de 85 000 plantas ha⁻¹. En el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (19° 28' 26"

Field of the Autonomous University of the State of Mexico (UAEM) in Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico (19° 27' 56" N, 99° 39' 20" O, 2667 masl), 21 commercial hybrids were evaluated in a randomized block design with three replications. Each plot consisted of 2 rows, 3 m long, with 80 cm between rows and 22 cm between plants, for a total of 28 plants per plot. In the Cinta Larga Technology Innovation Center, in Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' 52" N, 99° 12' 47" W, 2100 masl), a commercial hybrid was established (Aspros HC8) along with the native open pollinated variety “Hidalgo”, which were planted each in 20 rows, 50 m long, with 80 cm between rows and 25 cm between plants, for a density of 85,000 plants ha⁻¹. In the Experimental Field of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (19° 28' 26" N and 98° 53' 18" W, 2250 masl) in Texcoco, State of Mexico, the incidence of the disease was evaluated in six improved open pollinated synthetic varieties, each planted in 12 rows, 100 m long, with 80 cm between the rows and 22 cm between plants. In the Experimental Field of the Autonomous University of the State of Mexico, the incidence was evaluated at harvest time. In all three locations, a conventional agronomic production scheme was followed for the crops and insects and weeds were not controlled.

Evaluation of incidence and damages. For the variable of incidence in the germplasm in the location of the UAEM, approximately one month before harvest, ears with symptoms of the disease were collected. In the experimental plot located in Mixquiahuala, Hidalgo, 600 plants were counted in 15 rows of the Aspros HC8 commercial hybrid, and likewise for the native open pollinated variety “Hidalgo”, for which 600 plants were counted, including those with symptoms of the disease. In the Campus Montecillo of the Colegio de Postgraduados, in the five improved open pollinated

N y 98° 53' 18" O, 2250 msnm) en Texcoco, Edo. de México, se valoró la incidencia de la enfermedad en seis variedades mejoradas de polinización libre, sembradas cada una en 12 surcos de 100 m de largo, 80 cm entre surcos y 22 cm entre plantas. En el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México, la incidencia se evaluó en la cosecha. En las tres localidades, los cultivos se llevaron siguiendo un esquema convencional de producción agrícola y no se realizó control de insectos ni de malezas.

Evaluación de incidencia y daño. Para la variable incidencia en el germoplasma en la localidad de la UAEM, aproximadamente un mes antes de cosecha, se colectaron las mazorcas con síntomas de la enfermedad. En el lote experimental localizado en Mixquiahuala, Hidalgo, se contabilizaron 600 plantas en quince surcos del híbrido comercial Aspros HC8 y de la misma manera con la variedad nativa de polinización libre "Hidalgo", en los que se contabilizaron 600 plantas incluyendo aquellas con presencia de síntomas de la enfermedad. En el Campus Montecillo, del Colegio de Postgraduados, en las cinco variedades mejoradas de polinización libre sembradas, se contabilizaron 400 plantas por variedad en estado cercano a madurez, revisándolas individualmente buscando síntomas característicos de proliferación de mazorcas para determinar la incidencia de la enfermedad. Entre estas plantas, las que presentaban síntomas de la enfermedad se aparearon con plantas sin síntomas inmediatamente anexas para posteriormente determinar el efecto en rendimiento de grano. Las plantas así apareadas se colectaron en pares para pesarlas, desgranarlas y registrar el porcentaje de humedad en grano fresco con un medidor de humedad Dicky John miniGAC plus® y ajustando su humedad a 14%. El peso del grano de mazorcas producidas por las plantas con síntomas de la enfermedad y el de las plantas vecinas sanas fueron analizados usando un diseño

synthetic varieties planted, 400 plants were counted per variety in plants close to maturity, observing them closely looking for typical symptoms of ear proliferation to determine the disease incidence. Among those plants, the ones which presented symptoms of the disease were paired with immediately adjacent plants without symptoms to then determine the effect on grain yield. The paired plants were collected in pairs to weigh them, remove their kernels and record the percentage of humidity in the fresh grains using a Dicky John miniGAC plus® moisture meter to measure humidity and adjusting this to 14%. The weight of the grain produced by the plants with symptoms of the disease and that of adjacent healthy plants were analyzed using a paired t test design, and the means of disease incidence were compared with those of the grains in pairs of transformed ears, using the Shapiro-Wilk test of normality of the data with $\alpha=0.05$ for the transformation of the arcsine of the incidence (0.077), so the residues have a normal distribution, and justifying their analysis. The means obtained were separated using Tukey's test at 5% significance with the SAS analysis package, version 9.0.

The 21 hybrids evaluated in the UAEM showed a very low incidence of the disease with poor development of the ears and grains, therefore the trial in this location was eliminated.

In the location of Mixquiahuala, the commercial hybrid and the native variety "Hidalgo", as well as the six free pollination varieties evaluated in Montecillo, Texcoco (Table 1) analyzed jointly, showed that the germplasm evaluated in Montecillo showed lower incidences than in the material evaluated in Mixquiahuala. The differences in incidence between the materials grown in Mixquiahuala and Montecillo were significant, particularly between the varieties of origin MO19 (Montecillo 2019) with 5.5, 5.2, 3.5, 1.0, 0.75 and 0.75% against the hybrid Aspros HC8 and the

de parcelas apareadas, comparando estadísticamente las medias de incidencia de la enfermedad y el de grano en pares de mazorcas transformadas realizando la prueba de normalidad Shapiro-Wilk de los datos con $\alpha=0.05$ para la transformación arco seno de la incidencia (0.077) por lo que los residuos tienen una distribución normal con lo que se justifica su análisis. Las medias obtenidas se separaron mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia con el paquete de análisis SAS versión 9.0.

Los 21 híbridos evaluados en la UAEM mostraron muy baja incidencia de la enfermedad con mal desarrollo de las mazorcas y grano, por lo que se eliminó el ensayo de esta localidad.

En la localidad de Mixquiahuala, el híbrido comercial y la variedad nativa “Hidalgo”, así como, las seis variedades de polinización libre evaluadas en Montecillo, Texcoco (Cuadro 1) analizadas en

native “Hidalgo”, with 17 and 13%, respectively. In the trial established and evaluated in the Campus Montecillo of the Colegio de Postgraduados, the grain yield analysis applying the paired t test analysis showed a significant loss in grain production per ear in all the varieties, which reduced their yield by 86% in MO19:15# Bco (Colpos) to 20% in MO19: CP Hilda 2 Amar (Colpos).

Preliminary information is presented on the presence of monkey’s hand and its effect on the yield of maize plants with symptoms of the disease in subtropical conditions (Mezquital, Hidalgo) and the Mexican highlands (Montecillo, State of Mexico), although its effect on grain yield must be determined in a greater number of locations, including the conditions of the humid tropics, where maize producers indicate they have found symptoms similar to those described. This

Cuadro 1. Incidencia de la enfermedad “mano de chango” y su efecto en el rendimiento de grano de híbridos y variedades de maíz evaluados en Mixquiahuala, Hidalgo y Montecillo, México, 2020.

Table 1. Incidence of the “monkey’s hand” disease and its effect on the grain yield of hybrids and maize varieties evaluated in Mixquiahuala, Hidalgo, and in Montecillo, Mexico, 2020.

| Germoplasma evaluado | Media Incidencia (%) | Incidencia (Arco seno) | Grano de mazorcas sanas (g) | Grano de mazorcas enfermas (g) | Disminución rendimiento de grano (%) |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Aspros HC8 (Hidalgo) | 17.5 | 0.427 a ^z | 128.24 | 62.75 ** | 44.65 a ^z |
| Criollo Hidalgo | 13.5 | 0.375 ab | 169.61 | 73.25 ** | 42.13 a |
| MO19: CP Elvia 3
TSR# Bco (Colpos) | 5.5 | 0.225 bc | 148.33 | 76.80 ** | 46.86 a |
| MO19: CP-Verol Bco
(Colpos) | 5.2 | 0.217 bc | 156.45 | 111.04 * | 73.34 a |
| MO19: 15# Bco
(Colpos) | 3.5 | 0.185 c | 133.84 | 114.88 NS | 86.76 a |
| MO19: CP Hilda 2
Amar. (Colpos) | 1.0 | 0.068 c | 111.00 | 12.25 ** | 20.77 a |
| MO19: 11# Amar.
(Colpos) | 0.7 | 0.065 c | 110.66 | 99.00 NS | 69.75 a |
| MO19:19+2# Bco
(Colpos) | 0.7 | 0.065 c | 104.00 | 51.00 ** | 48.25 a |
| | | DMS: 0.176
CV (%): 73.5 | | | DMS: 77.45
CV(%): 60.4 |

^zMedias con la misma letra dentro de cada columna son iguales estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$). / ^zMeans with the same letter in each column are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

*: Significativo $P=0.05$. **: Altamente significativo $P=0.01$. NS: no significativo. / *: Significant $P=0.05$. **: Highly significant $P=0.01$. NS: not significant.

conjunto, mostraron que el germoplasma evaluado en Montecillo mostró menores incidencias que en los materiales evaluados en Mixquiahuala. Las diferencias en incidencia entre materiales sembrados en Mixquiahuala y Montecillo fueron significativas, especialmente entre las variedades de origen MO19 (Montecillo 2019) con 5.5, 5.2, 3.5, 1.0, 0.75 y 0.75% contra el híbrido Aspros HC8 y el criollo “Hidalgo”, con 17 y 13%, respectivamente. En el ensayo establecido y evaluado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, el análisis de rendimiento de grano aplicando el análisis de parcelas apareadas, mostró una pérdida significativa en producción de grano por mazorca en todas las variedades, las cuales disminuyeron su rendimiento desde el 86% en MO19:15# Bco (Colpos) hasta el 20% en MO19: CP Hilda 2 Amar (Colpos).

Se presenta información preliminar de la presencia y efecto en rendimiento de plantas con síntomas de la enfermedad mano de chango en condiciones subtropicales (Mezquital, Hidalgo), y del Altiplano de México (Montecillos, Estado de México), pero debe determinarse su efecto en el rendimiento de grano en un mayor número de localidades, incluyendo condiciones de trópico húmedo, en donde, productores de maíz indican que han observado síntomas parecidos a los descritos. Esta información, la confirman los reportes de Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) y Costa *et al.* (2019) en investigaciones realizadas en regiones tropicales de México y Brasil, respectivamente.

Se encontraron síntomas de “mano de chango” y pérdida de rendimiento de grano en el germoplasma de maíz evaluado, con mayor incidencia y pérdida de grano en el híbrido Aspros HC8 y el criollo “Hidalgo” en la localidad de Mixquiahuala, Hidalgo. Las plantas afectadas por la enfermedad disminuyen su producción de grano en forma significativa. Se deben continuar trabajos de investigación para determinar la etiología de la enfermedad

information is confirmed in reports by Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) and Costa *et al.* (2019) in investigations carried out in tropical areas of Mexico and Brazil, respectively.

Symptoms of “monkey’s hand” and grain yield loss were found in the germplasm of the maize evaluated, with a higher incidence and grain loss in the hybrid Aspros HC8 and the native variety “Hidalgo” in the location of Mixquiahuala, Hidalgo. The plants affected by the disease significantly reduce their grain yield. Research must continue to determine the etiology of the disease and evaluate a larger number of variants in maize germplasm to identify and select possible sources of resistance to the disease.

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

y evaluar mayor cantidad de variantes en germoplasma de maíz, para identificar y seleccionar posibles fuentes de resistencia a la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar RVH and Molina GJD. 1996. Factors influencing the presence of ear prolificacy (“Manita”) in maize. *Agrociencia* 30: 569-572.
- Alcántara-Mendoza S, Téliz-Ortiz D, De León C, Cárdenas-Soriano A, Hernández-Anguiano A, Mejía-Sánchez D y De la Torre-Almaraz R. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma maize bushy stunt en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 34-43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Bascope JB. 1977. Agente causal de la llamada Mesa Central del achaparramiento del maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados; Chapingo, Méx. 55 p.
- Casuso M. 2017. *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae): una plaga que va cobrando importancia en los maíces del sudoeste chaqueño. Ministerio de Agroindustria 12. Retrieved from [https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta-dalbulus\\_maidis.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta-dalbulus_maidis.pdf)
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2005. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. Disponible en: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf>
- Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). 2016. NIMF 27 Protocolos de diagnóstico para plagas



- reglamentadas. Disponible en: [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP\\_12\\_2016\\_Es\\_2017-01-11.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_12_2016_Es_2017-01-11.pdf)
- Costa da RV, Silva da DD, Cota LV, Campos LJM, Almeida de REM and Bernardes FP. 2019. Incidence of corn stunt disease in off-season corn hybrids in different sowing seasons. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 54. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.PAB2019.V54.00872>
- Cruz SPEV. 1991. La proliferación de jilotes en la mazorca (manita) y el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.). Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 61 p.
- Davis RE. 1973. Occurrence of a spiroplasma in corn stunt-infected plants in Mexico. *Plant Disease Reporter* 57(4): 333-337.
- Davis RE. 1974. Spiroplasma in corn stunt-infected individuals of the vector leafhopper *Dalbulus maidis*. *Plant Disease Reporter* 58(12): 1109-1112.
- Davis RE, Worley JF, Whitcomb RF, Ishijima T and Steere RL. 1972. Helical Filaments Produced by a Mycoplasma-Like. *Science* 176: 521-523. <https://doi.org/10.1126/science.176.4034.521>
- Doi Y, Teranaka M, Yora K and Asuyama H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants Infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals Phytopathology Society Japan* 33: 259-266. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>
- Galvão SR, Sabato EO and Bedendo IP. 2020. Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and spiroplasma causing corn stunting in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00381-6>.
- Kirkpatrick BC, Smart C, Blonquist C, Guerra L, Harrison N, Ahrens U, Lorenz KH, Schnider B and Seemüller E. 1994. Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16s/23s rRNA spacer sequences. *Proceedings 10th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM)*: 261-262.
- Kunkel LO. 1946. Leafhopper transmission of corn stunt. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*. *PNAS* 32(9): 246-247. <https://doi.org/10.1073/pnas.32.9.246>
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE and Bertaccini A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88(12): 1359-1366. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1359>
- Moya RG and Nault LR. 1998. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 91(5): 668-676. <https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.668>
- Nault RL. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology* 70 (7): 659 - 662. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-659>
- Ortega BJ. 2021. Director del Centro de Desarrollo Agrícola Cinta Larga, Estado de Hidalgo, México. Comunicación personal.
- Pecher P, Moro G and Canale MC. 2013. Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of Arabidopsis versus maize. *PLoSPathog* 1: 1-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008035>
- Pérez-López E, Wist T, Rodríguez Y, Luna-Rodríguez M and Olivier CY. 2018. Maize bushy stunt in native corn: implications for Mexican "subsistence farmers." *Environment, Development and Sustainability* 20(4): 1797-1805. <https://doi.org/10.1007/s10668-017-9966-0>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Agrícola Nacional. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>
- Tsai JH and Miller JW. 1995. Corn Stunt Spiroplasma. *Plant Pathology Circular No. 373*. <https://www.fidacs.gov/content/download/11380/file/pp373.pdf>

# CP-Tania 5, white maize variety horse's tooth (*Claviceps gigantea*) resistant for Mexican highlands

## CP-Tania 5, variedad de maíz blanco resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México

**Carlos De León-García de Alba\***, Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230; **Alma Rosa Solano-Báez**, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Boulevard. Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, Los Mochis, Sinaloa, CP 81223, México; **Guillermo Márquez-Licona**, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; **Jesús Ricardo Sánchez-Pale**, Facultad de ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Cerritos, Toluca, Estado de México. \*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 28 de Junio, 2021.

Aceptado: 03 de Agosto, 2021.

De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Márquez-Licona G and Sánchez-Pale JR. 2021. CP-Tania 5, white maize variety horse's tooth (*Claviceps gigantea*) resistant for Mexican highlands. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 538-543

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-4>

Primera publicación DOI: 11 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 11, 2021.

**Resumen.** En el Colegio de Postgraduados se desarrolló la variedad sintética de maíz de grano blanco con buenas características agronómicas y resistencia al diente de caballo para zonas de transición y altiplano de México. *C. gigantea* ha sido reportado solo en México, sin embargo, se ha distribuido en zonas productoras de maíz en el altiplano y zonas de transición con clima fresco y alta humedad.

**Abstract.** Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, has developed a new white endosperm synthetic maize variety with good agronomic characters and resistance to the "horse's tooth" disease for highlands and transition zones of México. The "horse's tooth" disease has only been reported in Mexico where it has distributed to several maize producing areas with high humidity and cool climate. The variety was developed by recombining 10 S<sub>1</sub> lines generated from a genetically broad based white endosperm maize population improved following a S<sub>1</sub> recurrent selection program. The lines obtained were selected for desirable agronomic characters after inoculating with macroconidia of the fungus and recombined. F<sub>1</sub> seed of the experimental synthetic varieties was advanced to F<sub>2</sub> and were planted in experimental agronomic trials from which the experimental synthetic variety CP-Tania 5 was selected. This

La variedad se generó recombinando 10 líneas  $S_1$  generadas a partir de una población base de maíz con endospermo blanco y amplia base genética. La población se mejoró siguiendo un programa de selección recurrente en líneas  $S_1$ . Las líneas obtenidas se seleccionaron después de inocular con macroconidios del hongo y las mejores se recombinaron para generar variedades sintéticas, entre las cuales la variedad CP-Tania 5 fue sobresaliente. Esta variedad sintética ofrece rendimiento de grano que compite con el de híbridos comerciales, la semilla es de menor costo, puede sembrarse por varios ciclos en condiciones limitantes y puede distribuirse entre agricultores.

**Palabras clave:** Variedad sintética, selección  $S_1$  recurrente

La enfermedad del diente de caballo es causada por el estado teleomorfo del ascomiceto *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964) cuyo estado anamorfo *Sphacelia* sp. tiene una amplia distribución en condiciones de campo. La enfermedad se ha reportado únicamente en México, inicialmente en el valle de Toluca, Edo. Mex. y la sierra tarasca en Pátzcuaro, Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964) pero se ha diseminado a localidades de Puebla e Hidalgo (De León-García de Alba *et al.*, 2017), donde prevalecen condiciones de alta humedad relativa y bajas temperaturas. En estas regiones, en donde se establecen tanto maíces híbridos como variedades locales con susceptibilidad a la enfermedad, se han reportado pérdidas de hasta 100 % de la producción de grano (Meléndez-Carbajal, 2015).

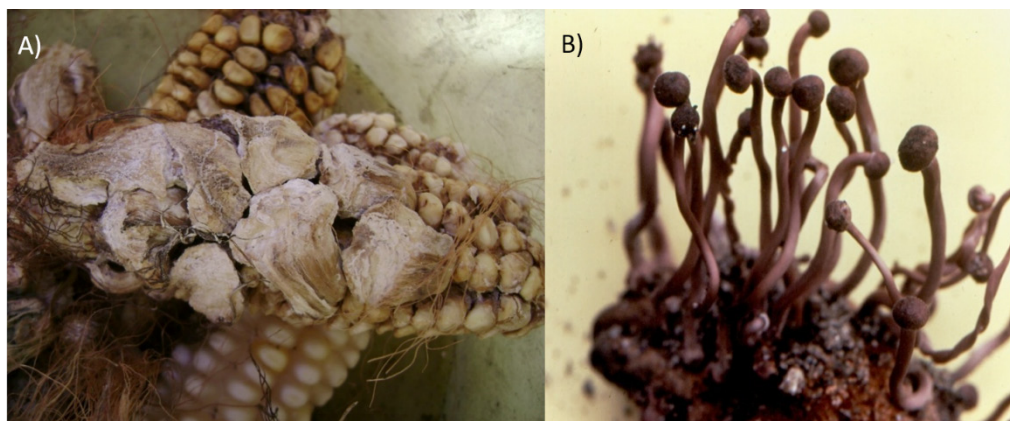
La enfermedad se origina cuando, al madurar los granos de maíz infectados por el hongo, se desarrollan en forma de esclerocios (Figura 1A), estructuras de reposo que les permite invernar. Durante la cosecha, estos esclerocios caen al suelo y permanecen en estado de dormancia durante el

synthetic variety offers grain yield that competes with the commercial hybrids, its seed is cheaper, can be planted for several cycles in stress conditions and can be distributed between farmers.

**Key words:** Synthetic variety,  $S_1$  recurrent selection.

Horse's tooth disease is caused by the teleomorphic state of the ascomycete *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964), with the *Sphacelia* sp. anamorphous stage which has a wide distribution under field conditions. The disease has only been reported in Mexico, initially in the Valley of Toluca, State of Mexico, and the Tarascan range in Pátzcuaro, Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964), but it has spread to locations in Puebla and Hidalgo (De León-García de Alba *et al.*, 2017), in which high humidity conditions and low temperatures prevail. In these regions, in which hybrids and local varieties are established, all susceptible to the disease, losses of up to 100% of the grain production have been reported (Meléndez-Carbajal, 2015).

The disease originates when the mature maize grains infected by the fungus develop into sclerotia (Figure 1A), dormant structures to hibernate. During harvest, these sclerotia fall to the ground and remain in dormancy during the winter, to reactivate their metabolism with rains in the next planting season. When they reactivate, the sclerotia germinate, forming stipes (stems) with heads on the apex, where perithecia form, containing asci with ascospores (Figure 1B). These ascospores are the infectious structures of the fungus that penetrate the ear after infecting fresh stigmas. In their asexual phase, the sclerotia develop micro and macroconidia, which can also penetrate the ear, infecting the fresh stigmas (Moreno-Moreno, 2016).



**Figura 1.** Esclerocios del diente de caballo en mazorcas de maíz (A) y germinación de esclerocios de *C. gigantea* en que se forman peritecios con ascosporas (B).  
**Figure 1.** Horse's tooth sclerotia in maize ears (A) and germination of *C. gigantea* sclerotia, where perithecia are formed, with ascospores (B).

invierno para reactivar su metabolismo en la siguiente temporada de siembra con la estación de lluvias. Al reactivarse, los esclerocios germinan formando estípites (tallos) con cabezuelas en el ápice en las que se forman peritecios que contienen ascas con ascosporas (Figura 1B). Estas ascosporas son las estructuras infectivas del hongo que penetran la mazorca infectando estigmas frescos. En su fase asexual, los esclerocios desarrollan micro y macroconidios que también pueden penetrar en la mazorca infectando los estigmas frescos (Moreno-Moreno, 2016).

Como parte del control de esta enfermedad y objetivo de la investigación, se inició un programa de mejoramiento para desarrollar variedades sintéticas de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de ésta y otras enfermedades de cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

**Programa de mejoramiento.** El programa de mejoramiento para desarrollar germoplasma

As a part of the control of the disease, a breeding program was initiated to develop synthetic open-pollinated maize varieties with good agronomic characters and genetic resistance to the disease. Genetic resistance is considered the most efficient and cheapest way to control this and other crop diseases (Pandey and Gardner, 1992).

**Breeding program.** The breeding program to develop germplasm with desirable agronomic characters and genetic resistance to the horse's tooth disease began with the formation of a maize population with white endosperm and a wide genetic base. This base population of white endosperm was formed by recombining in isolated plots, for two cycles, a total of 45 different types of maize collected in the highlands with desirable agronomic characters, including commercial hybrids, and improved and native varieties. The recombination plots were established in the field owned by a farmer in the *ejido* of Santa Teresa Tiloxtoc, in Valle de Bravo, State of Mexico (19° 13' N, 100° 07' W, 1880 masl, mean relative humidity of 65%). After the initial recombination ( $C_0$ ), a recurring



con caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al diente de caballo se inició con la formación de una población de maíz con endospermo blanco de amplia base genética. Esta población base de endospermo blanco se formó recombinando en lotes aislados, por dos ciclos, un total de 45 diferentes maíces colectados en el altiplano con comportamiento agronómico deseable, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Edo. Mex. (19° 13' N, 100° 07' W, 1880 msnm, Humedad Relativa media 65%). Después de la recombinación inicial ( $C_0$ ), se inició un programa de selección recurrente con líneas  $S_1$  (Pandey y Gardner, 1992), con la autofecundación de aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de selección y generando semilla  $S_1$  en cada ciclo. Semilla de las  $S_1$  obtenidas, se sembraron una mazorca por surco en un vivero establecido en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Edo. Mex. (19° 24' N, 99° 4' W, 2660 msnm), donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales. Mazorcas provenientes de familias  $S_1$  seleccionadas por caracteres agronómicos fueron inoculadas con una suspensión acuosa de 100 000 macrosporas  $mL^{-1}$  del patógeno *Sphacelia* sp. obtenidas en medio T2 (Pažoutová *et al.*, 2004).

Aproximadamente 33% de las líneas  $S_1$  inoculadas y seleccionadas por características agronómicas deseables y resistencia a la enfermedad, se recombinaron para iniciar un nuevo ciclo de selección de la población base. Este proceso de mejoramiento poblacional fue continuo. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de  $S_1$ , se seleccionaron grupos de 10 a 12 líneas con un atributo específico deseable, como sincronía en floración masculina y

selection program was initiated with  $S_1$  lines (Pandey and Gardner, 1992), by self-pollination of approximately 400 desirable plants in each selection cycle and producing  $S_1$  seed in each cycle. Seeds obtained from  $S_1$  plants were planted ear-to-row, in a nursery established in the Experimental Field of the Autonomous University of the State of Mexico, in El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, State of Mexico (19°24'N, 99°41'W, 2660 masl), where the disease occurs naturally. Ears from the  $S_1$  families selected for agronomic characteristics were inoculated with an aqueous suspension of 100 000 macrospores  $mL^{-1}$  of the pathogen *Sphacelia* sp. obtained in a T2 medium (Pažoutová *et al.*, 2004).

Approximately 33% of the  $S_1$  lines inoculated and selected for desirable agronomic characters and resistance to the disease were recombined to begin a new selection cycle from the base population. This population improvement process was continuous. At the same time, in each  $S_1$  evaluation cycle, groups of 10 to 12 lines with a specific desirable attribute, such as high grain yield, synchrony in male and female flowering, plant and ear heights, and resistance to the disease, were selected. These groups of lines were crossed in diallel to produce the  $F_1$  of new experimental synthetic varieties, which were advanced to  $F_2$  to be included in agronomic trials with other varieties obtained and commercial hybrids as checks, to measure their agronomic characters and grain yield.

In yield trials established with  $F_2$  seeds from experimental varieties obtained from lines of the  $C_3$ - $S_1$  cycle, the experimental variety Blanca 13 was selected for its outstanding characteristics over other genotypes included in the same trials (Table 1). In 2018, this selected variety was submitted for approval to the SNICS as a new variety called CP-Tania 5. The variety was approved and it was

femenina, altura de planta y mazorca, precocidad y resistencia a enfermedad. Estos grupos de líneas se cruzaron en dialelo para generar la F<sub>1</sub> de nuevas variedades sintéticas experimentales, que se avanzaron a F<sub>2</sub> para ser incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla F<sub>2</sub> de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C<sub>3</sub>-S<sub>1</sub>, la variedad experimental Blanca 13 fue seleccionada por sus características sobresalientes sobre otros genotipos incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2018, esta variedad seleccionada se sometió ante el SNICS para aprobación como nueva variedad, llamada CP-Tania 5, fue entregada al Colegio de Postgraduados, que fue reconocido con el título de Obtentor No. 2559, registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales-CNVV (MAZ-2179-210220) para su distribución y comercialización. Semilla básica de ésta variedad se produjo en 2019 en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Edo. de Mex. (Figura 2).

La variedad sintética de maíz CP-Tania 5 es de alto rendimiento (8.6 t ha<sup>-1</sup>), posee resistencia genética



Figura 2. Lote de producción de semilla básica de la variedad sintética de maíz CP-Tania 5. Montecillo, Edo. Méx. 2019.

Figure 2. Basic seed production plot for the synthetic maize variety CP-Tania 5. Montecillo, Edo. Méx. 2019.

delivered to the Colegio de Postgraduados with the title of Breeder No. 2559, registered in the National Catalog of Plant Varieties-CNVV (MAZ-2179-210220) for its sale and distribution. In 2019, Basic seed of this variety was produced in the Experimental Field of the Colegio de Postgraduados in Montecillos, State of Mexico (Figure 2).

**Cuadro 1. Comportamiento agronómico de la variedad sintética de maíz blanco CP-Tania 5 (Toluca, Estado de México 2017). (Segundo ensayo requerimiento del SNICS).**

**Table 1. Agronomic characters of the white synthetic maize variety CP-Tania 5 (Toluca, State of Mexico 2017). (Second trial required by SNICS).**

| Genealogía | Origen CL-16 | ASI <sup>z</sup> | Índice altura | Aspecto planta (1-5) | No. mazorcas podridas | Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> ) |
|------------|--------------|------------------|---------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Blanca 13  | EV 3         | 0.95 a           | 0.52 a        | 1.2 a                | 0.7 a                 | 8.6 a                             |
| Testigo    | BG1384W      | 0.96 a           | 0.49 ab       | 1.5 ab               | 0.7 a                 | 8.7 a                             |
| Blanca 18  | EV 2         | 0.96 a           | 0.48 ab       | 1.7 b                | 0.0 a                 | 7.6 a                             |
| Blanca 7   | EV 1         | 0.95 a           | 0.47 ab       | 1.9 b                | 0.7 a                 | 7.5 b                             |
| Promedio   |              | 0.95             | 0.49          | 1.57                 | 0.52                  | 8.1                               |
| DMS (5%)   |              | 0.2              | 0.03          | 0.583                | 0.2                   | 0.98                              |
| CV (%)     |              | 16.7             | 21.2          | 17.4                 | 29.5                  | 17.7                              |

<sup>z</sup>Anthesis Sillking Interval.

al diente de caballo, es de bajo costo y se puede sembrar por varios años. La incorporación de esta variedad en la producción puede conducir a importantes beneficios como el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, evitando de esta forma la diseminación de la enfermedad.

The maize synthetic variety CP-Tania 5 is high yielding (8.6 t ha<sup>-1</sup>), genetically resistant to horse's tooth, low-cost and can be planted for several years. Incorporating this variety into production may lead to important benefits, such as the increase in the farmer's income, due to the low cost of the seed and the increase in maize productivity, due to its high yield and resistance to the disease, avoiding the spread of the disease.

## LITERATURA CITADA

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

- De León-García de Alba C, Solano-Báez AR y Sánchez-Pale JR. 2017. Identificación y desarrollo de cultivares de maíz con alto rendimiento y resistencia al diente de caballo del maíz (*Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez). Reporte de Proyecto a SENASICA. 8 p.
- Fuentes SF, De la Isla ML, Ullstrup AJ and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in México. *Phytopathology* 54(4): 379-381.
- Meléndez-Carbajal B. 2015. Control biológico de *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg con hongos antagonistas nativos del valle de Toluca, México, en condiciones *in vitro*. Tesis. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo. Piedras Blancas, Municipio de Toluca, México. 82 p.
- Moreno-Moreno CE, De León-García de Alba C, Nava DC and Sánchez-Pale JR. 2016. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 223-241 <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-2>
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances Agronomy* 28: 1-87.
- Pažoutová S, Kolarík M and Kolínská R. 2004. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. *Mycological Research* 108(2): 126-135. <https://doi.org/10.1017/S0953756203009067>