

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

**VOLUMEN 40, NÚMERO 1, Enero 2022**



**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

M.C. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

**Editoras Adjuntas \* Senior Editors**

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

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

Dr. Vicente Febres, UF, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA

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

Dra. Sylvia P. Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Ana Paulina Velasco Ramírez, UdeG

Dra. Graciela Dolores Avila Quezada, UACH

Dra. Magnolia Moreno Velázquez, SENASICA

Dr. Raúl Allende Molar, UV

Dr. Cristian Nava Díaz, COLPOS

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, ITConkal

Dr. Gilberto Manzo Sánchez, UCol

Dr. Rubén Félix Gastélum, UAdeO

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, CIAD

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Ricardo Santillán Mendoza, INIFAP

Dr. Luis Antonio Mariscal Amaro, INIFAP

---

**Portada:** Síntomas causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate (*Solanum lycopersicum*): Epinastia y cancro en ramillas, distorsión, clorosis y necrosis foliar (superior izquierda); cancro longitudinal acropétalo en tallo (derecha); cancro ligeramente necrótico hundido, ruptura y bandeado amarillento en mesocarpio en fruto (inferior central); tejido cortical y vascular desorganizado y necrosado en tallo (inferior izquierda).

**Original:** Rivera-Sosa LM, Ramírez-Valverde G, Martínez-Yáñez B, Judith-Hernández A and Aranda-Ocampo S.

Página: 31

**SCIENTIFIC ARTICLES \* ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

***Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides \*** 1  
*Fusarium* sp., agente causal de la marchitez vascular en cítricos y su sensibilidad a fungicidas.  
Ortiz-Martínez LE, Robles-Yerena L, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M and Juárez-Rodríguez L.

**Response of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection \*** 18  
Respuesta de variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum*) a la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.  
Rivera-Sosa LM, Ramírez-Valverde G, Martínez-Yáñez B, Judith-Hernández A and Aranda-Ocampo S.

**Aqueous extracts from *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flamma* for leaf blight control in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) \*** 40  
Extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flamma* para el control del tizón foliar en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*).  
Vargas-Díaz AA, Cristóbal-Alejo J, Canto-Canché B and Gamboa-Angulo MM.

**Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitácuaro, Michoacán \*** 59  
Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Phytophthora cinnamomi* causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán.  
Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández-Pavía SP.

**REVIEW ARTICLES \* ARTÍCULOS REVISIÓN**

**Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp. \*** 82  
Aspectos moleculares de la marchitez vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y del antagonismo por *Trichoderma* spp.  
Castillo-Sanmiguel PA, Cortés-Sánchez LR and Acero-Godoy J.

**PHYTOPATHOLOGICAL NOTES \* NOTAS FITOPATOLÓGICAS**

**Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*) \*** 103  
Fungicidas y *Bacillus subtilis* contra hongos aislados en semilla comercial de pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*).  
Zárate-Ramos A, Quero-Carrillo AR, Miranda-Jiménez L, Nava-Díaz C and Robles-Yerena L.

- Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings** \* Caracterización y patogenicidad de un aislado de *Pythium aphanidermatum* causante de ‘damping off’ en plántulas de chile. 116  
Jiménez-Pérez O, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Cepeda-Siller M and Espinoza-Ahumada CA.
- First report of *Alternaria alternata* causing the golden spot in xoconostle (*Opuntia matudae*) in Hidalgo, México** \* Primer reporte de *Alternaria alternata* causante de la mancha dorada en xoconostle (*Opuntia matudae*) en Hidalgo, México. 131  
Montiel-Salero D, Jiménez-Aguilar A, Ramírez-Sánchez SE, Ruiz-Juárez D, Guerrero-Andrade O, Segundo-Pedraza E, Olivares-Orozco JL, Ramos-López MA and Flores-Macías A.

# ***Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides**

## ***Fusarium* sp., agente causal de la marchitez vascular en cítricos y su sensibilidad a fungicidas**

**Luis Enrique Ortiz-Martínez**, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología<sup>1</sup>, Postgrado en Edafología<sup>2</sup>, Colegio de Postgraduados<sup>1,2</sup>, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, México, CP 56230; **Leticia Robles-Yerena\***, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 55740; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, México, CP 56230; **Moisés Camacho-Tapia**, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, México, CP 56230; **Lucia Juárez-Rodríguez**<sup>2</sup>. \*Corresponding author: leticia.robles.i@senasica.gob.mx

Received: June 28, 2021.

Accepted: December 03, 2021.

Ortiz-Martínez LE, Robles-Yerena L, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M and Juárez-Rodríguez L. 2022. *Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 1-17.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-3>

First DOI publication: December 21, 2021.

Primera publicación DOI: 21 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** Citrus wilt is a disease of recent appearance in the northern area of Veracruz that causes economic losses to producers in the region. The present work aimed to identify the causative agent of this disease and evaluate different fungicides to determine its *in vitro* sensitivity. A fungus was consistently isolated in plants with wilt symptoms; it was morphologically identified in

**Resumen.** La marchitez y muerte de los cítricos es una enfermedad de reciente aparición en la zona norte de Veracruz, que ocasiona pérdidas económicas a los productores de la región. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar al agente causal de esta enfermedad y evaluar diferentes fungicidas para determinar su sensibilidad *in vitro*. De manera consistente se aisló un hongo en plantas con síntomas de marchitez, se identificó morfológicamente en diferentes medios de cultivo y molecularmente con los iniciadores EF1-728F/EF1-986R mediante PCR. El hongo se inoculó en tres variedades de cítricos bajo condiciones de invernadero. La prueba de sensibilidad se realizó con los fungicidas clorotalonil, benomil tiabendazol, procloraz y un biológico (*Bacillus subtilis*) a diferentes concentraciones, más un testigo negativo. Se identificó morfológica y molecularmente a *Fusarium* sp. (No. de accesión MW438335) como agente causal

different culture media and molecularly identified by PCR using the EF1-728F/EF1-986R primers. The fungus was inoculated in three varieties of citrus under greenhouse conditions. The sensitivity test was carried out with the fungicides chlorothalonil, benomyl thiabendazole, prochloraz, and a biological agent (*Bacillus subtilis*) at different concentrations, plus a negative control. *Fusarium* sp. (Accession No. MW438335) was morphologically and molecularly identified as the causal agent of vascular wilt in citrus fruits, causing growth retardation, decreased number of roots, wilting of the apical bud, and necrosis in the vascular system of the three varieties inoculated. The most effective fungicides in inhibiting mycelial growth were thiabendazole, prochloraz, and the biological agent *Bacillus subtilis*.

**Key words:** Identification, morphology, Koch's postulates, *in vitro* control.

Citrus fruits, especially orange (*Citrus sinensis*), Persian lime (*C. latifolia*), Mexican lemon (*C. aurantifolia*), mandarin (*C. reticulata*), and grapefruit (*C. paradisi*), are the most cultivated and consumed fruits throughout the world (Iqbal *et al.*, 2018). They are considered universal fruit trees because they are present in more than 100 countries and are the most economically important group of fruits, representing 20% of the world fruit market (Franco *et al.*, 2015). Mexico is the fourth largest citrus producer worldwide (FAOSTAT, 2019). Its citrus-producing areas are in tropical and subtropical areas, which causes phytosanitary problems. Among the most important diseases of citrus trees are those caused by bacteria, viruses, viroids, and fungi (Holguín *et al.*, 2012).

In 2018, in Papantla, Veracruz, 'Valencia' orange trees (*Citrus sinensis*) were observed with

de la marchitez vascular de los cítricos, mismo que ocasionó retraso de crecimiento, disminución de cantidad de raíces, marchitez del brote apical y necrosis en el sistema vascular en las tres variedades inoculadas. Los fungicidas con mayor eficacia en inhibir el crecimiento micelial fueron tiabendazol, prochloraz y el biológico *Bacillus subtilis*.

**Palabras clave:** Identificación, morfología, postulados de Koch, control *in vitro*.

Los cítricos, en especial la naranja (*Citrus sinensis*), lima persa (*C. latifolia*), limón mexicano (*C. aurantifolia*), mandarina (*C. reticulata*) y pomelo (*C. paradisi*), son las frutas más cultivadas y consumidas en todo el mundo (Iqbal *et al.*, 2018). Son considerados frutales universales ya que están presentes en más de 100 países y son el grupo de frutas más importantes económicamente, abarcando un 20% del mercado mundial de frutas (Franco *et al.*, 2015). México es el cuarto productor de cítricos mundialmente (FAOSTAT, 2019); sus áreas cítricas se encuentran en zonas tropicales y subtropicales, lo que propicia problemas fitosanitarios. Dentro de las enfermedades más importantes, están las causadas por bacterias, virus, viroides y hongos (Holguín *et al.*, 2012).

En 2018, en Papantla, Veracruz, se observaron árboles de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis*) con síntomas de clorosis, defoliación y marchitez de ramas (Figura 1). Esta enfermedad es un problema alarmante para los citricultores por las pérdidas económicas que ocasiona y se desconoce el agente causal.

Las principales enfermedades que inducen la caída de hojas y marchitez en cítricos, en especial aquellas causadas por oomicetes y ascomicetes, son ocasionadas por los siguientes géneros: *Lasioidiplodia* spp., *Phytophthora* spp. y *Fusarium*

symptoms of chlorosis, defoliation, and wilting of branches (Figure 1). This disease poses an alarming problem for citrus growers due to the economic losses it can cause and the fact that the causative agent is still unknown.

The main diseases inducing leaf drop and wilt in citrus trees are caused by the following genera: *Lasiodiplodia* spp., *Phytophthora* spp., and *Fusarium* spp. (Hannachi *et al.*, 2014; Savita and Nagpal, 2012; Valle-De la Paz *et al.*, 2019). The fungi of the genus *Fusarium* belong to the kingdom Fungi, phylum Ascomycota, order Hypocreales. They comprise a great diversity of fungi species that can be saprophytic or pathogenic to plants, animals, and humans (Moretti, 2009). They are filamentous, cosmopolitan, have well-developed septate mycelium and characteristic conidiophores (Villa-Martínez *et al.*, 2014). The *Fusarium* species complex is among the 10 most important fungal

spp. (Hannachi *et al.*, 2014; Savita y Nagpal, 2012; Valle-De la Paz *et al.*, 2019). Los hongos del género *Fusarium* pertenecen al reino fungi, phylum ascomycota y orden hipocreales, comprenden una gran diversidad de especies de hongos que pueden ser saprófitas o patógenas de las plantas, animales y humanos (Moretti, 2009). Son filamentosos, cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). El complejo de especies de *Fusarium* se encuentra en el top 10 de los principales patógenos fúngicos de plantas (Dean *et al.*, 2012), esto se debe al impacto económico negativo que provoca en la agricultura mundial, ya que son agentes causales del marchitamiento vascular y pudrición basal en una gran variedad de plantas. La pudrición de raíz causada por *Fusarium* spp., es una enfermedad destructiva en el cultivo de cítricos (Yaseen y D'Onghia, 2012). Actualmente, se reportan más



Figure 1. 'Valencia' orange trees (*Citrus sinensis*) with severe wilting and defoliation in Papantla, Veracruz.  
Figura 1. Árbol de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis*) con marchitez y defoliación severa en Papantla, Veracruz.

pathogens of plants (Dean *et al.*, 2012) due to its negative economic impact on world agriculture. These fungi are the causal agents of vascular wilting and basal rot in a wide variety of plants. Root rot caused by *Fusarium* spp. is a destructive disease of citrus crops (Yaseen and D'Onghia, 2012). More than 40 phylogenetic strains of *Fusarium* that affect citrus trees have been reported (Sandoval-Denis *et al.*, 2018). In Mexico, Parra-Cota *et al.* (2018) made the first report of wilt in 'Valencia' orange trees, caused by seven isolates of the *Fusarium solani* species complex in the Yaqui Valley, Sonora. This fungus can associate with other microorganisms and act synergistically with them (Lamichhane and Venturi, 2015). This is why determining the pathogenicity is essential for the identification of microorganisms associated with diseased plants. When the association of an organism with a disease turns out to be constant, it is important to comply with Koch's postulates to confirm its pathogenicity.

Chemical control is the main strategy for the management of fungal diseases (Villa-Martínez *et al.*, 2014). The disinfection of substrates with hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, quaternary ammonium salts, and formaldehyde is the first preventive barrier against *Fusarium inoculum* (Vásquez-Ramírez and Castaño-Zapata, 2017). The application of benzimidazole-based fungicides such as benomyl, carbendazim, thiabendazole, and thiophanate helps reduce rot caused by *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, and *Fusarium solani* (Voigt, 2002). It has also been reported that fungicides based on organomercury and formalin inhibit *Fusarium* spp. growth (Cook, 1981). The application of methyl bromide fumigant was the most common alternative for managing rot diseases until it was withdrawn from the market in 2005. Nowadays, the application of fumigants such as 1,3-dichloropropene, chloropicrin, sodium N-methyl dithiocarbamate,

de 40 cepas filogenéticas de *Fusarium* afectando cítricos (Sandoval-Denis *et al.*, 2018). En México, Parra-Cota *et al.* (2018) realizaron el primer reporte de marchitamiento en naranja 'Valencia' ocasionado por siete aislados del complejo de especies de *Fusarium solani* en el Valle del Yaqui, Sonora. Este hongo puede asociarse con otros microorganismos y actuar de forma sinérgica (Lamichhane y Venturi, 2015), por lo tanto, la determinación de patogenicidad es fundamental en la identificación de los microorganismos asociados a plantas enfermas. Cuando la asociación constante de un organismo con una enfermedad se hace evidente, es importante cumplir con los postulados de Koch para confirmar su patogenicidad.

El control químico es la principal estrategia para el manejo de enfermedades fúngicas (Villa-Martínez *et al.*, 2014). La desinfección de sustratos con peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, sales cuaternarias de amonio y formaldehído, son la primera barrera preventiva para eliminar fuentes de inóculo de *Fusarium* (Vásquez-Ramírez y Castaño-Zapata, 2017). La aplicación de fungicidas a base de benzimidazoles como benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato en las plantas ayuda a reducir las pudriciones causadas por *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* (Voigt, 2002). Asimismo, se ha reportado que los fungicidas a base de organomercurio y formalina son inhibidores de *Fusarium* spp. (Cook, 1981). La utilización de fumigante bromuro de metilo era la práctica más común para el manejo de la enfermedad, hasta que se retiró del mercado en 2005; actualmente, la aplicación de fumigantes, como 1,3-dicloropropeno, cloropicrina, N-metil ditiocarbamato de sodio y metil isotiocianato, son mayormente empleados en presembrado (McGovern, 2015; Vásquez-Ramírez y Castaño-Zapata, 2017). Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación se orientó a identificar morfológica y



and methyl isothiocyanate, is mostly used in pre-planting (McGovern, 2015; Vásquez-Ramírez and Castaño-Zapata, 2017). The present study aimed to morphologically and molecularly identify the causal agent of citrus wilt in the municipality of Papantla, Veracruz, to check if Koch's postulates were fulfilled in three citrus varieties under greenhouse conditions, and to evaluate the *in vitro* sensitivity of the pathogen to different fungicides.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the Laboratory of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico.

**Isolation and purification.** Roots and stems of eight diseased 'Valencia' orange trees were collected in four farms located in the San Pablo ejido, in the municipality of Papantla, in the state of Veracruz, Mexico. The site is located at 20° 27' N and 97° 11' W, at 45 meters above sea level. Pieces of 1 cm in length were cut in the laboratory and disinfected in sodium hypochlorite solution (1%) for one minute, rinsed twice with sterile water, and dried with sterile paper towels. Under aseptic conditions, six pieces of tissue from each sample were placed in each Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium (200 g potato, 15 g dextrose, 20 g agar in 1000 mL of distilled water), and were then incubated at room temperature for 24 h, under a 12 h light/12 h dark cycle. To obtain pure isolates, a mycelium fragment was transferred into water agar culture medium. After 24 h, small pieces of culture medium containing hyphal tips were transferred into individual Petri dishes with PDA medium.

**Morphological characterization.** Three standard culture media, Leslie and Summerell's (2006),

molecularmente al agente causal de la marchitez de los cítricos en el municipio de Papantla, Veracruz; realizar los postulados de Koch en tres variedades bajo condiciones de invernadero y evaluar la sensibilidad *in vitro* del patógeno a diferentes fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, México.

**Aislamiento y purificación.** Se colectaron raíces y tallos de ocho árboles enfermos de naranja 'Valencia' en cuatro fincas ubicadas en el ejido San Pablo, municipio de Papantla, Veracruz, México; en las coordenadas 20° 27' latitud N y 97° 11' longitud W, a 45 msnm. En laboratorio, se cortaron trozos de 1 cm de longitud y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, se enjuagaron dos veces con agua estéril y se secaron con toallas de papel estériles. En condiciones asépticas, se colocaron seis trozos de tejido por muestra en cada caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (200 g papa, 15 g dextrosa, 20 g agar en 1000 mL de agua destilada) y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, bajo un régimen de 12 h luz / 12 h de oscuridad. Para la obtención de aislados puros, se transfirió un fragmento de micelio en el medio de cultivo Agua agar, y después de 24 h se tomaron pequeños trozos de medio que contenían puntas de hifas y se transfirieron en cajas Petri individuales con medio PDA.

**Caracterización morfológica.** Para identificar la especie de estudio, se usaron tres medios de cultivo estándares establecidos por Leslie y Summerell (2006), Carnation Leaf-piece Agar (CLA), Spezieller

Carnation Leaf-piece Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), and PDA were used to identify the species under study. Semi-permanent preparations were made of eight isolates of the fungus and glycerin (50%), with five replicates per isolate. The structures were examined using a compound microscope (Nikon SMZ800®, USA) with an integrated digital camera. The 40x objective was used to take photographs, which were analyzed with the program Motic Imagen v. 3.0 (Motic Group, 2018) to perform the qualitative (shape) and quantitative (length x width) characterization of 50 macroconidia, 50 microconidia, and 20 chlamydospores per preparation. The eight fungal isolates presented the same morphological characteristics. Consequently, it was decided to work with a single isolate for further analysis.

**Pathogenicity test.** To determine the infective potential of the fungal isolate in citrus trees, three 14-month-old plants of different varieties were inoculated: ‘Valencia’ orange ‘Volkameriana’ rootstock (T4), ‘Delicias’ mandarin ‘Sour’ rootstock (T5), and ‘Valencia’ orange ‘Sour’ rootstock (T6), with their respective negative controls T1, T2, T3, with three repetitions each, in a completely randomized experimental design. Once the greenhouse experiment was set up, the plant roots were inoculated by immersion (Güler and Güldür, 2018; Herman and Perl-Treves, 2007). All the plants were removed from the substrate trying to do the least damage possible. The roots were washed with common water before inducing slight wounds in them with the help of scissors to create entrance routes for the *Fusarium* isolate. Subsequently, the roots were placed in a suspension of conidia ( $1 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>) for 24 h. Negative controls were subjected to the same treatment but their roots were immersed in sterile water. The plants were placed individually in pots containing sterile Peat Moss

Nährstoffarmer Agar (SNA) y PDA. Se hicieron preparaciones semipermanentes con glicerina al 50% de ocho aislados del hongo y cinco repeticiones por aislado. Las estructuras se examinaron en un microscopio compuesto (Nikon SMZ800®, EE. UU.) con cámara digital integrada, usando el objetivo de 40x para tomar fotografías, las cuales se analizaron con el programa Motic Imagen v. 3.0 (Motic Group, 2018) para realizar la caracterización cualitativa (forma) y cuantitativa (largo por ancho) de 50 macroconidios, 50 microconidios y 20 clamidosporas por preparación. Los ocho aislados fúngicos presentaron las mismas características morfológicas, en consecuencia, se decidió trabajar con un solo aislado para posteriores estudios.

**Prueba de patogenicidad.** Para determinar el potencial infectivo del aislado fúngico en cítricos, se inocularon en tres variedades de 14 meses de edad: naranja ‘Valencia’ portainjerto ‘Volkameriano’ (T4), mandarina ‘Delicias’ portainjerto ‘Agrio’ (T5) y naranja ‘Valencia’ portainjerto ‘Agrio’ (T6), con sus respectivos controles negativos T1, T2, T3, con tres repeticiones cada uno, en un diseño experimental completamente al azar. Una vez montado el ensayo en invernadero, se procedió a realizar la inoculación por inmersión de raíces (Güler y Güldür, 2018; Herman y Perl-Treves, 2007): se extrajeron todas las plantas del sustrato tratando de hacer el menor daño posible; con agua común se lavaron las raíces, se indujeron heridas leves en las raíces con la ayuda de tijeras para crear la vía de ingreso del aislado de *Fusarium*, posteriormente las raíces de las plantas se colocaron por 24 h en una suspensión de conidios ( $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>). Los controles negativos se sometieron al mismo método, pero sus raíces se sumergieron en agua estéril. Las plantas se colocaron individualmente en macetas con Peat Moss estéril (PRO-MIX FLEX), se mantuvieron en invernadero con una temperatura diurna y

(PRO-MIX FLEX) and kept in a greenhouse with a day and night temperature of  $39 \pm 2$  °C and  $15 \pm 2$  °C, respectively, and relative humidity of 40-83%. The growth of the vegetative shoots and the height of the plants were recorded on days 1, 15, 60, and 110 after inoculation. At 110 days after inoculation, the microorganisms were purified and described to check if they corresponded to the isolate of *Fusarium* sp. previously inoculated, and to confirm their pathogenicity. The isolation of the fungus in the plant tissue was carried out by direct seeding in PDA culture medium, according to the method proposed by Leslie and Summerell (2006), to comply with Koch's postulates.

***In vitro* fungicide sensitivity test.** Five fungicides were evaluated at different concentrations: Chlorothalonil (1, 5, 10, 100 and 300 mg L<sup>-1</sup>), Benomyl (1, 5, 10 and 100 mg L<sup>-1</sup>), Thiabendazole (0.1, 1, 5, 10 mg L<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (0.005, 0.05, 0.1 and 1 mg L<sup>-1</sup>), and Prochloraz (1, 5 and 10 mg L<sup>-1</sup>), plus a negative control that consisted of PDA medium without fungicide. Each treatment consisted of three replications in a completely randomized experimental design. To evaluate the efficacy of the fungicides, 5-day-old mycelium discs of 5 mm in diameter were seeded in the center of Petri dishes containing PDA culture medium mixed with the aqueous solution of the corresponding fungicide. All the seeded Petri dishes were labeled, sealed, and incubated at room temperature ( $26 \pm 1$  °C) under continuous darkness. The diameter of the mycelial growth was measured every 48 h until the negative control covered the Petri dish completely. The percentage of inhibition was calculated using Abbott's formula:  $(\text{Control-Treatment})/\text{Control} \times 100$  (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

**DNA extraction, PCR, and sequencing.** DNA extraction was performed using the Plant DNeasy

nocturna de  $39 \pm 2$  °C y  $15 \pm 2$  °C, respectivamente y humedad relativa del 40 – 83%. El crecimiento de los brotes vegetativos y la altura de la planta se registraron los días 1, 15, 60 y 110 días después de la inoculación. A los 110 días, se realizó la, purificación y descripción del microorganismo, para comprobar si éste correspondía al aislado de *Fusarium* sp. previamente inoculado y confirmar su patogenicidad. El aislamiento del hongo en el tejido vegetal se realizó por siembra directa en medio de cultivo PDA, según la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006), para cumplir con los postulados de Koch.

**Prueba de sensibilidad a fungicidas *in vitro*.** Se evaluaron cinco fungicidas a diferentes concentraciones: Clorotalonil (1, 5, 10, 100 y 300 mg L<sup>-1</sup>), Benomil (1, 5, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup>), Tiabendazol (0.1, 1, 5, 10 mg L<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (0.005, 0.05, 0.1 y 1 mg L<sup>-1</sup>) y Procloraz (1, 5 y 10 mg L<sup>-1</sup>), más un testigo negativo que consistió en medio PDA sin fungicida. Cada tratamiento consistió en tres repeticiones y se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para evaluar la eficacia de los fungicidas, se sembraron discos de 5 mm de diámetro de micelio con cinco días de edad en el centro de las cajas Petri con medio de cultivo PDA mezclado con la solución acuosa del fungicida correspondiente. Todas las cajas sembradas se etiquetaron, sellaron e incubaron a temperatura ambiente ( $26 \pm 1$  °C) en oscuridad continua, el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 48 h, hasta que el testigo negativo cubrió totalmente la caja Petri. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio se calculó con la fórmula de Abbot:  $(\text{Testigo-Tratamiento})/\text{Testigo} \times 100$  (Miranda-Granados *et al.*, 2018).

**Extracción de ADN, PCR y secuenciación.** La extracción de ADN se realizó con el kit Plant DNeasy

Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The PCR was carried out using primers EF1-728F/EF1-986R to amplify a 320-base pair (bp) fragment (Carbone and Kohn, 1999). The reaction mixture was prepared in a final volume of 50  $\mu$ L with PCR IX buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.8  $\mu$ M of each oligo, 0.04 U DNA polymerase (Promega, USA), and 4 ng of DNA. The PCR was performed in a C1000 thermal cycler (Bio-Rad, USA). An initial denaturation was carried out at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 54 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min. The amplified products were verified by agarose gel (1%) electrophoresis. The gel was visualized under ultraviolet light using an M-26X transilluminator and a GelDoc-It™ 300 imaging system (UVP, USA). The amplified fragments were purified using the DNA Clean & concentrator-5™ protocol (Zymo Research, USA). The purified DNA fragments were sent to Macrogen® for sequencing.

**Phylogenetic tree.** To confirm the identity of the pathogen, the sense and antisense sequences were aligned using the software MEGA X 10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018). The consensus sequence obtained was compared with those registered in the Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). To construct the phylogenetic tree and identify the clade where the consensus sequence is grouped (*Fusarium* sp. Isolated Veracruz), the sequences of the translation elongation factor 1 alpha (TEF-1 $\alpha$ ) of the species complex comprising *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, and *F. citricola*, which affect citrus plants, were downloaded from GenBank (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen and D'Onghia, 2012), as well as the sequences that were most similar to those of the species under study (Table 1). The species

Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la PCR se utilizaron los iniciadores EF1-728F/EF1-986R, que amplifican un fragmento de 320 pares de bases (pb) (Carbone y Kohn, 1999) y la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50  $\mu$ L, buffer de PCR IX, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.8  $\mu$ M de cada oligo, 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 4 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE.UU.), se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se analizó con luz ultravioleta con un transiluminador M-26X usando un sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE.UU.). Los fragmentos amplificados se purificaron mediante el protocolo de DNA clean & concentrator™-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos de ADN purificados se mandaron a secuenciar a la empresa Macrogen®.

**Árbol filogenético.** Para confirmar la identidad del patógeno, se realizó el ensamble de las secuencias sentido y antisentido con el software MEGA X 10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018). La secuencia consenso obtenida se comparó con aquellas registradas en el Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para realizar el árbol filogenético e identificar el clado donde se agrupa la secuencia consenso (*Fusarium* sp. aislado Veracruz), se descargaron del GenBank las secuencias del factor de elongación de traducción 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ) del complejo de especies de *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y *F. citricola* que afectan al cultivo de cítricos (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen y D'Onghia, 2012), así como las secuencias que tuvieron mayor similitud con la especie en estudio

**Table 1. Sequences of *Fusarium* isolates obtained from GenBank and used in the phylogenetic tree (Sandoval-Denis *et al.*, 2018).**  
**Cuadro 1. Secuencias de aislados de *Fusarium* obtenidas de GenBank y utilizadas en el árbol filogenético (Sandoval-Denis *et al.*, 2018).**

Species	Strain	Host	GenBank
			Access Number TEF-1 $\alpha$
<i>F. solani</i>	CPC 28189	<i>Citrus sinensis</i>	LT746226
<i>F. solani</i>	CPC 27193	<i>C. sinensis</i>	LT746222
<i>F. solani</i>	CPC 27198	<i>C. sinensis</i>	LT746223
<i>F. solani</i>	CPC 27192	<i>C. sinensis</i>	LT746221
<i>F. macrosporium</i>		<i>C. sinensis</i>	LT746218
<i>F. croci</i>		<i>C. sinensis</i>	LT746216
<i>F. oxysporum</i>	CPC 28190	<i>C. sinensis</i>	LT746206
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27700	<i>C. sinensis</i>	LT746203
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27196	<i>C. sinensis</i>	LT746202
<i>F. oxysporum</i>	CPC 27194	<i>C. sinensis</i>	LT746201
<i>F. citricola</i>	CPC 27813	<i>C. reticulata</i>	LT746198
<i>F. citricola</i>	CPC 27709	<i>C. sinensis</i>	LT746196
<i>F. citricola</i>	CPC 27069	<i>C. sinensis</i>	LT746195
<i>F. citricola</i>	CPC 27067	<i>C. limon</i>	LT746194
<i>F. polyphialidicum</i>		<i>Vanilla planifolia</i>	GQ425229
<i>F. concolor</i>			KY794889

*Colletotrichum truncatum* (KM818513) was used as an external group. Multiple sequence alignment was performed using MUSCLE. The phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood (ML) method with 1500 bootstrap repetitions, based on the two-parameter Kimura model and the gamma distribution. The model used was obtained using the model test function in the MEGA X software.

#### Experimental design and statistical analysis.

The data obtained was subjected to an analysis of variance for the variables of plant height and percentage of inhibition of mycelial growth. Tukey's test for multiple comparisons of means ( $P \leq 0.05$ ) was used for variables with significant effect. The statistical de analysis was carried out using the statistical package SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

(Cuadro 1). Se utilizó como grupo externo a la especie *Colletotrichum truncatum* (KM818513). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con MUSCLE. El árbol filogenético se obtuvo mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML) con 1500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Kimura de dos parámetros y distribución gamma. El modelo utilizado se obtuvo mediante una prueba de modelos con el software MEGA X.

#### Diseño experimental y análisis estadístico.

A partir de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza para las variables de altura de la planta y porcentaje de inhibición en el crecimiento mical con el diseño experimental completamente al azar, así como una comparación múltiple de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para variables cuyo efecto fue significativo, en el cual se usó el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Morphological identification.** Eight isolates were obtained. They presented a circular border, white and orange mycelium with a diameter of 2.6 cm after three days of growth in PDA medium. Macroconidia with two to three septa were observed in CLA medium, with the dorsal side more curved than the ventral side and measuring  $16\text{--}30 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$ . The microconidia presented zero or one septum, oval in shape,  $9\text{--}17 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$  in size. In CLA medium, chlamydospores measured  $6\text{--}10 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$ , and pale yellow sporodochia were formed (Figure 2). According to the molecular and

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica.** Se aislaron ocho aislados, los cuales presentaron un borde circular, micelio de color blanco y anaranjado, con un diámetro de 2.6 cm de tres días de crecimiento en medio PDA. En medio CLA se observaron macroconidios con dos a tres septos, con el lado dorsal más curvo que el ventral y midieron de  $16\text{--}30 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$ . Los microconidios presentaron entre cero y un septo, de forma oval, de  $9\text{--}17 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ . En medio CLA, las clamidosporas midieron  $6\text{--}10 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$  y se formaron esporodocios de color amarillo pálido (Figura 2). De acuerdo con las características

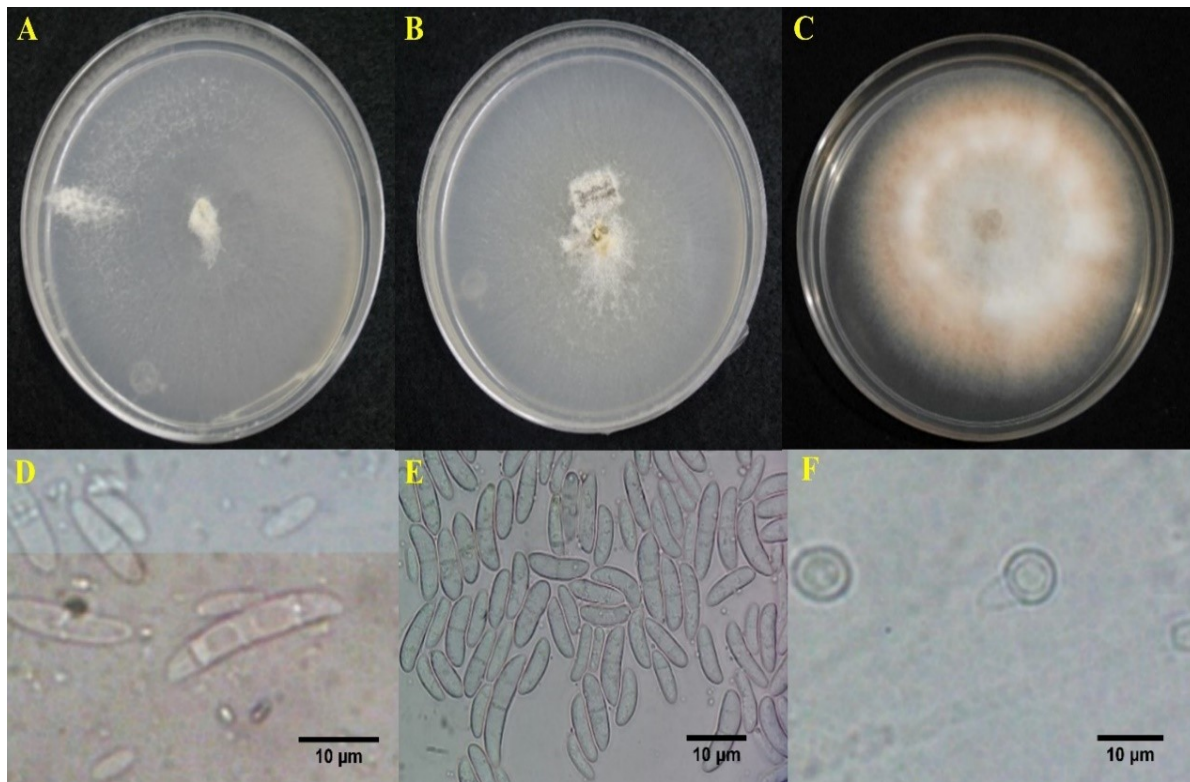


Figure 2. *Fusarium* sp. isolated from ‘Valencia’ orange tree (*Citrus sinensis*). A) Growth of *Fusarium* sp. in SNA medium; B) in CLA medium; C) in PDA; D) macroconidia; E) microconidia; F) chlamydospores.

Figura 2. *Fusarium* sp. aislado de naranjo ‘Valencia’ (*Citrus sinensis*). A) Crecimiento de *Fusarium* sp., en medio SNA, B) en medio CLA, C) en PDA, D) macroconidios, E) microconidios y F) clamidosporas.

morphological characteristics observed here, the eight isolates correspond to the genus *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). The fungal isolates presented the same morphological characteristics. Consequently, it was decided to work with a single isolate in subsequent studies.

**Pathogenicity test.** Ten days after inoculation, all plants that were in contact with the spore suspension exhibited wilt symptoms on vegetative shoots. Sandoval-Denis *et al.* (2018) reported that *Fusarium sarcochroum* causes regressive death in lemon and mandarin branches in Italy and Spain. In the present study, the inoculated plants showed little growth of the root system and a brown or dark reddish-brown coloration in the vascular bundle. This partially agrees with what was reported by Hannachi *et al.* (2015), who observed a reduction in growth and a limited number of roots in citrus plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*, three weeks after inoculation. The fungus was isolated from root tissue with vascular necrosis, fulfilling Koch's postulates (Figure 3).

The non-inoculated treatments of 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock (T1), 'Delicias' mandarin 'Sour' rootstock (T2), and 'Valencia' orange 'Sour' rootstock (T3), had a height of 103 to 112 cm 110 days after inoculation, while the inoculated treatments (T4, T5, and T6) were between 85 and 93 cm in height. This meant a 16.9-17.4% reduction in height compared with the non-inoculated treatments (Figure 4). These results indicate that the pathogen can affect the growth of citrus plants, which agrees with the results reported by Baysal-Gurel and Cinar (2015) on grapefruit trees infected with *F. oxysporum*, which showed reduced vigor and foliage chlorosis.

**Fungicide sensitivity test.** The analysis of variance showed significant differences between the treatments. The treatments that inhibited

culturales y morfológicas aquí observadas, los ocho aislados corresponden al género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Asimismo, los aislados fúngicos presentaron las mismas características morfológicas, en consecuencia, se decidió trabajar con un solo aislado para posteriores estudios.

**Prueba de patogenicidad.** Diez días después de la inoculación, todas las plantas que estuvieron en contacto con la suspensión de esporas exhibieron síntomas de marchitez en los brotes vegetativos. Sandoval-Denis *et al.* (2018) reportaron que *Fusarium sarcochroum* causa muerte regresiva en ramas de limón y mandarina, en Italia y España. Por otra parte, las plantas inoculadas presentaron escaso crecimiento en el sistema radical y en el haz vascular se observó una coloración marrón o café rojizo oscuro. Lo cual concuerda parcialmente con lo reportado por Hannachi *et al.* (2015) quienes observaron una reducción de crecimiento y número limitado de raíces en plantas de cítricos inoculados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*, tres semanas después de la inoculación. A partir de tejido de raíz con necrosis vascular, se logró aislar el hongo y cumplir con los postulados de Koch (Figura 3).

Los tratamientos no inoculados de naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' (T1), mandarina 'Delicias' portainjerto 'Agrio' (T2) y naranja 'Valencia' portainjerto 'Agrio' (T3), tuvieron una altura de 103 a 112 cm a los 110 días después de la inoculación, mientras que los tratamientos inoculados (T4, T5 y T6) presentaron una altura entre 85 y 93 cm, esto significó una reducción del 16.9 al 17.4% de la altura respecto a los tratamientos no inoculados (Figura 4). De acuerdo con los resultados, se concluyó que el patógeno tiene la capacidad de afectar el crecimiento de los cítricos. Lo cual concuerda con lo reportado por Baysal-Gurel y Cinar (2015) para árboles de pomelo infectados con *F. oxysporum*, los cuales mostraron un reducido vigor y clorosis en el follaje.

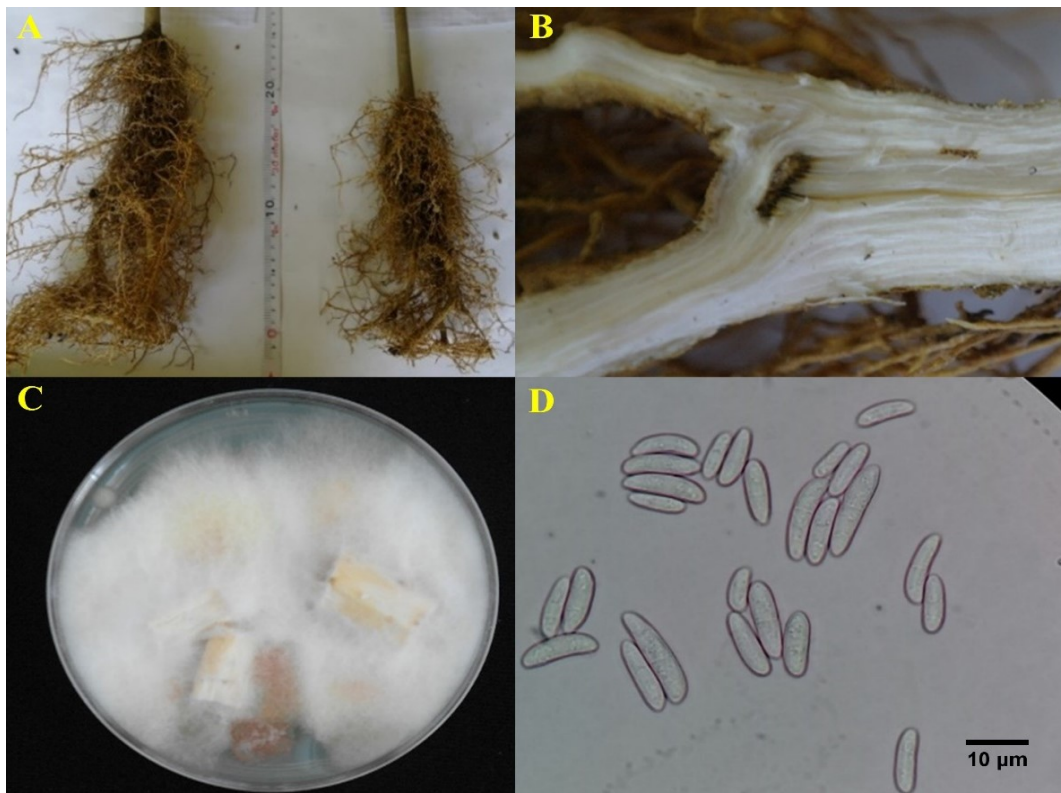


Figure 3. A) Root system of non-inoculated 'Valencia' 'Volkameriana' rootstock plants (left) vs 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock inoculated with *Fusarium* sp. (right); B) necrosis in the vascular system of the inoculated plant; C) recovery of the inoculated isolate in citrus plants; D) microconidia of the recovered isolate.

Figura 3. A) Sistema radical de plantas de naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' no inoculado (izquierda) vs naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano' inoculado con *Fusarium* sp. (derecha), B) necrosis en el sistema vascular en la planta inoculada, C) recuperación del aislado inoculado en cítricos y D) microconidios del aislado recuperado.

mycelial growth were thiabendazole, *B. subtilis*, and prochloraz (Table 2). Thiabendazole inhibited 100% of mycelial growth starting at a concentration of 5 mg L<sup>-1</sup>. These results are similar to those reported by Yossen and Conles (2014), who reported that thiabendazole had 99.8% efficacy in the control of *F. oxysporum* at 4 mg L<sup>-1</sup> under *in vitro* conditions. *B. subtilis* presented 100% inhibition from 1 mg L<sup>-1</sup> and Romero-Velázquez *et al.* (2015) found that *B. subtilis* inhibited 100% of the growth of *F. oxysporum* starting at a concentration of 0.01 mg L<sup>-1</sup>. The difference in the sensitivity to *B. subtilis* between the present study

**Prueba de sensibilidad a fungicidas.** El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los tratamientos. Los tratamientos que inhibieron el crecimiento micelial fueron, tiabendazol, *B. subtilis* y procloraz (Cuadro 2). Tiabendazol inhibió 100% del crecimiento micelial a partir de 5 mg L<sup>-1</sup>. Lo cual es similar a lo reportado por Yossen y Conles (2014) quienes detectaron con tiabendazol un 99.8% de eficacia en el control de *F. oxysporum* a 4 mg L<sup>-1</sup> en condiciones *in vitro*. *B. subtilis* presentó 100% de inhibición a partir de 1 mg L<sup>-1</sup> y Romero-Velázquez *et al.* (2015) encontraron que *B. subtilis* inhibió 100% a *F. oxysporum* a partir de 0.01 mg



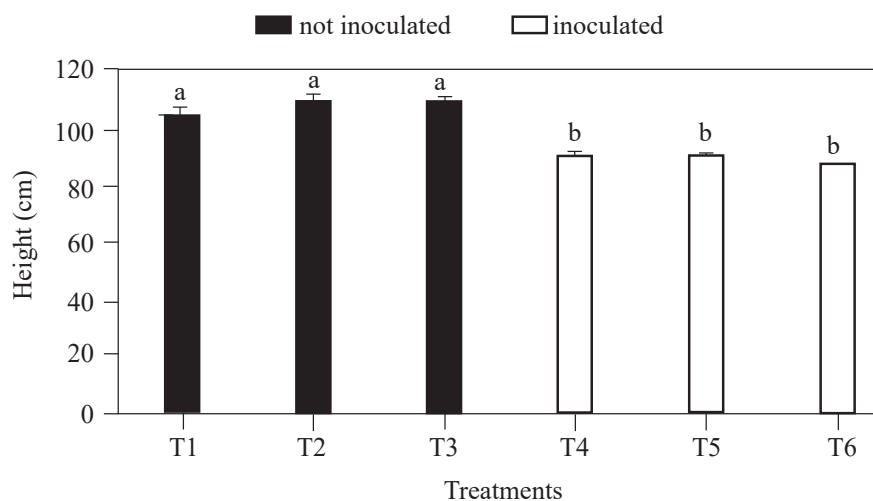


Figure 4. Height of citrus plants inoculated with *Fusarium* sp. 110 days after inoculation. T1, T4: 'Valencia' orange 'Volkameriana' rootstock; T2, T5: 'Delicias' mandarin 'Sour' rootstock; T3, T6: 'Valencia' orange 'Sour' rootstock. Means with different letters are statistically different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Figura 4. Altura de las plantas de cítricos inoculados con *Fusarium* sp., a los 110 días después de la inoculación. T1, T4: naranja 'Valencia' portainjerto 'Volkameriano'; T2, T5: mandarina 'Delicias' portainjerto 'Agrio'; T3, T6: naranja 'Valencia' portainjerto 'Agrio'. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Table 2. Percentage of inhibition of the mycelial growth of *Fusarium* sp. treated with fungicides and *B. subtilis*.  
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. tratado con fungicidas y *B. subtilis*.

Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Control	Chlorothalonil	Benomyl	Thiabendazole	<i>B. subtilis</i>	Prochloraz
	0.0 h <sup>x</sup>					
0.005					81.0 bc	
0.05					82.3 bc	
0.1				0.0 h	80.6 bc	
1		24.3 g	10.0 h	33.3 gf	100.0 a	75.3 dc
5		36.6 gf	73.0 dce	100.0 a		84.6 bc
10		40.6 f	74.0 dce	100.0 a		92.3 ba
100		61.3 e	85.3 bc			
300		62.0 de				
DMSH <sup>y</sup>	13.6					
CV <sup>z</sup> (%)	6.7					
Media	64.8					

<sup>x</sup>Means with different letters are statistically different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). <sup>y</sup>DMSH: honest minimum significant difference; <sup>z</sup>CV: coefficient of variation. / <sup>x</sup>Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). <sup>y</sup>DMSH: diferencia mínima significativa honesta; <sup>z</sup>CV: coeficiente de variación.

and the study of Romero-Velázquez *et al.* (2015) may be due to the different strains of *B. subtilis* used in each study. It is possible that the fungi belong to different *Fusarium* species or that the isolates used in the present study are resistant to *B. subtilis* (Bardin *et al.*, 2015). Further studies are required to corroborate these assumptions.

Similar studies have found that *B. subtilis* isolates produce substances such as ammonia and indole acetic acid (IAA), which inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum* (Mohammed *et al.*, 2019; Sharifi and Ramezani, 2003). Prochloraz inhibited 92% of mycelial growth starting at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>. These results agree with those reported by Song *et al.* (2004), who found that the most effective fungicides for inhibiting the mycelial growth of *F. oxysporum* were prochloraz and carbendazim. Similar results showed that prochloraz inhibited 100% of the growth of *F. oxysporum* under *in vitro* conditions at a concentration of 100-1000 mg L<sup>-1</sup> (Romero-Velázquez *et al.*, 2015). Amini and Sidovich (2010) demonstrated that under field conditions the application of 10 mg L<sup>-1</sup> of bromuconazole and prochloraz completely reduced the severity of the disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causative agent of vascular wilt in tomato.

#### **Molecular identification and phylogenetic tree.**

BLASTN searches using partial TEF1 sequences from the pathogenic isolate showed 98.7% similarity to *F. polyphialidicum* (accession No. GQ425229). The phylogenetic tree yielded four highly contrasting lineages, three of which corresponded to the species complex formed by *F. oxysporum*, *F. citricola*, and *F. solani*, currently known as citrus pathogens (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen and D'Onghia, 2012). The fourth lineage grouped *Fusarium* sp. isolated Veracruz, *F. polyphialidicum*, and *Fusarium* cf. *concolor* (Figure 5).

L<sup>-1</sup>. La diferencia encontrada en la sensibilidad a *B. subtilis* en este estudio y la reportada por Romero-Velázquez *et al.* (2015), puede deberse a las cepas de *B. subtilis* utilizadas en los estudios, los hongos pertenecen a diferentes especies de *Fusarium* o el aislado de esta investigación puede presentar resistencia a *B. subtilis* (Bardin *et al.*, 2015), aunque es preciso realizar más estudios para corroborar dichos supuestos.

Estudios similares han encontrado que los aislados de *B. subtilis* producen sustancias como el amoníaco y ácido indol acético (IAA) que inhiben el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (Mohammed *et al.*, 2019; Sharifi y Ramezani, 2003). Prochloraz inhibió 92% del crecimiento micelial a partir de 10 mg L<sup>-1</sup>. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Song *et al.* (2004), donde encontraron que los fungicidas más efectivos para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* fueron prochloraz y carbendazim. Resultados similares mostraron que prochloraz inhibió 100% a *F. oxysporum* en condiciones *in vitro* a una concentración de 100 - 1000 mg L<sup>-1</sup> (Romero-Velázquez *et al.*, 2015). Mientras que, en condiciones de campo, Amini y Sidovich (2010) demostraron que la aplicación de 10 mg L<sup>-1</sup> de bromuconazole y prochloraz, redujeron completamente la severidad ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal de la marchitez vascular en jitomate.

#### **Identificación molecular y árbol filogenético.**

Búsquedas en BLASTN usando secuencias parciales TEF1 del aislado patogénico, generó 98.7% de similitud con *F. polyphialidicum* (No. de acceso GQ425229). El árbol filogenético arrojó cuatro linajes altamente contrastantes, de los cuales, tres correspondieron al complejo especies de *F. oxysporum*, *F. citricola* y *F. solani*, actualmente conocidos como agentes patógenos de cítricos (Liu *et al.*, 2020; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Yaseen y D'Onghia, 2012). Mientras que el cuarto linaje

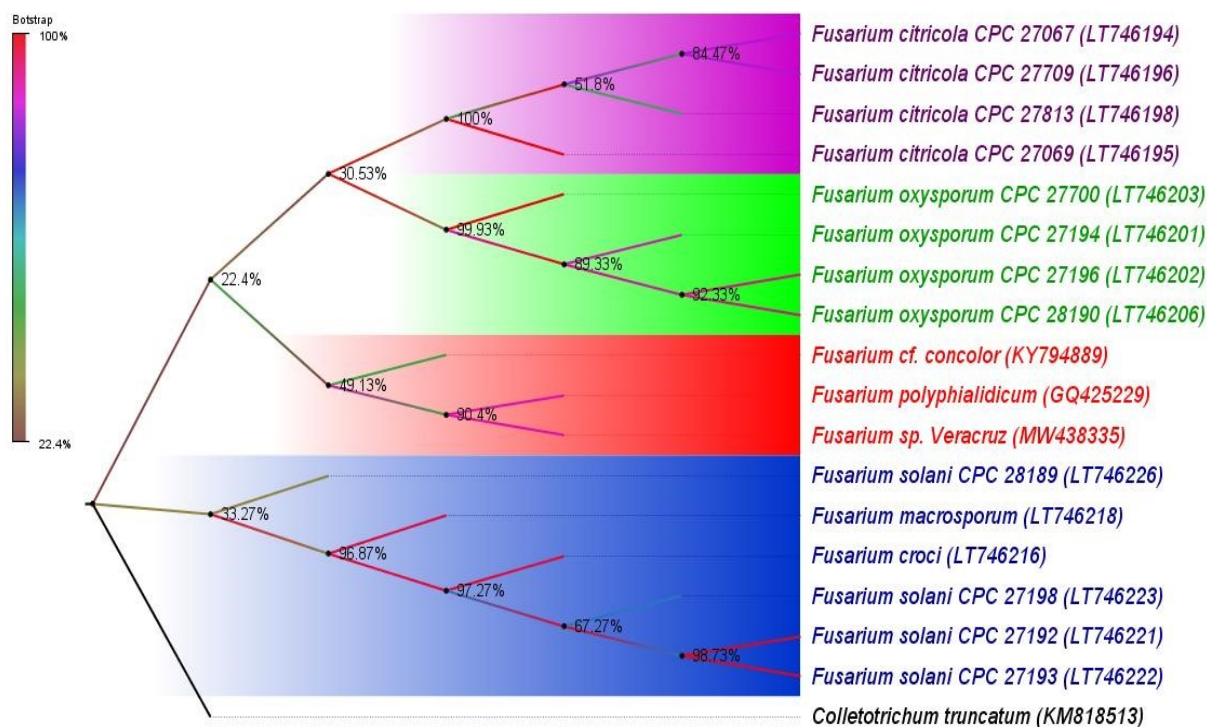


Figure 5. Phylogenetic tree based on the comparison of the sequences of the TEF-1 $\alpha$  of *Fusarium* species. *Maximum Likelihood* (ML) with 1500 bootstrap repeats, based on the two-parameter Kimura model and the gamma distribution. The isolate under study is *Fusarium* sp., isolated in Veracruz. The accession numbers of the sequences registered in the NCBI database are indicated in parentheses.

Figura 5. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del TEF-1 $\alpha$  de especies de *Fusarium*. *Maximum Likelihood* (ML) con 1500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros y distribución gamma. El aislado de estudio es *Fusarium* sp. aislado Veracruz. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias registradas en la base de datos del NCBI.

## CONCLUSIONS

The morphological characterization, molecular identification, and pathogenicity tests confirm that *Fusarium* sp., and possibly *F. polyphialidicum*, is the causal agent of vascular wilt in citrus plants from Papantla, Veracruz. The symptoms presented by infected citrus trees were apical bud wilting, growth retardation, decreased number of roots, and necrosis of the vascular system. All three varieties of citrus plants were affected by the pathogen. The fungicides with the highest efficacy in inhibiting mycelial growth were thiabendazole (100%), *B.*

agrupó a *Fusarium* sp. aislado Veracruz, *F. polyphialidicum* y *Fusarium cf. concolor* (Figura 5).

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la caracterización morfológica, la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad, se confirma a *Fusarium* sp., posiblemente *F. polyphialidicum* como agente causal de la marchitez vascular de los cítricos en Papantla, Veracruz. Los síntomas que presentaron los árboles de cítricos infectados fue marchitez de brote apical, retraso de

*subtilis* (100%) and prochloraz (92%) under *in vitro* conditions.

## LITERATURE CITED

- Amini J and Sidovich DF. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50:172-178. <http://www.plantprotection.pl/The-effects-of-fungicides-on-Fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici-associated-with,91523,0,2.html>
- Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillot B, Siegwart M and Nicot PC. 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science* 6: 566. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>
- Baysal-Gurel F and Cinar A. 2015. First report of *Fusarium* root rot caused by *Fusarium oxysporum* infecting pigmented grapefruit trees in Turkey. *Plant Disease* 99: 553. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0746-PDN>
- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Cook RJ. 1981. *Fusarium* diseases in the People's Republic of China. Pp:53-55. In: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy* (eds PE Nelson TA Toussoun y RJ Cook). University Park, Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- FAOSTAT. 2019. Food and agriculture data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (consulta, diciembre 2020).
- Franco VA, Castillo LS, García OJ y Rodríguez NE. 2015. Situación de la citricultura en el Estado de Nuevo León. Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. <https://docplayer.es/28330442-Situacion-de-la-citricultura-en-nuevo-leon-cdanl-%20corporacion-para-el-desarrollo-agropecuario-gobierno-del-estado-de-nuevo-leon.html> (consulta, noviembre 2020).
- Güney IG and Güldür ME. 2018. Inoculation techniques for assessing pathogenicity of *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* on pepper seedlings. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 5(1): 1-8. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/402109>
- Hannachi I, Poli A, Rezgui S, Prasad RD and Cherif M. 2015. Genetic and phenotypic differences of *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri* isolated from sweet orange and tangerine. *European Journal of Plant Pathology* 142: 269-280. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0611-1>
- crecimiento, disminución de cantidad de raíces y necrosis del sistema vascular. Las tres variedades de cítricos fueron afectadas por el patógeno. Los fungicidas con mayor eficacia para inhibir el crecimiento micelial fueron tiabendazol (100%), *B. subtilis* (100%) y prochloraz (92%) bajo condiciones *in vitro*.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Hannachi I, Rezgui S and Cherif M. 2014. First report of mature citrus trees being affected by *Fusarium* wilt in Tunisia. *Plant Disease* 98: 566. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1134-PDN>
- Herman R and Perl-Treves R. 2007. Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant Disease* 91:1180-1186. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1180>
- Holguín PRJ, Hernandez MLG y Zulueta RR. 2012. El huanglongbing: la tristeza de los cítricos. *La ciencia y el hombre* 25:3. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num3/articulos/huanglongbing/>
- Iqbal Z, Khan MA, Sharif M, Shah JH, ur Rehman MH and Javed K. 2018. An automated detection and classification of citrus plant diseases using image processing techniques: a review. *Computers and Electronics in Agriculture* 153: 12-32. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.07.032>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lamichhane JR and Venturi V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*. 6:385. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Leslie JF and Summerell B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Manhattan, USA. 388p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Liu HF, Zhou J, Liao J, Yi JP, Ma DF and Deng JX. 2020. Grafted twig rot on *Citrus sinensis* caused by a member of the *Fusarium solani* species complex. *Canadian Journal of Plant Pathology* 42: 133-139. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1633412>
- McGovern RJ. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73:78-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Miranda-Granados J, Chacón C, Ruiz-Lau N, Vargas-Díaz ME, Zepeda LG, Álvarez-Gutiérrez P, Meza-Gordillo R and Lagunas-Rivera S. 2018. Alternative use of extracts

- of chipilín leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as antimicrobial. Sustainability 10: 883. <https://doi.org/10.3390/su10030883>
- Mohammed BL, Hussein RA and Toama FN. 2019. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. Energy Procedia 157:171-179. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.178>
- Moretti A. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. Matica Serbian Journal for Natural Sciences 117:7-13. <https://doi.org/10.2298/zmspn0917007m>
- Motic Group. 2018. Motic images plus for windows 64 bit. Release 3.0. Motic Group. Hong Kong, China. <https://moticeurope.com/en/news-and-events/post/motic-images-plus-3-0-user-manual.html>
- Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN, y Santos-Villalobos S. 2018. Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. valencia en el Valle del Yaqui, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 193-201. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-3>
- Romero-Velázquez SD, Tlalpan-Bolaños B, Cadena-Iñiguez J, Nieto-Ángel D, y Arévalo-Galarza ML. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) SW.) y su control *in vitro*. Agronomía Costarricense 39:19-32. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/436/43642603002/43642603002.pdf>
- Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G and Crous PW. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia 40:125. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.01>
- SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. North Carolina, USA.
- Savita GVS and Nagpal A. 2012. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species. GERF Bulletin of Biosciences 3:18-27. [https://www.academia.edu/5763877/Citrus\\_diseases\\_caused\\_by\\_Phytophthora\\_species](https://www.academia.edu/5763877/Citrus_diseases_caused_by_Phytophthora_species)
- Sharifi TA and Ramezani M. 2003. Biological control of *Fusarium oxysporum*, the causal agent of onion wilt by antagonistic bacteria. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 68:543-547. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15151288/>
- Song W, Zhou L, Yang C, Cao X, Zhang L and Liu X. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection 23:243-247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.007>
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón-Hernández AR, Alía-Tejagal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández V, Hernández-Arenas M y Ariza-Flores F. 2019. Especies de *Lasiodiplodia* en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. Revista Bio Ciencias 6: e595. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e595>
- Vásquez-Ramírez LM and Castaño-Zapata J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica 20:363-374. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262017000200014](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014)
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales HA, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra JM y Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica 64:194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Voigt K. 2002. Management of *Fusarium* Diseases. Pp:217-242. In: Kempken F (eds.). Agricultural Applications. Vol. 11. Springer. Berlin, Germany. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2\\_388p](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_388p)
- Yaseen T and D'Onghia AM. 2012. *Fusarium* spp. associated to citrus dry root rot: an emerging issue for mediterranean citriculture. Acta Horticulturae 940:647-655. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.89>
- Yossen VE y Conles MY. 2014. Eficacia de fungicidas *in vitro* para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán 91:19-25. [https://nanopdf.com/download/eficacia-de-fungicidas-in-vitro-para-el-control-de-fusarium\\_pdf](https://nanopdf.com/download/eficacia-de-fungicidas-in-vitro-para-el-control-de-fusarium_pdf)

# Response of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection

## Respuesta de variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum*) a la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Luis Martín Rivera-Sosa, Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla. Avenida José Luis Martínez Vázquez No. 2000 Jicolapa, Zacatlán, Puebla, CP 73310, México; <sup>1</sup>Gustavo Ramírez-Valverde, <sup>1</sup>Postgrado en Estadística, <sup>2</sup>Postgrado en Genética, <sup>3</sup>Postgrado en Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; <sup>2</sup>Beatriz Martínez-Yáñez, <sup>3</sup>Alfonsina Judith-Hernández, <sup>3</sup>Sergio Aranda-Ocampo\*.

\*Corresponding author: saranda@colpos.mx

Received: June 29, 2021.

Accepted: December 09, 2021.

Rivera-Sosa LM, Ramírez-Valverde G, Martínez-Yáñez B, Judith-Hernández A and Aranda-Ocampo S. 2022. Response of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 18-39.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-8>

First DOI publication: December 24, 2021.

Primera publicación DOI: 24 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causes bacterial wilt and canker disease of tomato. The objectives of this research were i) to characterize and identify the most aggressive Cmm in Chignahuapan, Puebla, ii) to evaluate the tolerance in two phenological stages of 10 tomato varieties to infection by CP\_Cmm-1 in the greenhouse and the *in vitro* sensitivity of the bacteria to bactericides. 12 Cmm isolates

**Resumen.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la enfermedad marchitez y cancro del jitomate. Los objetivos de esta investigación fueron i) caracterizar e identificar a Cmm más agresivo en Chignahuapan, Puebla, ii) evaluar la tolerancia en dos etapas fenológicas de 10 variedades de jitomate a la infección por CP\_Cmm-1 en invernadero y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria a bactericidas. Se colectaron 12 aislamientos de Cmm de plantas de jitomate y se seleccionó una cepa (CP\_Cmm-1) con mayor agresividad de acuerdo al tiempo de manifestación de síntomas en plantas de la var. Reserva. Después, la cepa se inoculó por el corte con tijeras embebidas en una suspensión con  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> en dos etapas fenológicas (a los cinco y 10 hojas verdaderas). Se evaluó la sintomatología durante 30 días después de la inoculación. Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad de CP\_Cmm-1 ante ocho bactericidas comerciales *in vitro*. Los resultados mostraron que la cepa CP\_Cmm-1 se identificó con 97%

were collected from tomato plants and a strain (CP\_Cmm-1) with greater aggressiveness was selected according to the time of manifestation of symptoms in plants of var. Reserva. Afterward, the strain was inoculated by cutting with scissors embedded in a suspension with  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> in two phenological stages (at five and 10 true leaves). Symptoms were evaluated for 30 days after inoculation. Additionally, the sensitivity of CP\_Cmm-1 to eight commercial bactericides *in vitro* was evaluated. The results showed that the CP\_Cmm-1 strain was identified with 97% similarity with the API20 E system, positive with DAS-ELISA, and by PCR it showed 96.6% identity with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The Sahel variety showed greater tolerance to infection (\* =  $p \leq 0.05$ ) both in the stage of five and 10 leaves; the varieties Sv4401, Nápoles, and Súper óptimo showed greater susceptibility in the five-leaf stage. The Sv4401 variety was highly susceptible in both stages. Neither variety was resistant to infection by CP\_Cmm-1. The use of the Sahel variety and kasugamycin could reduce the damage of this bacteria.

**Key words:** bactericides, vascular infection, tolerance, bacteria, varieties.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is the second most consumed vegetable in the world and in Mexico it is the most important in the agri-food sphere (SADER, 2020). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causes “wilt” and “bacterial canker” and it is the most destructive and recurring disease in the tomato crop. In Mexico, it causes an estimated economic loss of 40 million dollars a year (Borboa-Flores *et al.*, 2009). Cmm is an international quarantine pathogen (EFSA, 2014; EPPO, 2016). Wilt and canker are more

de similitud con el sistema API20 E, positivo con DAS-ELISA y por PCR mostró 96.6% de identidad con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La variedad Sahel mostró mayor tolerancia a la infección (\* =  $p \leq 0.05$ ) tanto en la etapa de cinco como 10 hojas; las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo mostraron mayor susceptibilidad en la etapa de cinco hojas. La variedad Sv4401 fue altamente susceptible en ambas etapas. Ninguna variedad fue resistente a la infección por CP\_Cmm-1. El uso de la variedad Sahel y kasugamicina podría reducir el daño de esta bacteria.

**Palabras clave:** bactericidas, infección vascular, tolerancia, bacteria, variedades.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es la segunda hortaliza de mayor consumo en el mundo y en México es la más importante en el ámbito agroalimentario (SADER, 2020). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la “marchitez” y “cancro bacteriano” y es la enfermedad más destructiva y recurrente en el cultivo de jitomate; en México, causa pérdidas económicas estimadas en 40 millones de dólares anuales (Borboa-Flores *et al.*, 2009). Cmm es un patógeno de cuarentena internacional (EFSA, 2014; EPPO, 2016). La marchitez y cancro son más severos en los sistemas de producción bajo cubierta debido a las condiciones ambientales y continuas prácticas de cultivo que favorecen la infección (Martínez-Castro *et al.*, 2018; Yuqing *et al.*, 2018). Cmm infecta los vasos del xilema y causa síntomas de marchitez, clorosis marginal de hojas y grietas (cancro) en el tallo (Bae *et al.*, 2015), se disemina principalmente por semilla (Nandi *et al.*, 2018), uso de plántula infectada, herramientas, suelo y agua (Tancos *et al.*, 2013), contacto del fluido de gutación entre plantas sanas y enfermas (Sharabani *et al.*, 2013a) y

severe in indoor production systems, due to the environmental conditions and continuous farming practices that promote infections (Martínez-Castro *et al.*, 2018; Yuqing *et al.*, 2018). Cmm infects the xylem vessels and causes symptoms of wilting, marginal leaf chlorosis and cracks (canker) on the stem (Bae *et al.*, 2015). It is disseminated mainly via seeds (Nandi *et al.*, 2018), the use of infected seedlings, tools, soil and water (Tancos *et al.*, 2013), contact with the guttation fluids between healthy and diseased plants (Sharabani *et al.*, 2013a) and nutrient solutions in hydroponic crops (Huang and Tu, 2001).

The Cmm strains with the most virulence harbor the plasmids pCM1(27.4 kb) and pCM2 (70.0 kb), which codify for the production of polysaccharides (EPS) and extracellular enzymes (Dreier *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008), which confer pathogenicity, different degrees of virulence and aggressiveness between isolated strains from different areas of the world (Wasserman *et al.*, 2020; Yuqing *et al.*, 2018), as well as the ability to adapt to new habitats (Nandi *et al.*, 2018).

To date, no commercial varieties with complete resistance to Cmm have been found or other effective control measures, which causes severe epidemics (Nandi *et al.*, 2018). In other countries, tomato varieties with greater tolerance to the disease have been identified (Eichenlaub and Gartemann, 2011). Wild forms of tomato have Cmm-resistant genes, although the inheritance of these genes is complex and express undesirable traits, such as small fruits and low yields during genetic breeding (Bae *et al.*, 2015; Coaker *et al.*, 2004). Diverse control strategies have been studied, including chemical control, mainly using antibiotics and copper-based compounds (de León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009), biological control (Nandi *et al.*, 2018), the use of plant extracts (Muhammad *et al.*, 2020), bacteriocins (Mirzaee *et al.*, 2021) with a limited

solución nutritiva en cultivos hidropónicos (Huang y Tu, 2001).

Las cepas de Cmm con mayor virulencia albergan los plásmidos pCM1(27.4 kb) y pCM2 (70.0 kb), que codifican para la producción de polisacáridos (EPS) y enzimas extracelulares (Dreier *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008); que confieren patogenicidad, diferente grado de virulencia y agresividad entre cepas aisladas de distintas regiones en el mundo (Wasserman *et al.*, 2020; Yuqing *et al.*, 2018), así como la habilidad para adaptarse a nuevos hábitats (Nandi *et al.*, 2018).

Hasta la fecha no se han desarrollado variedades comerciales con resistencia completa a Cmm, ni otra medida de control efectiva lo cual ocasiona severas epidemias (Nandi *et al.*, 2018). En otros países, se han identificado variedades de jitomate con mayor tolerancia a la enfermedad (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Formas silvestres de jitomate albergan genes de resistencia contra Cmm; sin embargo, la herencia de estos genes es compleja y expresan caracteres indeseables como fruto pequeño y bajo rendimiento durante el mejoramiento genético (Bae *et al.*, 2015; Coaker *et al.*, 2004). Se han estudiado diversas estrategias de control las cuales incluyen el control químico principalmente con antibióticos y compuestos a base cobres (de León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009), biológico (Nandi *et al.*, 2018), uso de extractos de plantas (Muhammad *et al.*, 2020), bacteriocinas (Mirzaee *et al.*, 2021) con limitada eficacia en muchos casos debido a la alta variación en la agresividad y virulencia del patógeno, así como su adaptación a ciertos genotipos y sistemas de producción de jitomate (Croce *et al.*, 2016).

En los últimos cinco años, en la localidad de Chignahuapan, Puebla se identificaron brotes de la enfermedad en jitomate cultivados en invernadero; hasta la fecha, no hay ningún estudio sobre la respuesta a la infección por Cmm en las variedades



efficacy, in many cases due to the high variation in the aggressiveness and virulence of the pathogen, as well as its adaptation to certain genotypes and tomato production systems (Croce *et al.*, 2016).

In the last five years, in Chignahuapan, Puebla, outbreaks of the disease were identified in greenhouse-grown tomato, and to date, there are no studies on the response to the infection by Cmm in the varieties planted in this region. Our hypothesis establishes that there are tomato varieties with a greater tolerance to infections caused by aggressive Cmm strains and that this pathogen is sensitive to commercial bactericides available in the region. The identification of tomato varieties with a greater tolerance to the infection by Cmm and the use of effective bactericides can contribute to a better management and reduce the economic damage caused by this disease. Due to this, the aims of this investigation were: i) to characterize and identify the more aggressive Cmm in Chignahuapan, Puebla, ii) to evaluate the tolerance in two phenological stages of 10 varieties of tomato to infection by the more aggressive Cmm in the greenhouse and the sensitivity *in vitro* of the bacteria to bactericides.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of the pathogen and growth conditions

In 2019, stems and leaves were gathered in greenhouses from tomato plants of the Benedetti (19° 52' 11.2" N 98° 02' 10.7" W), Reserva (19° 52' 12.9" N 98° 02' 12.8" W) and Pai Pai (19° 52' 17.4" N 98° 02' 15.3" W) varieties with symptoms of wilt in the location of Chignahuapan, Puebla. The tissue samples (0.5 cm) were disinfested with sodium hypochlorite at 1% and washed three times with sterile distilled water. They were then placed in tubes with 3 mL of a sterile salt solution (0.85%) for 1 h. Out of this suspension, 20 µL were plated

cultivadas en esta región. Nuestra hipótesis establece que hay variedades de jitomate con mayor tolerancia a la infección por cepas agresivas de Cmm y que este patógeno es sensible a bactericidas comerciales disponibles en esta región. La identificación de variedades de jitomate con mayor tolerancia a la infección por Cmm y el uso de bactericidas efectivos puede contribuir a un mejor manejo y reducir el daño económico causado por esta enfermedad. Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: i) caracterizar e identificar a Cmm más agresivo en Chignahuapan, Puebla, ii) evaluar la tolerancia en dos etapas fenológicas de 10 variedades de jitomate a la infección por Cmm más agresivo en invernadero y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria a bactericidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del patógeno y condiciones de crecimiento

En 2019, se recolectaron tallos y hojas de plantas de jitomate en invernaderos de las variedades Benedetti (19° 52' 11.2" N 98° 02' 10.7" W), Reserva (19° 52' 12.9" N 98° 02' 12.8" W) y Pai Pai (19° 52' 17.4" N 98° 02' 15.3" W) con síntomas de marchitez en la localidad de Chignahuapan, Puebla. Las muestras de tejido (0.5 cm) se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y se lavaron tres veces con agua destilada estéril; después se colocaron en tubos con 3 mL de solución salina (0.85%) estéril durante 1 h. 20 µL de esta suspensión se sembró en medio de cultivo agar nutritivo (AN) (Sigma-Aldrich) y se incubó a 28 °C por 48 h. Las bacterias purificadas se identificaron morfológicamente de acuerdo a Cmm (EPPO, 2016). Las bacterias se preservaron en cultivo criogénico a -80 °C en medio Luria Bertani (Merck) y 40% de glicerol.

on nutrient agar culture medium (NA) (Sigma-Aldrich) and incubated at 28 °C for 48 h. The purified bacteria were morphologically identified according to Cmm (EPPO, 2016). The bacteria were preserved in a cryogenic culture at -80 °C in a Luria Bertani medium (Merck) and 40% of glycerol.

### **Agressiveness of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

The Cmm isolates (CP\_Cmm-1 to CP\_Cmm-12) were individually inoculated in three var. Reserva tomato seedlings in a greenhouse in a phenological stage of four true leaves. The inoculation was carried out by cutting the apical leaf with scissors soaked (Thyr, 1968) in a cellular suspension with  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> based on the pattern of turbidity of the McFarland standard (McFarland, 1907). The appearance of wilt symptoms in inoculated plants was recorded for 13 days and the most aggressive isolation was selected (the Cp\_Cmm-1 strain in this study) based on the period of incubation (PI), which was considered as the time (days) between inoculation and the appearance of symptoms in the inoculated plants. The control plants were inoculated with sterile distilled water. From the internal tissues of the stem of the plants with symptoms of wilt, bacteria with the same phenotypical characteristics of the inoculated strain were reisolated and identified as Cmm using PCR.

### **Characterization and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Isolation CP\_Cmm-1 was characterized according to the protocols described by Schaad *et al.* (2001). In addition, the API20 E (Biomerieux, Durhan, NC, U.S.A.) systems were used, along with the commercial kit DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

### **Agresividad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Los aislamientos de Cmm (CP\_Cmm-1 a CP\_Cmm-12) se inocularon individualmente en tres plántulas de jitomate var. Reserva en invernadero en estado fenológico de cuatro hojas verdaderas; la inoculación se realizó mediante el corte de la hoja apical con tijeras embebidas (Thyr, 1968) en una suspensión celular con  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> basado en el patrón de turbidez de la escala de McFarland (McFarland, 1907). La aparición de síntomas de marchitez en las plantas inoculadas se registró durante 13 días y se seleccionó el aislamiento más agresivo (cepa CP\_Cmm-1 en este estudio) basado en el periodo de incubación (PI) el cual se consideró como el tiempo (días) transcurrido entre la inoculación y la aparición de síntomas de marchitez en las plantas inoculadas. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril. Del tejido interno del tallo de las plantas con síntomas de marchitez se reaislaron bacterias con las mismas características fenotípicas de la cepa inoculada y se identificó como Cmm por PCR.

### **Caracterización e identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

El aislamiento CP\_Cmm-1 se caracterizó de acuerdo a los protocolos descritos por Schaad *et al.* (2001). Además, se utilizaron los sistemas API20 E (Biomerieux, Durhan, NC, U.S.A.) y el kit comercial DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Agdia® Inc, SRA 44000/0096) con anticuerpos específicos para Cmm. Así mismo, se infiltró una suspensión con  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de la cepa CP\_Cmm-1 en el envés de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y maravilla (*Mirabilis jalapa*).

Para la identificación por PCR, el ADN de la cepa CP\_Cmm-1 se obtuvo de colonias individuales

(Agdia® Inc, SRA 44000/0096) with specific antibodies for Cmm. Likewise, a suspension was infiltrated, with  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> of the CP\_Cmm-1 strain on the abaxial surface of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and four o'clock plants (*Mirabilis jalapa*) leaves.

For identification by PCR, the DNA of the CP\_Cmm-1 strain was taken from individual colonies with a 72 h growth at 28 °C in NA medium with a PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), following the protocol by the manufacturer. Using PCR, plasmid pCM2 was amplified, which harbors the specific fragment of the gene *pat-1* (serine protease) of 614 pb of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with the primers CMM5F-5'GCGAATAAGCCCATATCAA 3' and CMM6R-5' CGTCAGGAGGTCGCTAATA 3' and the PCR conditions described by Dreier *et al.* (1997). The PCR was carried out in a thermal cycler (C1000 Touch TM Thermal Cycler) and the amplified fragments were sequenced in the Institute of Biotechnology of the UNAM (IBT). The sequences were compared in the GenBank of the National Center of Biotechnology Information (NCBI), using the algorithm Blastx (Altschul *et al.*, 1990) of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

#### **Inoculation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato varieties**

This study was carried out as a factorial in a randomized complete block design with four repetitions; the first factor used 10 tomato varieties: 1) Benedetti, 2) Reserva, 3) Malvia, 4) USATX12227, 5) Sahel, 6) Pai-Pai, 7) Súper óptimo, 8) Nápoles 9) Sv4401, and 10) Tobalá. After the germination of the seed, the seedlings

con 72 h de crecimiento a 28 °C en medio AN con el kit PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) siguiendo el protocolo del fabricante. Por PCR se amplificó el plásmido pCM2 que alberga el fragmento específico del gen *pat-1* (serina proteasa) de 614 pb de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los iniciadores CMM5F-5'GCGAATAAGCCCATATCAA 3' y CMM6R-5' CGTCAGGAGGTCGCTAATA 3' y condiciones de PCR descritos por Dreier *et al.* (1997). La PCR se realizó en un termociclador (C1000 Touch TM Thermal Cycler) y los fragmentos amplificados se secuenciaron en el Instituto de Biología de la UNAM (IBT). Las secuencias se compararon en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Internacional para la Información en Biología (NCBI-National Center of Biotechnology Information), empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

#### **Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en variedades de jitomate**

Este estudio se realizó como un factorial en un diseño bloques completos al azar con cuatro repeticiones; el primer factor utilizó 10 variedades de jitomate: 1) Benedetti, 2) Reserva, 3) Malvia, 4) USATX12227, 5) Sahel, 6) Pai-Pai, 7) Súper óptimo, 8) Nápoles 9) Sv4401 y 10) Tobalá. Después de la germinación de la semilla; las plántulas se trasplantaron en bolsas de plástico negro (2 kg), con una mezcla de peat moss, tierra vega y tepezil (2:1:1) y se mantuvieron en invernadero con una humedad relativa >70 y temperatura entre 30 y 33 °C. Las plantas se regaron diariamente y se fertilizaron dos veces por semana con la formulación nutritiva Steiner (Steiner, 1984).

were transplanted in black plastic bags (2 kg), with a mixture of peat moss, tierra vega and tepezil (2:1:1) and were kept in the greenhouse with a relative humidity of >70 and temperatures between 30 and 33 °C. The plants were irrigated on a daily basis and fertilized twice a week with the Steiner nutrient formulation (Steiner, 1984).

The CP\_Cmm-1 strain was inoculated in the apical leaf of each tomato variety (n=10) by cutting with scissors soaked in a cellular suspension (Thyr, 1968) adjusted with  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> using the McFarland standard and confirmed by counting in a plate in an NA medium after 72 h at 28 °C (Klement *et al.*, 1990). The second factor contemplated two phenological stages in independent treatments for the development of 1) five true leaves, 2) 10 true leaves. Each variety was inoculated in 10 plants (repetitions). The inoculation of all varieties was simultaneous and was carried out in a timeframe of 60 min. The control plants were inoculated with sterile distilled water. The appearance of symptoms was registered every day for 30 days after inoculation (dai). In order to evaluate the severity, an arbitrary visual scale was designed, which went from 0 to 4, where 0= healthy plant, 1= leaf wilt, 2= epinasty, leaf chlorosis, 3= stem vessel colonization and 4=canker in stem and internal colonization of the fruit. The variable analyzed was time (number of days to severity degree 4) with the interaction tomato variety-phenological stage-development of symptoms. The data were analyzed using the statistical program R version 4.0.5 (Avello and Seisdedo, 2017). From the internal tissue of the stem of each variety, the inoculated bacteria was reisolated and identified using PCR.

### Sensitivity *in vitro* to bactericides

Eight commercial bactericides were evaluated in the concentration recommended on the label,

La cepa CP\_Cmm-1 se inoculó en la hoja apical de cada variedad de jitomate (n=10) mediante el corte con tijeras embebidas en una suspensión celular (Thyr, 1968) ajustada con  $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> utilizando la escala de McFarland y confirmado por recuento en placa en medio AN después de 72 h a 28 °C (Klement *et al.*, 1990). El segundo factor contempló dos etapas de desarrollo fenológico en tratamientos independientes, al desarrollo de 1) cinco hojas verdaderas, 2) 10 hojas verdaderas. Cada variedad se inoculó en 10 plantas (repeticiones). La inoculación de todas las variedades fue simultánea y se realizó en un periodo de 60 min. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril. La aparición de síntomas se registró diariamente durante 30 días después de la inoculación (ddi); para evaluar la severidad, se diseñó una escala visual arbitraria de 0 a 4 donde 0= planta sana, 1= marchitez de hojas, 2= epinastia, clorosis de hojas, 3= colonización vascular de tallo y 4=cancro en tallo y colonización interna del fruto. La variable analizada fue el tiempo (número de días en llegar al grado 4 de severidad) con la interacción de los factores: variedad de jitomate-etapa fenológica- desarrollo de síntomas. Los datos se analizaron con el programa estadístico R versión 4.0.5 (Avello y Seisdedo, 2017). Del tejido interno del tallo de cada variedad se reaisló la bacteria inoculada y se identificó por PCR.

### Sensibilidad *in vitro* a bactericidas

Se evaluaron ocho bactericidas comerciales a la concentración recomendada en etiqueta, en stock de 25 mL de agua: 1) Sulfato de estreptomycin + Oxitetraciclina + Sulfato tribásico de cobre monohidratado, 1.5 g (Cuprimicin 500) (Ingeniería Industrial); 2) Estreptomycin + Oxitetraciclina, 0.2 g (Bactrol 2x) (Ingeniería industrial); 3) Clorhidrato de oxitetraciclina, 0.5 g (Cuprimicin Agrícola 5%)

in a stock with 25 mL of water: 1) Streptomycin sulfate + Oxytetracycline + Tribasic copper sulfate monohydrate, 1.5 g (Cuprimycin 500) (Industrial Engineering); 2) Streptomycin + Oxytetracycline, 0.2 g (Bactrol 2x) (Industrial Engineering); 3) Oxytetracycline Hydrochloride, 0.5 g (Agricultural Cuprimycin 5%) (Industrial Engineering); 4) Streptomycin + Oxytetracycline, 1 g (Agricultural Bactiomycin) (AgriBest); 5) Ammonium Quaternary, 3.5 mL (Quatz IV) (Alterna Agro); 6) Kasugamycin, 0.17 mL (Kasumin) (Gowan Mexicana); 7) Streptomycin sulfate, 0.2 g (Cuprimycin 17) (Industrial Engineering); 8) Gentamicin sulfate + Oxytetracycline Hydrochloride, 1.5 g (Final Bacter) (FormulAbagro of Mexico).

The test for *in vitro* sensitivity against the CP\_Cmm-1 strain was carried out using the method described by Jung *et al.* (2014), modified: The *Clavibacter* inoculant was obtained from a pure 48 h culture at 28 °C in nutrient agar medium, and afterwards, followed by the preparation of an aqueous solution with  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Sensitivity was evaluated on 96-well polystyrene microplates (Thermo Scientific™); each 80 µL well with a nutrient broth medium was added 10 µL of *Clavibacter* inoculant and 10 µL of the bactericidal solution; the control consisted of the inoculation of *Clavibacter* in a nutrient broth without bactericide. The microplates were incubated at 28 °C and the absorbance was registered at an optic density (DO) of 600 nm after 0, 12, 24, 48, 60, 72 and 84 h of growth in a Multiskan Ascent V1.24 354-01843 Version-1.9.1 reader. The sensitivity to the bactericides by Cmm was determined by the lowest value of DO in the co-cultivation of the pathogen with the bactericide in regard to the control. A factorial design was carried out with

(Ingeniería Industrial); 4) Estreptomina + Oxite-traciclina, 1 g (Bactiomycin Agrícola) (AgriBest); 5) Cuaternario de Amonio, 3.5 mL (Quatz IV) (Alterna Agro); 6) Kasugamicina, 0.17 mL (Kasumin) (Gowan Mexicana); 7) Sulfato de estreptomina, 0.2 g (Cuprimicin 17) (Ingeniería Industrial); 8) Sulfato de Gentamicina + Clorhidrato de Oxite-traciclina, 1.5 g (Final Bacter) (FormulAbagro de México).

La sensibilidad *in vitro* contra la cepa CP\_Cmm-1 se realizó por el método descrito por Jung *et al.* (2014) modificado: El inóculo de *Clavibacter* se obtuvo de un cultivo puro de 48 h a 28 °C en medio agar nutritivo; de aquí, se preparó una suspensión acuosa con  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. La sensibilidad se evaluó en microplacas de poliestireno (Thermo Scientific™) con 96 pocillos; a cada pocillo con 80 µL de medio caldo nutritivo se le agregó 10 µL de inóculo de *Clavibacter* y 10 µL de la solución bactericida; el testigo consistió de la inoculación de *Clavibacter* en caldo nutritivo sin bactericida. Las microplacas se incubaron a 28 °C y se registró la absorbancia a una densidad óptica (DO) de 600 nm a las 0, 12, 24, 48, 60, 72 y 84 h de crecimiento en un lector Multiskan Ascent V1.24 354-01843 Version-1.9.1. La sensibilidad a los bactericidas por Cmm se determinó por el menor valor de DO en el co-cultivo del patógeno con el bactericida con respecto al testigo. Se realizó un diseño factorial con medidas repetidas utilizando un modelo mixto donde los bloques y unidades experimentales son aleatorios, el modelo se ajustó con una función de correlación sin estructura entre tiempos, se contempló la heterogeneidad de varianza entre tratamientos en el modelo; todos los tratamientos se evaluaron por triplicado. Los datos de la interacción de Cmm con el bactericida se analizaron con el programa estadístico InfoStat versión 1.5 (Grupo Infostat 2003).

repeated measurements using a mixed model in which experimental blocks and units were random; the model was adjusted with a correlation function without structure between times, the variance heterogeneity between treatments in the model was contemplated, and all treatments were evaluated in triplicate. The data of the interaction of Cmm with the bactericide were analyzed with the InfoStat statistical program, version 1.5 (Infostat Group 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

The 12 Cmm isolations incubated in tomato var. Reserva caused wilt, although the period of incubation (PI) was different between the isolations. The symptoms of wilt in the inoculated seedlings were observed in a range of 5 to 12 dai. The CP\_Cmm-1 isolation from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (isolated from the var. Reserva) displayed greater aggressiveness, causing wilt 5 dai (PI), hence its selection for this study. In control plants, no symptoms were observed to develop. These results coincide with reports by Tancos *et al.* (2013), who displayed differences in virulence between strains of Cmm. Other studies identified haplotypes of Cmm with greater virulence and aggressiveness in some tomato-producing areas than in others and they suggest the existence of types of sequences that adapt to certain regions, tomato genotypes, weather conditions and production systems (Croce *et al.*, 2016; Martínez-Castro *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017). This diversity may be caused by the introduction of new strains of Cmm of a different origin, mainly due to seed imports (Yuqing *et al.*,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización e identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los 12 aislamientos de Cmm inoculados en jitomate var. Reserva causaron marchitez; sin embargo, el periodo de incubación (PI) fue diferente entre los aislamientos. Los síntomas de marchitez en las plántulas inoculadas se observaron en un rango entre 5 y 12 ddi. El aislamiento CP\_Cmm-1 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (aislado de la var. Reserva) mostró mayor agresividad causando marchitez a los 5 ddi (PI) por lo que se seleccionó para este estudio. En las plantas testigo no se observó el desarrollo de ningún síntoma. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tancos *et al.* (2013) quienes demostraron diferencias en la virulencia entre cepas de Cmm. Otros estudios identificaron haplotipos de Cmm con mayor virulencia y agresividad en algunas zonas productoras de jitomate que en otras y sugieren la existencia de tipos de secuencia que se adaptan a determinada región, genotipo de jitomate, condiciones de clima y sistema de producción (Croce *et al.*, 2016; Martínez-Castro *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017). Esta diversidad puede ser consecuencia de la introducción de nuevas cepas de Cmm de diferente origen principalmente por la importación de semilla (Yuqing *et al.*, 2018). La caracterización fenotípica de la cepa CP\_Cmm-1 mostró el crecimiento de colonias amarillo-naranja en medio YDC, Gram positivas, no móviles, metabolismo oxidativo de glucosa, oxidasa negativa, produjeron ácido a partir de manosa, pero no de manitol, ribosa, sorbitol e inulina, hidroliza esculina pero no caseína, utilizan como fuente de carbono acetato y succinato de sodio; estas características se reportaron previamente para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO, 2016; Schaad *et al.*, 2001).

2018). The phenotypic characterization of the CP\_Cmm-1 strain displayed the growth of yellow-orange colonies in a YDC medium, Gram positive, not motile, glucose oxidative metabolism, negative oxidase, which produced acid from mannose although not from mannitol, ribose, sorbitol and inulin, hydrolyze esculin but not casein, use acetate and sodium succinate as carbon sources; these characteristics were previously reported for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO, 2016; Schaad *et al.*, 2001).

The phenotype of the CP\_Cmm-1 strain coincided by 97% with the API20 E system, and it was positive by serology with the DAS-ELISA system. Using PCR, the fragment of gene *pat-1* (serine protease) of 614 pb of plasmid pCM2 of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was amplified with primers CMM5F and CMM6R. The gene *pat-1* (serine protease) confers pathogenicity into Cmm and is an important virulence determinant for the production of extracellular polysaccharides, cellulases, glucanases and other enzymes, which induce diseases in tomato via the degradation of the cell wall in the xylem vessels, causing the symptom of wilt (Eichenlaub and Gatermann, 2011; Wassermann *et al.*, 2020). The comparison of the sequence in the GenBank of the amplified PCR product of the Cp\_Cmm-1 strain displayed a 96.6% identity with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 plasmid pCM2 (accession AM711866.1). The infiltration of the Cp\_Cmm-1 strain in the abaxial surface of tobacco and four o'clock leaves induced a hypersensitivity reaction, which coincides with reports by Alarcón *et al.* (1998) and Lu *et al.* (2015), who proved the induction of hypersensitivity in these same plant species with the expression of the protein ChpG with virulent Cmm strains. The results of the identification of the Cp\_Cmm-1 strain comply with the official protocol for the

El fenotipo de la cepa CP\_Cmm-1 coincidió 97% con el sistema API20 E, y fue positivo por serología con el sistema DAS-ELISA. Por PCR se amplificó el fragmento del gen *pat-1* (serina proteasa) de 614 pb del plásmido pCM2 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los iniciadores CMM5F y CMM6R. El gen *pat-1* (serina proteasa) confiere patogenicidad en Cmm y es un importante determinante de virulencia para la producción de polisacáridos extracelulares, celulasas, glucanastas y otras enzimas, que inducen enfermedad en jitomate por la degradación de la pared celular en los vasos del xilema, causando el síntoma de marchitez (Eichenlaub y Gatermann, 2011; Wassermann *et al.*, 2020). La comparación de la secuencia en el GenBank del producto amplificado de PCR de la cepa Cp\_Cmm-1, mostró 96.6% de identidad con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 plásmido pCM2 (accesión AM711866.1). La infiltración de la cepa CP\_Cmm-1 en el envés de hojas de tabaco y maravilla indujo una reacción de hipersensibilidad lo cual coincide con lo reportado por Alarcón *et al.* (1998) y Lu *et al.* (2015), quienes demostraron la inducción de hipersensibilidad en estas mismas especies de plantas por la expresión de la proteína ChpG con cepas de Cmm virulento. Los resultados de la identificación de la cepa CP\_Cmm-1 cumplen con el protocolo oficial para la caracterización e identificación de Cmm en muestras sintomáticas de jitomate, el cual sugiere la combinación de pruebas bioquímicas, serológicas, moleculares y patogenicidad de acuerdo con EPPO (2016).

### **Respuesta de jitomate a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

La respuesta de las 10 variedades de jitomate inoculadas con la cepa Cp\_Cmm-1 fue diferente. La técnica de inoculación mediante el corte

characterization and identification of Cmm in symptomatic tomato samples, which suggests the combination of biochemical, serological, molecular and pathogenicity tests, according to EPPO (2016).

### **Response of tomato to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

The response of the 10 tomato varieties inoculated with the Cp\_Cmm-1 strain was different. The inoculation technique of cutting the petiole with scissors soaked in the inoculant is considered quick and adequate for the evaluation of tolerance to the systemic infection by Cmm (van Steekelenburg, 1985). The symptoms and severity of the disease were different throughout time and dependent on the phenological stage (age of the plant and number of leaves). In all varieties but one, the appearance of symptoms was quicker and more severe in the inoculated plants with five than with 10 true leaves. This suggests that the genetic characteristics and the phenological stage of each variety are important factors for the expression of virulence by Cmm. These results suggest that the lower the plant development, the higher the susceptibility and severity of the infection caused by this pathogen will be.

The symptoms in both phenological stages (five and 10 leaves) during and at the end of the evaluation (30 dai) included all the degrees of severity (leaf wilt, chlorosis, vascular infection, canker in the stem and colonization of the fruit) in all varieties. However, the results of the statistical analysis with the interaction of the factors variety of tomato-phenological stage -development of symptoms indicated that the Sahel variety was significantly different to the rest ( $*= p \leq 0.05$ ) with the higher average of days (13.7 and 14.5) for the appearance and development of all the symptoms, both in the five leaf and the 10 true leaf stages,

del peciolo con tijeras embebidas en el inóculo se considera rápida y adecuada para la evaluación de tolerancia a la infección sistémica por Cmm (van Steekelenburg, 1985). Los síntomas y la severidad de la enfermedad fueron diferente a través del tiempo y dependiente de la etapa fenológica (edad de la planta y número de hojas). En todas las variedades, excepto una, la aparición de síntomas fue con mayor rapidez y severidad en las plantas inoculadas con cinco que con 10 hojas verdaderas. Lo anterior sugiere que las características genéticas y la etapa fenológica de cada variedad son factores importantes para la expresión de virulencia por Cmm; estos resultados sugieren que a menor desarrollo de la planta la susceptibilidad y severidad por la infección de este patógeno es mayor.

Los síntomas en ambas etapas fenológicas (cinco y 10 hojas) durante y al final de la evaluación (30 ddi) incluyeron todos los grados de severidad (marchitez de hojas, clorosis, infección vascular, cancro en tallo y colonización del fruto) en todas las variedades. Sin embargo, los resultados del análisis estadístico con la interacción de los factores: variedad de jitomate-etapa fenológica- desarrollo de síntomas, indicaron que la variedad Sahel fue diferente significativamente del resto ( $*= p \leq 0.05$ ) con el mayor promedio de días (13.7 y 14.5) para la aparición y desarrollo de todos los síntomas tanto en la etapa de cinco como 10 hojas verdaderas respectivamente. Así mismo, esta variedad mostró la menor severidad de síntomas, lo que sugiere mayor tolerancia a la infección por Cmm en ambas etapas fenológicas que el resto de las variedades. En contraste, las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo fueron altamente susceptibles en la etapa de cinco hojas. Entre estas, la variedad Sv4401 mostró la mayor susceptibilidad y severidad entre todas las variedades en las dos etapas fenológicas (cinco y 10 hojas), con el menor promedio (5.5 y 9 días) respectivamente para la aparición y desarrollo



respectively. Likewise, this variety displayed the lowest severity of symptoms, suggesting a higher tolerance to the infection by Cmm in both phenological stages than the rest of the varieties. By contrast, varieties Sv4401, Nápoles and Súper óptimo were highly susceptible in the five-leaf stage. Among these, variety Sv4401 displayed the highest susceptibility and severity out of all varieties in the two phenological stages (five and 10 leaves), with the lowest average (5.5 and 9 days, respectively) for the appearance and development of the symptoms (Table 1). In addition, the plants of this variety displayed lower heights, abundant bacterial exudate in petioles, stems with severe canker, and an extensive internal colonization of the fruit.

These results are similar to those obtained in other investigations. In greenhouse trials, Stüwe and Tiederman *et al.* (2013) identified tomato genotypes that display a higher severity of symptoms caused

de los síntomas (Cuadro 1); además, las plantas de esta variedad mostraron un porte de menor altura, abundante exudado bacteriano en peciolos, tallos con cancro severo, y extensiva colonización interna del fruto.

Estos resultados son similares a otras investigaciones; Stüwe y Tiederman *et al.* (2013), en ensayos de invernadero identificó genotipos de jitomate que mostraron mayor severidad de síntomas causados por Cmm en contraste con otros bajo las mismas condiciones experimentales de inoculación. Así mismo, los resultados de nuestro estudio evidencian la dificultad de encontrar variedades de jitomate tolerantes a la infección causado por Cmm; en un estudio en China, cinco de 25 genotipos de jitomate se catalogaron como moderadamente resistentes y ninguno con alta resistencia o resistencia completa a la infección por Cmm (Yuqing *et al.*, 2018); en tanto Kabas *et al.* (2018) de 78 genotipos clasificó 55% como muy susceptibles, 39% susceptibles,

**Table 1. Interaction of variety, phenological stage, days of appearance of symptoms and severity in 10 tomato varieties inoculated with the CP\_Cmm-1 strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.**

**Cuadro 1. Interacción de variedad, etapa fenológica, días de aparición de síntomas y severidad en 10 variedades de jitomate inoculados con la cepa CP\_Cmm-1 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.**

| Inoculación etapa fenológica<br>cinco hojas verdaderas |                                      | Inoculación etapa fenológica<br>10 hojas verdaderas |                                      |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Variedad Jitomate                                      | Media días<br>desarrollo de síntomas | Variedad Jitomate                                   | Media días<br>desarrollo de síntomas |
| Sahel                                                  | 13.75 a <sup>z</sup>                 | Sahel                                               | 14.50 a <sup>z</sup>                 |
| Tobalá                                                 | 10.50 b                              | Malvia                                              | 14.00 b                              |
| Benedetti                                              | 10.50 b                              | USA12227                                            | 12.75 c                              |
| Reserva                                                | 10.25 bc                             | Benedetti                                           | 12.75 c                              |
| Malvia                                                 | 10.00 c                              | Reserva                                             | 12.50 c                              |
| Pai-Pai                                                | 9.75 h                               | Tobalá                                              | 12.50 c                              |
| USA12227                                               | 9.75 h                               | Súper óptimo                                        | 11.75 d                              |
| Súper óptimo                                           | 8.75 i                               | Pai-Pai                                             | 11.50 de                             |
| Nápoles                                                | 7.50 j                               | Nápoles                                             | 11.25 e                              |
| Sv4401                                                 | 5.50k                                | Sv4401                                              | 9.00 f                               |

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS= 0. 44431. Error: 0.0985 gl: 57. / Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS= 0. 44431. Error: 0.0985 gl: 57.

<sup>z</sup>Means with a common letter are not significantly different (\*= p≤0.05). / <sup>z</sup>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (\*= p≤0.05).

by Cmm in contrast to others under the same experimental inoculation conditions. Likewise, the results of our study display the difficulty of finding tomato varieties which are tolerant to the infection caused by Cmm. In a study in China, five out of 25 tomato genotypes were catalogued as moderately resistant and none had a high or complete resistance to infection by Cmm (Yuqing *et al.*, 2018). Meanwhile, Kabas *et al.* (2018), out of 78 genotypes, classified 55% as very susceptible, 39% as susceptible, 4% as moderately resistant and only 2% as tolerant to infection by Cmm.

Diverse factors explain the severity of the symptoms caused by the Cmm infection among different tomato genotypes, one of which is the age of the plant. Nandi *et al.* (2018) and Sharabani *et al.* (2013b) showed that some tomato varieties that become infected in late development stages can be asymptomatic or develop slow wilt. However, in early infections, the bacteria multiply in the xylem vessels and forms biofilms (Lelis *et al.*, 2014), which help it colonize with high densities and cause a systemic infection that originates severe wilt symptoms, stem canker, vascular discoloring and infection of the fruit (Bae *et al.*, 2015; Chalupowicz *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2013). In this study, these same symptoms were observed in the most susceptible varieties with the inoculation of the Cp\_Cmm-1 strain (Figure 1).

### Systemic infection in tomato varieties

The systemic infection by Cmm produces the symptoms of leaf wilting and chlorosis, damage in the xylem and infection of the fruit. In this investigation, the 10 varieties inoculated with the Cp\_Cmm-1 strain developed all these symptoms, except the Sahel variety. The difference in the severity of the symptoms was evident between the variety with the highest tolerance and the most

4% moderadamente resistentes y únicamente 2% como tolerantes a la infección por Cmm.

Diversos factores explican la severidad de los síntomas causados por la infección de Cmm entre diferentes genotipos de jitomate; uno de ellos es la edad de la planta; Nandi *et al.* (2018) y Sharabani *et al.* (2013b) mostraron que algunas variedades de jitomate que se infectan en etapas de desarrollo tardías, pueden ser asintomáticas o desarrollar marchitez lenta; sin embargo, en infecciones tempranas, la bacteria se multiplica en los vasos del xilema y forma biopelículas (Lelis *et al.*, 2014) que le permite colonizar con altas densidades y causar una infección sistémica que origina síntomas severos de marchitez, cancro en tallo, discoloración vascular e infección del fruto (Bae *et al.*, 2015; Chalupowicz *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2013); en este estudio, estos mismos síntomas se observaron en las variedades más susceptibles con la inoculación de la cepa CP\_Cmm-1 (Figura 1).

### Infección sistémica en variedades de jitomate

La infección sistémica por Cmm produce los síntomas de marchitez y clorosis de hojas, daño en el xilema, cancro en tallo e infección del fruto. En esta investigación, las 10 variedades inoculadas con la cepa Cp\_Cmm-1 desarrollaron todos estos síntomas excepto la variedad Sahel. La diferencia en la severidad de los síntomas fue evidente entre la variedad con mayor tolerancia y las de mayor susceptibilidad (Figura 1). El desarrollo del síndrome está relacionado con la infección de cepas altamente virulentas de Cmm (Chalupowicz *et al.*, 2017), lo que sugiere que la cepa Cp\_Cmm-1, utilizada en este estudio, podría encontrarse en este grupo.

La infección sistémica, marchitez y clorosis de hojas, cancro en tallo e infección del fruto fue más severa en las variedades susceptibles Súper óptimo, USATX12227 y Sv4401; en contraste con la variedad

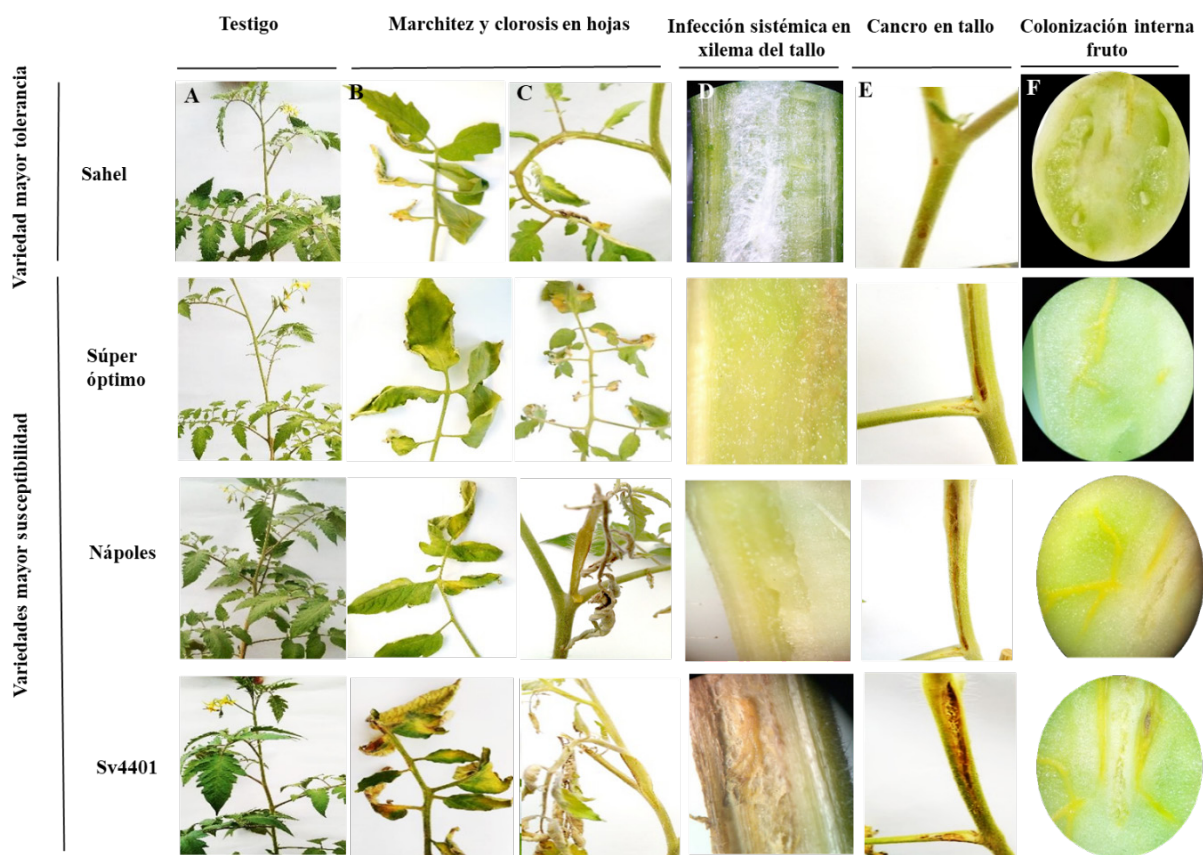


Figure 1. Severity of symptoms developed 30 dai with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (strain CP\_Cmm-1) in tomato varieties with greater tolerance and susceptibility: A) control, B and C) chlorosis and wilting in leaves, D) systemic infection in the stem xylem, E) canker on the stem, and F) internal fruit colonization.

Figura 1. Severidad de síntomas desarrollados a los 30 ddi con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cepa CP\_Cmm-1) en variedades de jitomate con mayor tolerancia y susceptibilidad: A) testigo, B y C) clorosis y marchitez en hojas, D) infección sistémica en el xilema del tallo, E) cancro en tallo y F) colonización interna de fruto.

susceptible ones (Figure 1). The development of the syndrome is related to the infection of highly virulent Cmm strains (Chalupowicz *et al.*, 2017), suggesting that the Cp\_Cmm-1 strain, used in this study, could be found in this group.

The systemic infection, leaf wilt and chlorosis, stem canker and fruit infection were more severe in the susceptible varieties of Súper óptimo, USATX12227 and Sv4401, as opposed to the variety with the highest tolerance (Sahel), in which all symptoms were notoriously less severe and there was no fruit infection in both phenological

con mayor tolerancia (Sahel) en la cual todos los síntomas fueron notoriamente menos severos y no hubo infección de frutos en ambas etapas fenológicas. En las variedades susceptibles, el xilema del tallo mostró síntomas desde decoloración de tejidos vasculares entre amarillo, café claro y café oscuro hasta la degradación de la médula del tallo (Figura 1).

Los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta de la planta de jitomate a la infección por Cmm son complejos y muchos aspectos actualmente no están completamente dilucidados.

stages. In the susceptible varieties, the stem xylem displayed symptoms ranging from the discoloration of vascular tissues between yellow, light brown and dark brown to the degradation of the stem pith (Figure 1).

The molecular mechanisms related to the response of the tomato plant to the infection by Cmm are complex and many aspects are not completely elucidated. Stüwe and Tiedemann *et al.* (2013) observed a greater occlusion of the xylem vessels and less tyloses in tomato varieties susceptible to Cmm. Likewise, Eichenlaub and Gatermann (2011) showed that the temperature, variety, plant age and concentration of the inoculant had an influence on the period of incubation and the severity of the disease. The systemic infection by Cmm was related to a high population density ( $>10^8$  UFC  $g^{-1}$  tissue) on the infected plant (Gartemann *et al.*, 2003), the production of pectate lyase, cellulases and xylanase enzymes that degrade the xylem vessels and cause canker in the stem (Chalupowicz *et al.*, 2012; Gartemann *et al.*, 2008), the induction of proteins related to pathogenesis (PR) by the plant (Savidor *et al.*, 2012), as well as the concentration of ammonium and carboxylic acids in the fluid of the xylem in certain tomato varieties (Bialczyk *et al.*, 2004; Yadeta *et al.*, 2013), response of the plant to concentrations of ethylene induced by the infection of Cmm (Balaji *et al.*, 2008) and antimicrobial compound  $\alpha$ -tomatine produced by the plant, which affects the growth of Cmm (Eichenlaub and Gatermann, 2011).

Previous studies with wild tomato suggest that vascular morphology is an important factor in tolerance to Cmm (Coaker *et al.*, 2004). Many of the above factors could explain the higher tolerance of the Sahel variety identified in this investigation, which stood out for the lower severity of vascular infection, stem canker and having no apparent fruit infection. Due to this, future investigations may delve further in the interaction of this variety

Stüwe y Tiedemann *et al.* (2013) observaron mayor oclusión de los vasos del xilema y menos tílides en variedades de jitomate susceptibles a Cmm. Así mismo, Eichenlaub y Gatermann (2011) demostraron que en el periodo de incubación y severidad de la enfermedad influyó la temperatura, variedad, edad de la planta y concentración del inóculo. La infección sistémica por Cmm se relacionó con alta densidad de población ( $>10^8$  UFC  $g^{-1}$  tejido) en la planta infectada (Gartemann *et al.*, 2003), producción de las enzimas pectato liasa, celulasas y xilanas que degradan las células del xilema y originan el cancro en tallo (Chalupowicz *et al.*, 2012; Gartemann *et al.*, 2008); inducción por la planta de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (Savidor *et al.*, 2012), así como la concentración de amonio y ácidos carboxílicos en el fluido del xilema en ciertas variedades de jitomate (Bialczyk *et al.*, 2004; Yadeta *et al.*, 2013), respuesta de la planta a concentraciones de etileno inducido por la infección de Cmm (Balaji *et al.*, 2008) y a las concentraciones del compuesto antimicrobiano  $\alpha$ -toamtina producido por la planta que afecta el crecimiento de Cmm (Eichenlaub y Gatermann, 2011).

Estudios previos con jitomate silvestre sugirieron que la morfología vascular es un factor importante en la tolerancia a Cmm (Coaker *et al.*, 2004). Muchos de los factores anteriores podrían explicar la mayor tolerancia de la variedad Sahel identificada en esta investigación, la cual destacó por la menor severidad de infección vascular, cancro en tallo y sin infección aparente en fruto. Por lo anterior, investigaciones futuras podrían profundizar en la interacción de esta variedad con Cmm y las bases genéticas de la tolerancia observada en este estudio.

### **Infección en fruto en variedades de jitomate**

Al realizar un corte transversal del fruto, se observaron diferencias en la agresividad y severidad

with Cmm and the genetic bases of the tolerance observed in this study.

### Infection in tomato variety fruits

When cutting the fruit transversally, differences were observed in the aggressiveness and severity of the internal colonization and infection of the fruit with more tolerance (Sahel) where the symptoms of wilt and canker were less severe and without any internal colonization of the fruit. On the other hand, the susceptible varieties (Súper óptimo, Nápoles and Sv4401) displayed a greater severity in the symptoms of wilting, damage to the xylem, canker in the stem and an extensive internal colonization of the pathogen in the fruit. The internal tissue in these fruits displayed a discoloration of vascular tissue and degradation of the pith (Figure 1).

These same colonization patterns in fruits are similar to those observed in other investigations (Tancos *et al.*, 2013). The infection of fruits is a result of the extensive colonization of Cmm in the xylem of the plant, where it is dispersed until it penetrates the peduncle and it infects fruits and seeds (de León *et al.*, 2011; Eichenlaub and Gartemann, 2011). In this investigation, in the fruits with a high internal colonization rate in the most susceptible varieties, no external symptoms were observed, making them apparently adequate for marketing. However, they represent an efficient source of inoculant for later growth seasons (Nandi *et al.*, 2018), mainly via the infected seed (de León *et al.*, 2011).

From the internal tissue of the stem with symptoms of degradation and necrosis of the xylem in each variety, we re-isolated, in pure cultivations, cultures with the same morphological characteristics as Cmm. The identity of the inoculated Cp\_Cmm-1 strain was confirmed by PCR with the amplification of plasmid pCM2 with the protocol previously described (Figure 2).

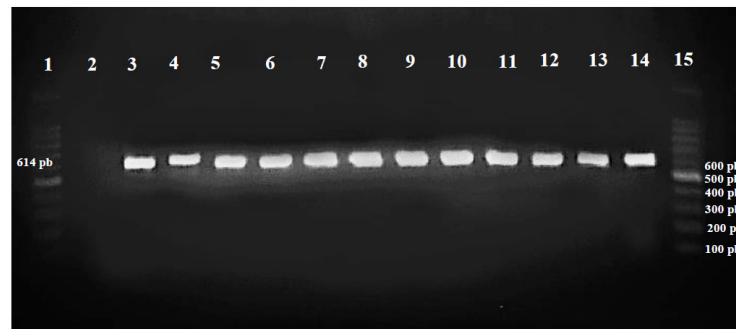
de la colonización e infección interna del fruto entre la variedad con mayor tolerancia (Sahel) en donde los síntomas de marchitez y cancro fueron menos severos y sin colonización interna del fruto; en contraste, en las variedades susceptibles (Súper óptimo, Nápoles y Sv4401) se observó mayor severidad de los síntomas de marchitez, daño en el xilema, cancro en tallo y una extensiva colonización interna del patógeno en el fruto. El tejido interno en estos frutos mostró decoloración de tejido vascular y degradación de la médula (Figura 1).

Estos mismos patrones de colonización en fruto son similares con los observados en otras investigaciones (Tancos *et al.*, 2013). La infección en frutos es resultado de la extensiva colonización de Cmm en el xilema de la planta de donde se dispersa hasta ingresar a través del pedicelo e infectar frutos y semillas (de León *et al.*, 2011; Eichenlaub y Gartemann, 2011). En esta investigación, en los frutos con alta colonización interna en las variedades más susceptibles no se observaron síntomas externos, aparentemente aptos para su comercialización; sin embargo, representan una eficiente fuente de inóculo para sucesivas estaciones de crecimiento (Nandi *et al.*, 2018), principalmente a través de la semilla infectada (de León *et al.*, 2011).

Del tejido interno del tallo con síntomas de degradación y necrosis del xilema de cada variedad, se re-aislaron en cultivo puro colonias con las mismas características morfológicas de Cmm. La identidad de la cepa Cp\_Cmm-1 inoculada se confirmó por PCR con la amplificación del plásmido pCM2 con el protocolo previamente descrito (Figura 2).

### Sensibilidad *in vitro* a bactericidas

Los resultados de la sensibilidad de la cepa CP\_Cmm-1 a los bactericidas evaluados mostraron diferencias significativas (\*=  $p \leq 0.05$ ) con las formulaciones de Sulfato de estreptomycin + Oxite-traciclina + Sulfato tribásico de cobre monohidra-



**Figure 2.** Amplification of the plasmid pCM2 -1 by PCR of the Cp\_Cmm-1 strain inoculated in 10 tomato varieties. Lines: 1: 100pb molecular marker, 2: control (-), 3: control (+) 14: control (+), 4: Benedetti, 5: Reserva, 6: Malvia, 7: USATX12227, 8: Sahel, 9: Pai-Pai, 10: Súper óptimo, 11: Nápoles, 12: Sv4401, 13: Tobalá and 15: 100pb molecular marker.

**Figura 2.** Amplificación del plásmido pCM2 -1 por PCR de la cepa Cp\_Cmm-1 inoculada en 10 variedades de jitomate. Líneas: 1: marcador molecular de 100pb, 2: control (-), 3: control (+) 14: control (+), 4: Benedetti, 5: Reserva, 6: Malvia, 7: USATX12227, 8: Sahel, 9: Pai-Pai, 10: Súper óptimo, 11: Nápoles, 12: Sv4401, 13: Tobalá y 15: marcador molecular de 100pb.

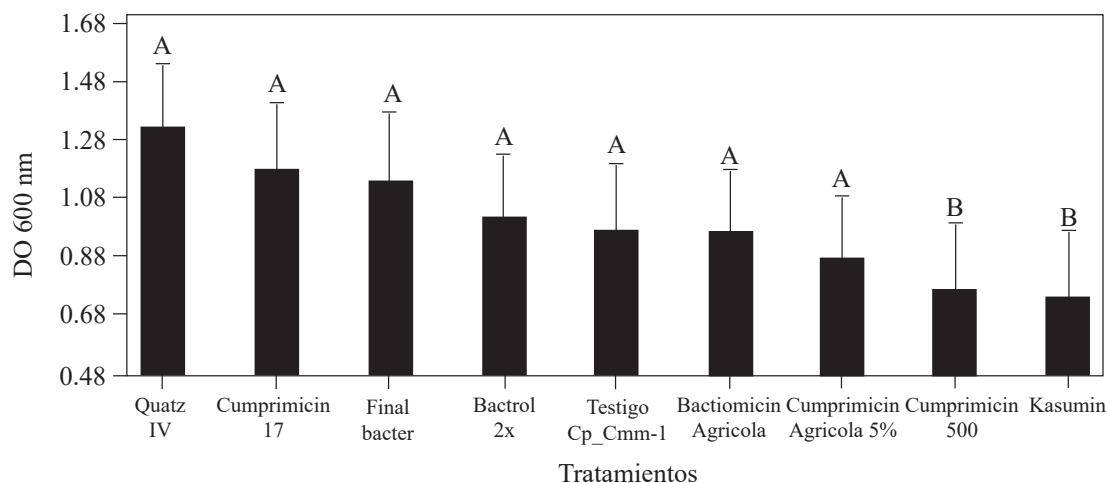
### Sensitivity *in vitro* to bactericides

The results of the sensitivity of the Cp\_Cmm-1 strain to the evaluated bactericides displayed significant differences ( $*= p \leq 0.05$ ) with the Streptomycin sulfate + Oxytetracycline + tribasic copper sulfate monohydrate (Cuprimycin 500) and Kasugamycin (Kasumin) formulations on the reduction of cell growth. The DO values of the co-cultivation of *Clavibacter* with these bactericides were significantly lower than in the control, where normality was verified using the *Shapiro-wilks* test. The percentage of cell growth of Cmm decreased 19 and 18 % with the treatments with streptomycin sulfate + oxytetracycline + tribasic copper sulfate monohydrate (Cuprimycin 500) and kasugamycin (Kasumin) respectively, 84 h after interaction (Figure 3).

The results coincide with those by de León *et al.* (2008); Milijašević *et al.* (2009) and Werner *et al.* (2002), who reported that copper sulphate, oxytetracycline and kasugamycin is effective against Cmm and reduced the severity of foliar symptoms and damage to the fruit (Theodoro

tado (Cuprimycin 500) y Kasugamicina (Kasumin) en la reducción del crecimiento celular. Los valores de la DO del co-cultivo de *Clavibacter* con estos bactericidas fueron significativamente menores que el testigo, donde se verificó la normalidad con la prueba de *Shapiro-wilks*. El porcentaje de crecimiento celular de Cmm decreció 19 y 18 % con los tratamientos: sulfato de estreptomina + oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre monohidratado (Cuprimycin 500) y kasugamicina (Kasumin) respectivamente a las 84 h de interacción (Figura 3).

Los resultados coinciden con de León *et al.* (2008); Milijašević *et al.* (2009) y Werner *et al.* (2002); quienes reportan que el sulfato de cobre, oxitetraciclina y kasugamicina es efectivo contra Cmm y redujo la severidad de los síntomas foliares y daño al fruto (Theodoro y Maringoni, 2000). Actualmente el uso de bactericidas en la agricultura es limitado; las aplicaciones de cobres y antibióticos, principalmente la estreptomina y oxitetraciclina, están autorizados solo para algunos cultivos en muchos países y se ha demostrado la generación de resistencia por Cmm (Lyu *et al.*, 2019; Valenzuela *et al.*, 2019). La kasugamicina solo se usa en la



**Figure 3.** Sensitivity *in vitro* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain CP\_Cmm-1 bactericides. Interaction of the co-cultivation with bactericides after 84 h at 28 °C. Readings of the density of cell growth, absorbance 600 nm (DO). Means with a common letter are not significantly different (\*=  $p \leq 0.05$ ).

**Figura 3.** Sensibilidad *in vitro* a bactericidas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa CP\_Cmm-1. Interacción del co-cultivo con bactericidas a las 84 h a 28 °C. Lecturas de la densidad de crecimiento celular, absorbancia 600 nm (DO). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (\*=  $p \leq 0.05$ ).

and Maringoni, 2000). Nowadays, the use of bactericides in agriculture is limited, the use of coppers and antibiotics, mainly streptomycin and oxytetracycline, are only authorized for some crops in many countries, and the generation of resistance by Cmm has been proven (Lyu *et al.*, 2019; Valenzuela *et al.*, 2019). Kasugamycin is only used in agriculture and its spectre is reduced (Sundin *et al.*, 2016). Likewise, other investigations have displayed that kasugamycin reduces the populations of vascular bacterial pathogens (Dias *et al.*, 2019; McGhee and Sundin, 2011). Streptomycin has been used to control bacterial diseases in Mexico, reducing the secondary dispersion of inoculant (Félix-Gastélum *et al.*, 2012). The best Cmm control strategy in tomato is based mainly on strict preventive measures and cultural practices that include the use of less susceptible varieties, certified seed, healthy seedlings, the disinfection of tools and greenhouses, and the use of bactericides that reduce the secondary inoculant of the pathogen (de

agricultura y su espectro es reducido (Sundin *et al.*, 2016); así mismo, en otras investigaciones se ha evidenciado que la kasugamicina reduce las poblaciones de patógenos bacterianos vasculares (Dias *et al.*, 2019; McGhee y Sundin, 2011). La estreptomycin ha sido usada para el control de enfermedades bacterianas en México disminuyendo la dispersión secundaria de inóculo (Félix-Gastélum *et al.*, 2012). La mejor estrategia de control de Cmm en jitomate se basa principalmente en estrictas medidas preventivas y prácticas culturales que incluyen el uso de variedades menos susceptibles, semilla certificada, plántula sana, desinfección de herramientas e invernaderos y manejo con bactericidas que disminuyan el inóculo secundario del patógeno (de León *et al.*, 2011; EFSA, 2014; Sundin *et al.*, 2016). Los resultados de esta investigación sugieren que la combinación del uso de la variedad Sahel, la kasugamicina, en conjunto con las medidas de manejo anteriores podría ser una estrategia útil para reducir el daño causado por Cmm.

León *et al.*, 2011; EFSA, 2014; Sundin *et al.*, 2016). The results of this investigation suggest that the combined use of the Sahel variety, kasugamycin, along with the above measures could be a useful strategy to reduce the damage caused by Cmm.

## CONCLUSIONS

There is variation in the aggressiveness between the strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Chignahuapan, Puebla. The CP\_Cmm-1 strain is the most aggressive of the strains isolated from the three tomato varieties. This strain was identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using biochemical, serological methods and PCR, and it is sensitive to kasugamycin. No tomato varieties out of the 10 planted in this location are resistant to infection by this pathogen. Most varieties are more susceptible to infection in the initial phenological stages of the plant. Among these, there are varieties with a greater tolerance to susceptibility and infection. The Sahel variety is the most tolerant to infection in different phenological stages of the plant. The Sv4401, Nápoles and Súper óptimo varieties are the most susceptible to infection. Out of these, Sv4401 is highly susceptible in different phenological stages. The use of the Sahel variety and kasugamycin could reduce the damage caused by this pathogen.

## LITERATURE CITED

- Alarcón C, Castro J, Muñoz F, Arce-Johnson P and Delgado J. 1998. Protein(s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology* 88: 306-310. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.4.306>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Avello MR and Seisdedo LA. 2017. El procesamiento estadístico con R en la investigación científica. *MediSur* 15(5): 583-586. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-897X2017000500001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2017000500001&lng=es&tlng=es).

## CONCLUSIONES

Existe variación en la agresividad entre las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en Chignahuapan, Puebla. La cepa CP\_Cmm-1 es más agresiva entre las cepas aisladas de tres variedades de jitomate. Esta cepa se identificó como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por métodos bioquímicos, serológicos y PCR y es sensible a la kasugamicina. Ninguna de las 10 variedades de jitomate cultivadas en esta localidad son resistentes a la infección por este patógeno. La mayoría de las variedades son más susceptibles a la infección en etapas fenológicas iniciales de la planta. Entre estas, hay variedades con mayor tolerancia y susceptibilidad a la infección; la variedad Sahel es más tolerante a la infección en distintas etapas fenológicas de la planta. Las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo son más susceptibles a la infección; entre estas, la variedad Sv4401 es altamente susceptible en diferentes etapas fenológicas. El uso de la variedad Sahel y la kasugamicina podría reducir el daño por este patógeno.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Bae C, Han SW, Song YR, Kim BY, Lee HJ, Lee JM, Yeom I, Heu S and Oh CS. 2015. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical and Applied Genetics* 128(7): 219-229. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2521-1>
- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I and Sessa G. 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology* 146:1797-1809. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115188>
- Bialczyk J, Lechowski Z and Dziga D. 2004. Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with HCO<sup>3-</sup> and nitrogen source as NO<sup>3-</sup> or NH<sup>4+</sup>. *Plant and Soil* 263(1): 265-272. <https://doi.org/10.1023/b:plso.0000047739.11698.ca>



- Borboa-Flores J, Rueda Puente EO, Acedo Félix E, Ponce JF, Cruz M, Grimaldo JO and García Ortega, AM. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(4): 319-326. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.319-326>
- Chalupowicz L, Zelleremann EM, Fluegel M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Savidor A, Sessa G, Iraki N, Barash I and Manulis-Sasson S. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102(1): 23-31. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-11-0135>
- Chalupowicz L, Barash I, Reuven M, Dror O, Sharabani G, Gartemann KH, Eichenlaub R, Sessa G and Manulis-Sasson S. 2017. Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology* 18: 336-346. <https://doi.org/10.1111/mpp.12400>
- Coaker GL, Willard B, Kinter M, Stockinger EJ and Francis DM. 2004. Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(9): 1019-1028. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.9.1019>
- Croce V, Pianzola MJ, Durand K, González-Arcos M, Jacques MA and Siri MI. 2016. Multilocus sequence typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 144(1): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0738-0>
- de León L, Siverio F, López MM and Rodríguez A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection* 27(9): 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>
- de León L, Siverio F, López MM and Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 95(11): 1328-1338. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-11-0091>
- Dias VD, Carrer Filho R and Cunha MGD. 2019. Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts1. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 49. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4955132>
- Dreier J, Meletzus D and Eichenlaub R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(2): 195-206. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.2.195>
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3721>
- Eichenlaub R and Gartemann KH. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual review of phytopathology* 49:445-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- EPP0. 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPP0 Bulletin* 46: 202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Espinoza-Mancillas MG, Leyva-López NE, Martínez-Valenzuela C, Martínez-Alvarez JC and Herrera-Rodríguez G. 2012. Halo-spot and external stem necrosis of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica* 40(4): 403-412. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0242-4>
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Grafen I, Eichenlaub R and Burger A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106(2-3): 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski J, Kaup O, Olaf Kaup, Kirchner O, Krause L, Linke B, Burkhard Linke, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Rückert C, Schneider S, Zelleremann EM, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O and Bartels D. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 190: 2138-2149. <https://doi.org/10.1128/jb.01595-07>
- Gleason ML, Gitaitis RD and Ricker MD. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease* 77: 1069-1076. <https://doi.org/10.1094/pd-77-1069>
- Huang R and Tu JC. 2001. Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology* 50(4): 503-508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00586.x>
- INFOSTAT. 2003. InfoStat version 1.5. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 232 p.
- Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A, Whyte LG, Niederberger TD and Smith DL. 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microbial Pathogenesis* 77: 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.008>
- Kabas A, Boyacı HF, Horuz S, Aysan Y and İlbi H. 2018. Investigation on identification of new resistant resources to bacterial canker and wilt disease. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 8498.
- Klement Z, Mavridis A, Rudolph K, Vidaver A, Perombelon MCM, Moore LW and Rudolph K. 1990. Inoculation of plant tissue. In: Klement Z, Rudolph K, Sands DC. (Eds.), *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 99-100.
- Lelis FMV, Czajkowski R, de Souza RM, Ribeiro D H and van der Wolf J M. 2014. Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *European Journal of Plant pathology* 139(1): 53-66. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0362-9>
- Lu Y, Hatsugai N, Katagiri F, Ishimaru CA and Glazebrook J. 2015. Putative serine protease effectors of *Clavibacter*

- michiganensis* induce a hypersensitive response in the apoplast of *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(11): 1216-1226. <https://doi.org/10.1094/mpmi-02-15-0036-r>
- Lyu Q, Bai K, Kan Y, Jiang N, Thapa SP, Coaker G, Li J and Luo L. 2019. Variation in Streptomycin Resistance Mechanisms in *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 109(11): 1849-1858. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-19-0152-r>
- Martínez-Castro E, Jarquín-Gálvez R, Alpuche-Solís, Vallejo-Pérez MR, Colli-Mull JG and Lara-Ávila JP. 2018. Bacterial wilt and canker of tomato: fundamentals of a complex biological system. *Euphytica* 214: 72. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2140-4>
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA* XLIX: 1176-1178.
- McGhee GC and Sundin GW. 2011. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 101(2): 192-204. <https://doi.org/10.1094/phyto-04-10-0128>
- Milijašević S, Todorović B, Potočnik I, Rekanović E and Stepanović M. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pesticidi i Fitomedicina* 24(1): 19-27. <https://doi.org/10.2298/pif0901019m>
- Mirzaee H, Peralta NLN, Carvalhais LC, Dennis PG and Schenk PM. 2021. Plant-produced bacteriocins inhibit plant pathogens and confer disease resistance in tomato. *New Biotechnology* 63: 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.003>
- Muhammad S, Naseerud D, Musharaf A, Ali A, Ishrat N, Alam SS and Najeeb U. 2020. Bioefficacy of some aqueous phytoextracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith), the cause of bacterial canker of tomato. *Gesunde Pflanzen* 72(3): 207-217. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00503-9>
- Nandi M, Macdonald J, Liu P, Weselowski B and Yuan ZC. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology* 19(8): 2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- SADER, 2020. El jitomate, hortaliza mexicana de importancia mundial. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Fecha de publicación 10 de octubre de 2020. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-jitomate-hortaliza-mexicana-de-importancia-mundial?idiom=es>
- Savidor A, Teper D, Gartemann KH, Eichenlaub R, Chalupowicz L, Manulis-Sasson S, barash I, Tews H, Mayer K, Giannone RJ, Hettich RL and Seesa G. 2012. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *Journal of Proteome Research* 11(2): 736-750. <https://doi.org/10.1021/pr200646a>
- Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS.
- Sharabani G, Manulis-Sasson S, Borenstein M, Shulhani R, Lofthouse M, Chalupowicz L and Shtienberg D. 2013a. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology* 62(3): 578-586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02673.x>
- Sharabani G, Shtienberg D, Borenstein M, Shulhani R, Lofthouse M, Sofer ML, Chalupowicz Barela V and Manulis-Sassona S. 2013b. Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology* 62(5): 1114-1122. <https://doi.org/10.1111/ppa.12013>
- Steiner AA. 1984. The universal nutrient solution. In: *Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture*. International Society for Soilless Culture (ed.), Lunteren, Netherlands. pp:633-649.
- Stüwe B and von Tiedemann A. 2013. Bacterial canker of tomatoes-histological characterization of cultivar resistance and seed transmission. *Journal of Plant Disease and Protection* 120(5-6): 194-200. <https://doi.org/10.1007/bf03356474>
- Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q and Yang CH. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 17(9): 1506-1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Tancos MA, Chalupowicz L, Barash I, Manulis-Sasson S and Smart CD. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology* 79(22): 6948-6957. <https://doi.org/10.1128/aem.02495-13>
- Thapa SP, Pattathil S, Hahn MG, Jacques MA, Gilbertson RL and Coaker G. 2017. Genomic analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a Gram-positive bacterial pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 30: 786-802. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0146-r>
- Theodoro G and Maringoni AC. 2000. *In vitro* and *in vivo* action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent of the bacterial canker of tomato. *Scientia Agricola* 57: 439-443. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162000000300011>
- Thyr BD. 1968. Resistance to bacterial canker in tomato, and its evaluation. *Phytopathology* 58: 279-81.
- Valenzuela M, Méndez V, Montenegro I, Besoain X and Seeger M. 2019. Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an rpsL gene mutation. *Plant Pathology* 68(3): 426-433. <https://doi.org/10.1111/ppa.12971>
- van Steekelenburg NAM. 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica* 34(2): 245-250. <https://doi.org/10.1007/bf00022916>
- Wassermann E, Montecchia MS, Garaventa VS, Correa OS and Romero AM. 2020. Virulence and pCM1 plasmid carriage are related to BOX-PCR fingerprint type in strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* that cause bacterial wilt and canker of tomato in Argentina. *Plant Pathology* 69(4): 723-732. <https://doi.org/10.1111/ppa.13163>

Werner NA, Fulbright DW, Podolsky R, Bell J and Hausbeck MK. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. Plant Disease 86: 535-542. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.5.535>

Yadeta K and Thomma B. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. Frontiers in Plant Science 4: 97. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>  
Yuqing W, Zhang Y, Zhipeng G and Wencai Y. 2018. Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. Horticultural Plant Journal 4(5): 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>

# Aqueous extracts from *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* for leaf blight control in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*)

## Extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* para el control del tizón foliar en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*)

Arely Anayansi Vargas-Díaz, Laboratorio de Bioprocesos, CONACYT–Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, Carretera Federal Haultunchén-Edzna km 17.5. Sihoac, Champotón, Campeche, CP 24450, México; Jairo Cristóbal-Alejo\*, Instituto Tecnológico de Conkal. Conkal, Yucatán, México, km 16.3 antigua carretera Mérida-Motul. Conkal, Yucatán, CP 97345, México; Blondy Canto-Canché, María Marcela Gamboa-Angulo, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 30 y 32, col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97205, México. \*Corresponding author: jairoca54@hotmail.com

Received: September 13, 2021.

Accepted: December 20, 2021.

Vargas-Díaz AA, Cristóbal-Alejo J, Canto-Canché B and Gamboa-Angulo MM. 2022. Aqueous extracts from *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* for leaf blight control in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 40-58.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-1>

First DOI publication: December 27, 2021.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** The chrysanthemum is the second most important cut flower in the world, however, its quality and commercial value is affected by the leaf blight produced by *Alternaria* spp. The objective of this work was to evaluate the causal agent of leaf blight in Chrysanthemum, and its control with aqueous extracts of *Acalypha*

**Resumen.** El crisantemo es la segunda flor de corte más importante en el mundo, sin embargo, su calidad y valor comercial es afectado por el tizón foliar causado por *Alternaria* spp. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar el agente causal del tizón foliar en crisantemo y su control con extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* en campo. Se realizó la colecta e identificación del hongo a partir de hojas y tallos de plantas de crisantemo. Posteriormente, se hizo la identificación molecular y prueba de patogenicidad en plantas de crisantemo. En campo, se evaluaron los tratamientos con aplicaciones semanales de: T1: extracto de corteza de *B. flammea*, T2: extracto de raíz de *A. gaumeri*, T3: control negativo (agua) y T4: fungicida Captan®. Previamente a la aplicación de los tratamientos, se inocularon las plantas del hongo aislado ( $2.5 \times 10^6$  esporas

*gaumeri* and *Bonellia flammea*. The fungus was collected and identified from leaves and stems of chrysanthemum plants. Subsequently, molecular identification and pathogenicity tests were performed on chrysanthemum plants. In the field, treatments were evaluated with weekly applications of: T1: *B. flammea* bark extract, T2: *A. gaumeri* root extract, T3: negative control (water) and T4: Captan® fungicide. Prior to the application of the treatments, plants were inoculated with the isolated fungus ( $2.5 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>) and severity was evaluated. *Alternaria chrysanthemi* was identified as the causal agent. Based on the severity percentage, the lowest averages of the area under the disease progress curve, the lowest rates of apparent infection, the lowest intensity of the disease and the greater effectiveness in controlling the disease were observed for T2 (165, 0.017, 8 and 67%, respectively) followed by T1 (186, 0.022, 13 y 50 %, respectively) and T4 (179, 0.023, 14 y 45%, respectively), observing a significantly different than negative control T3 (369, 0.025, 25 and 0%, respectively). Plant extracts have potential to be used as an alternative in the management of *Alternaria* leaf blight in chrysanthemum.

**Key words:** Pathosystem, disease, plants extract, *Alternaria chrysanthemi*.

The ornamental plant industry is growing every year (Silva *et al.*, 2018), although the environmental and technological influences of intensive production make the production of diseases-free plants difficult. Due to this, establishing efficient strategies to prevent and manage ornamental plant diseases is imperative (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) is one of the most important ornamental crops in the

mL<sup>-1</sup>) y se evaluó severidad. *Alternaria chrysanthemi* se identificó como el agente causal del tizón foliar. Con base en el porcentaje de severidad, se observaron los menores promedios del área bajo la curva del progreso de la enfermedad, tasas de infección aparente, severidad final y mayor efectividad para controlar la enfermedad con el T2 (165, 0.017, 8 y 67%, respectivamente), seguido por T1 (186, 0.022, 13 y 50%, respectivamente) y T4 (179, 0.023, 14 y 45%), observando diferencia con respecto a T3 (369, 0.025, 25 y 0%, respectivamente). Los extractos evaluados presentan potencial para usarse como alternativa de manejo del tizón foliar de *Alternaria* en crisantemo.

**Palabras clave:** Patosistema, enfermedad, extractos vegetales, *Alternaria chrysanthemi*.

La industria de plantas ornamentales cada año va en aumento (Silva *et al.*, 2018), sin embargo, las influencias ambientales y tecnológicas de producción intensiva dificultan la producción de plantas libres de enfermedades. Por tal razón, es prioritario establecer estrategias eficaces para la prevención y manejo de enfermedades en plantas ornamentales (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) es uno de los cultivos ornamentales de mayor importancia en la producción de flores en el mundo (Anderson, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Olejnik *et al.*, 2021). Esta planta es originaria de Asia Oriental y se adapta a diversos climas (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). En México, se registró una superficie de 3,203 ha, con un valor de producción 1,915,691.00 de pesos (SIAP, 2020).

El crisantemo es susceptible a varios patógenos especialmente cuando se cultiva a gran escala. El tizón foliar causado por *Alternaria* spp. es una de las principales enfermedades que afectan su cultivo

production of flowers globally (Anderson, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Olejnik *et al.*, 2021). This plant is originally from eastern Asia and it adapts to diverse climates (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Its surface registered in Mexico was 3,203 ha, with a production worth 1,915,691 pesos (SIAP, 2020).

The chrysanthemum is susceptible to several pathogens, particularly when grown on a large scale. The leaf blight caused by *Alternaria* spp. is one of the main diseases that affect its production (Xu *et al.*, 2010). Several *Alternaria* species are responsible for this disease, including *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* and *A. chrysanthemi*, which can infect plants individually or in interactions, reducing its quality and value in the market (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2010). Symptoms appear on the edges of the leaves with yellow, maroon to blackish lesions and the presence, in some cases, of chlorotic halos. The progress of the disease is visible with the necrotic areas of variable sizes that can cause the defoliation of the plant. When the disease is severe, the flower petals display reddish-maroon lesions, which then become completely necrotic (Borah *et al.*, 2019; Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018). Without an adequate control, it can lead to the death of the plant (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014).

The main control strategy against leaf blight is using synthetic fungicides (Kumar *et al.*, 2017; Trolinger *et al.*, 2018; Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). However, the recurring and inadequate use of these products has caused problems of resistance in fungal strains, environmental pollution and intoxications in producers (Carvalho, 2017; Kim *et al.*, 2017; Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016; Shuping and Eloff, 2017). This situation demands an exploration of biorational alternatives to control the disease. Among these are natural compounds such as chitosan, essential oils

(Xu *et al.*, 2010). Varias especies de *Alternaria* son las responsables de esta enfermedad, entre ellas *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* y *A. chrysanthemi*, las cuales pueden infectar de manera individual o en interacción, lo que reducen la calidad y el valor en el mercado (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2010). Los síntomas aparecen en los bordes de las hojas con lesiones de color amarillo, marrón a negruzco y la presencia en algunos casos de halos cloróticos. El progreso de la enfermedad se observa por las zonas necróticas de tamaño variable que pueden causar defoliación de la planta. Cuando la enfermedad es severa, los pétalos florales presentan lesiones de color marrón rojizo los que se tornan totalmente necróticos (Borah *et al.*, 2019; Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018). Si no existe un control adecuado, puede causar la muerte de la planta (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014).

La principal estrategia de control del tizón foliar es con el uso de fungicidas sintéticos (Kumar *et al.*, 2017; Trolinger *et al.*, 2018; Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso recurrente e inadecuado de estos productos han causado problemas de resistencia en cepas de hongos, contaminación ambiental e intoxicaciones en los productores (Carvalho, 2017; Kim *et al.*, 2017; Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016; Shuping y Eloff, 2017). Esta situación exige explorar alternativas biorracionales para el control de la enfermedad. Entre éstas, se encuentran los compuestos naturales, como el quitosano, los aceites esenciales y los extractos de plantas (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). Estos últimos, han mostrado potencial para el control de hongos fitopatógenos, debido a su alta efectividad, bajo costo y baja toxicidad sobre organismos benéficos (Breda *et al.*, 2016; Ngegba *et al.*, 2018; Tomazoni *et al.*, 2017). No obstante, existen pocos estudios sobre el uso

and plant extracts (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The latter have proven to have the potential to control phytopathogenic fungi due to their high effectiveness, low cost and low toxicity on beneficial organisms (Breda *et al.*, 2016; Ngegba *et al.*, 2018; Tomazoni *et al.*, 2017). However, there are few studies on the use of plant extracts to control diseases in ornamental plants (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). Under *in vitro* conditions, Nivedha *et al.* (2019) evaluated 24 plant extracts for the control of *A. alternata* in *Jasminum grandiflorum*. The *Allium sativum*, *Datura metel* and *Azadirachta indica* extracts presented the highest fungicidal activities, with inhibitions in the fungal mycelial growth of 100, 68 and 59%, respectively. There are also reports of *Capsicum annuum*, *Helianthus annuus* and *Tagetes erecta* aqueous extracts (in concentrations of 4-8%), effective against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, with mycelial inhibition ranges of 45-57%, 33-85 and 54-79%, respectively (Riaz *et al.*, 2008).

*Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* are native plants of the Yucatan Peninsula that have displayed antifungal effects against *A. alternata*, *A. chrysanthemi*, *Curvularia verruculosa*, *C. lunata*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Exserohilum rostratum*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp. and *Lasiodiplodia parva* (García-Sosa *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Moo-Koh *et al.*, 2014; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). In a previous *in vitro* study, the aqueous extracts of the root of *A. gaumeri* and the cortex of *B. flammea* had an inhibiting effect on mycelial growth (ICM) and sporulation (IS) of *A. chrysanthemi* (ICM = 51 – 57%, IS = 77 – 82%, respectively) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

The inhibition of phytopathogenic fungi using plant extracts is well documented at a laboratory

de extractos vegetales para el control de enfermedades de plantas en ornamentales (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). En condiciones *in vitro* Nivedha *et al.* (2019) evaluaron 24 extractos de plantas para el control de *A. alternata* en *Jasminum grandiflorum*; los extractos de *Allium sativum*, *Datura metel* y *Azadirachta indica* presentaron las mayores actividades fungicidas, con inhibiciones en el crecimiento micelial del hongo en un 100, 68 y 59%, respectivamente. También hay reportes con extractos acuosos de *Capsicum annuum*, *Helianthus annuus* y *Tagetes erecta* (en concentraciones de 4-8%) efectivos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, con rangos de inhibición micelial de 45-57%, 33-85 y 54-79%, en su orden (Riaz *et al.*, 2008).

*Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* son plantas endémicas de la Península de Yucatán que han mostraron efectos antifúngicos contra *A. alternata*, *A. chrysanthemi*, *Curvularia verruculosa*, *C. lunata*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Exserohilum rostratum*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp. y *Lasiodiplodia parva* (García-Sosa *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Moo-Koh *et al.*, 2014; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). En estudio previo *in vitro* los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea* tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial (ICM) y la esporulación (IS) de *A. chrysanthemi* (ICM = 51 – 57%, IS = 77 – 82%, respectivamente) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

La inhibición de hongos fitopatógenos mediante el empleo de extractos de origen vegetal está bien documentada a nivel laboratorio, sin embargo, los estudios para determinar su eficacia en campo son escasos (Castillo-Reyes *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha documentado que los extractos acuosos son ambientalmente más seguros y fácil para utilizarse en campo en comparación con otros métodos de

level, although the studies to determine their efficacy in the field are scarce (Castillo-Reyes *et al.*, 2018). On the other hand, aqueous extracts have been documented to be safer and easier to use in the field than other extraction methods using solvents. Despite the species of *A. gaumeri* and *B. flammea* presenting inhibiting effects against phytopathogenic fungi, they lack field studies to control diseases in plants. Based on this, the aim of this study was to identify the causal agent of leaf blight in chrysanthemum and to control it in the field using *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* aqueous extracts.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolation and characterization of the phytopathogen that causes leaf blight.** *Alternaria* sp. was isolated from chrysanthemum leaves and stems with signs and symptoms related to foliar blight. The samples were collected in the “Nicté-Ha” Floricultural Unit, in the municipal area of Chocholá, Yucatan, Mexico (20°41' N and 89°49' W). Cuts sized approximately 1 cm<sup>2</sup> were made on the infected material, which were then disinfested in a 2% sodium hypochlorite solution for 2 min. Four to five pieces of plant tissue were placed in Petri dishes with potato-dextrose-agar medium (PDA) and incubated at 28 °C (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). After three days, the fungus was purified using monosporic cultures. To achieve the sporulation of the fungus, the malt extract agar medium was used, and from these, the fungus was identified by morpho-taxonomic characteristics that included color and type of mycelium, number of conidia and conidiophore (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007), measurement of the length and width of 100 conidia using a compound microscope (Standard Model K7) and at a 400x magnification.

extracción con disolventes. A pesar de que las especies de *A. gaumeri* y *B. flammea* presentan efectos inhibitorios contra hongos fitopatógenos, carecen de estudios en campo para controlar enfermedades en plantas. Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en identificar el agente causal del tizón foliar en crisantemo y su control en campo con extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento y caracterización del fitopatógeno causante del tizón foliar.** El aislamiento de *Alternaria* sp. se realizó a partir de hojas y tallos de plantas de crisantemo con signos y síntomas asociados al tizón foliar. Las muestras fueron colectadas en la Unidad Florícola “Nicté-Ha”, en el municipio de Chocholá, Yucatán, México (20° 41' N y 89° 49' W). A partir de material infectado se hicieron cortes de aproximadamente un cm<sup>2</sup> y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min. Se depositaron de cuatro a cinco piezas de tejido vegetal en cajas Petri con medio agar dextrosa y papa (PDA) y se incubaron a 28 °C (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Después de tres días, el hongo se purificó mediante cultivos monospóricos. Para lograr la esporulación del hongo se utilizó el medio agar extracto de malta y a partir de éstos, se realizó la identificación del hongo mediante características morfotaxonómicas que incluyeron: color y tipo de micelio, número de conidios y conidióforos (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007), medición del ancho y largo de 100 conidios con microscopio compuesto (Estándar Modelo K7) y en aumento 400x.

Asimismo, se corroboró con la identificación molecular del fitopatógeno. Para estos propósitos, se registró la cepa del hongo como CICY004 y se cultivó en medio papa-dextrosa-agar (PDA) en placas



Likewise, it was corroborated with the molecular identification of the phytopathogen. For this purpose, the fungal strain was registered as CICY004 and it was cultivated in PDA medium in Petri dishes and incubated at 25 °C and 12 h of light/ 12 h of darkness for four days. The genomic DNA was extracted following the procedure by Johanson and Jeger (1993). The reaction mixture (1X) contained 100 ng of gDNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPS, 0.4 mM of every first ITS1 and TS4 (White *et al.*, 1990), and 1U of Taq polymerase, in a total volume of 25 mL. The PCR reaction was carried out with an initial denaturalization of 95 °C for 3 min and 30 cycles with 1 min at 95 °C, 45 s at 53 °C and 30 s at 72 °C. After the cycles, an elongation phase took place, lasting 3 min at 72 °C.

The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel at 1% (Invitrogen®). The amplified products were purified with a PCR purification kit (Gene Clean II, Roche) and were later sequenced in the Sequencing Center in Davis, CA (<http://www.davissequencing.com>) using 100 ng of the PCR product. Both DNA stands were sequenced, using oligo ITS1 for the sense strand and oligo ITS4 for the antisense strand.

The sequences obtained were edited using the program BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) to eliminate the sequences corresponding to the primers and the inadequately sequenced regions (noise with Ns). Once edited, the antisense sequence became a sense sequence with the use of the Reverse Complement tool ([https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)). In both sequences, they were aligned using the program ClustalW (Madeira *et al.*, 2019) to obtain a consensus sequence in which each base was confirmed by both strands; a consensus sequences with 533 nucleotides was obtained, and it was compared with the database of the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the RDP “Ribosomal Database Project” ([https://](https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp)

de Petri e incubadas a 25 °C y 12 h de luz/ 12 h de oscuridad durante cuatro días. El ADN genómico se extrajo de acuerdo a Johanson y Jeger (1993). La mezcla de reacción (1X) contenía 100 ng de ADNg, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPS, 0.4 mM de cada primer ITS1 e TS4 (White *et al.*, 1990) y 1U de Taq polimerasa, en un volumen total de 25 mL. La reacción de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min, y 30 ciclos con 1 min a 95 °C, 45 s a 53 °C y 30 s a 72 °C. Después de los ciclos, se dio una etapa de elongación de 3 min a 72 °C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Invitrogen®). Los productos amplificados fueron purificados con un kit de purificación de PCR (Gene Clean II, Roche) y posteriormente fueron secuenciados en el Instituto de secuenciación de Davis, CA (<http://www.davissequencing.com>) usando 100 ng del producto de PCR. Se secuenciaron ambas hebras de ADN, usando el oligo ITS1 para la hebra sentido y el oligo ITS4 para la hebra antisentido.

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) para eliminar las secuencias correspondientes a los iniciadores y las regiones mal secuenciadas (ruido con Ns). Una vez editadas, la secuencia antisentido se convirtió en sentido con la herramienta Reverse Complement ([https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)), en ambas secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Madeira *et al.*, 2019), para obtener una secuencia consenso en la cual cada base fue confirmada por ambas hebras; se obtuvo una secuencia consenso de 533 nucleótidos y se comparó con las bases de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y RDP “Ribosomal Database Project” (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) con el algoritmo BLAST. La secuencia de 533 nucleótidos se depositó en el GenBank con el número de accesión MH846127.

rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) using the BLAST algorithm. The 533-nucleotide sequence was deposited in the GenBank with accession number MH846127.

A BLASTN analysis was carried out with sequence MH846127 and one accession of each species was chosen among the first 100 comparisons that were homologous with sequence MH846127. Additionally, accession MN153803 from strain HN4-9 of *A. eichhorniae* was included, since it was not among the first 100 counterparts. The analysis was carried out with the program MEGA X using the Maximum Likelihood method (Tamura and Nei, 1993).

The pathogenicity of strain CICY004 was determined in 15 healthy chrysanthemum plants under protected conditions. The plants were superficially cut in the axial part of the leaves with a paintbrush and 20  $\mu\text{L}$  of a suspension of  $2.5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  were inoculated. The plants were placed in separate plastic containers, which were covered to regulate the temperature and moisture for 2 days. After five days, the pathogen was reisolated from the necrotic lesions on the leaves (Riego *et al.*, 1997).

**Preparation of the aqueous extracts.** The aqueous extract of the dehydrated plant material of *A. gaumeri* roots and the cortex of *B. flammea* (30 g of each) was obtained by infusion (20 min) in 500 mL of distilled water at boiling point (Herrera-Parra *et al.*, 2009). The infusion was filtered through paper and diluted up to 1000 mL to obtain the aqueous extract at 3% (30 g  $\text{L}^{-1}$ , p/v) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). The extract was stored at room temperature (less than 24 h) until its application on the field.

**Evaluation of extracts in the control of the disease.** To ensure the presence of the pathogen in the crop in the field, strain CICY004 was grown for 15 days in

Se realizó un análisis BLASTN con la secuencia MH846127, y se seleccionó una accesión de cada especie entre los primeros 100 comparaciones que tuvieron homología con la secuencia MH846127; adicionalmente se incluyó la accesión MN153803 de la cepa HN4-9 de *A. eichhorniae* ya que no estuvo entre los primeros 100 homólogos. El análisis se realizó con el programa MEGA X mediante el método Maximum Likelihood (Tamura y Nei, 1993).

La patogenicidad de la cepa CICY004 se determinó en 15 plantas sanas de crisantemo en condiciones protegidas. Las plantas fueron laceradas superficialmente en la parte axial de las hojas con un pincel y se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $2.5 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las plantas se colocaron en contenedores de plástico por separado y se cubrieron para regular la temperatura y la humedad durante dos días. Después de cinco días, a partir de las lesiones necróticas en las hojas se reisoló el patógeno (Riego *et al.*, 1997).

**Preparación de los extractos acuosos.** El extracto acuoso del material vegetal deshidratado de raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea* (30 g de cada uno) se obtuvo mediante infusión (20 min) en 500 mL de agua destilada a punto de ebullición (Herrera-Parra *et al.*, 2009). La infusión se filtró a través de papel y se aforó a 1000 mL para obtener el extracto acuoso al 3% (30 g  $\text{L}^{-1}$ , p/v) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). El extracto se almacenó a temperatura ambiente (menos de 24 h) hasta su aplicación en campo.

**Evaluación de extractos en el control de la enfermedad.** Para asegurar la presencia del patógeno en el cultivo en campo, la cepa CICY004 se creció por 15 días en medio PDA a 23 °C. A partir de este cultivo, se realizó una suspensión de  $2.5 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). El cul-

PDA medium at 23 °C. From this crop, a suspension of  $2.5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was made (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). The crop was established in the months between March and May, in the Unit Limones Cheé in the Ulu'umil lool floricultural area, in the municipal area of Maní, Yucatan, Mexico (20°39' N and 89°40' W). *C. morifolium* cv. Polaris Yellow trimmings, aged 20 days, were used. These were provided by the "Nicté-Ha" Floricultural Unit in the municipal area of Chocholá, Yucatan, Mexico. The trimmings were transplanted in beds, 1m wide  $\times$  12m long, and a local mixture of soil, organic bovine manure and gravel was used as a substrate in a 2:2:1 proportion. The experimental design was a completely randomized block design, with four repetitions per treatment; for each repetition, plots measuring 1m  $\times$  2.5 m were used. When the plants reached a height of 30 cm, each experimental plot was inoculated with a suspension of  $2.5 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  of the fungal strain indicated. After eight days of inoculation, the plants were sprayed on a weekly basis with the treatments for seven weeks. The evaluated treatments were T1: aqueous extract of the cortex of *B. flammaea* (30 g  $\text{L}^{-1}$ ), T2: aqueous extract of the root of *A. gaumeri* (30 g  $\text{L}^{-1}$ ), alongside two controls, T3: negative control (water) and T4: Captan commercial fungicide (2 g  $\text{L}^{-1}$ ).

The disease was controlled by estimating its severity, with the use of a diagramatic logarithmic scale of severity for the *C. morifolium*-*A. chrysanthemi* pathosystem (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Measurements began when observing the symptoms of the disease (eight days after inoculation with the phytopathogen) and continued every week with random sampling, and in each repetition, a total of 20 central plants, out of which 30 base leaves of each plant were considered. Based on the percentage of severity, disease progress curves were built and the Area

tivo se estableció en los meses de marzo a mayo, en la Unidad Limones Cheé en el área Florícola Ulu'umil lool, en el municipio de Maní, Yucatán, México (20°39' N y 89°40' W), se utilizaron esquejes de *C. morifolium* cv. Polaris Yellow con 20 días de edad; éstos fueron proporcionados por la Unidad Florícola "Nicté-Ha" del municipio de Chocholá, Yucatán, México. Los esquejes se trasplantaron en camas de 1 m de ancho  $\times$  12 m de largo, y como sustrato se utilizó una mezcla local de suelo, abono orgánico de bovinaza y grava en proporción 2:2:1. El diseño experimental fue bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento; para cada repetición se utilizaron parcelas de 1 m por 2.5 m. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 30 cm, cada parcela experimental fue inoculada con una suspensión de  $2.5 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de la cepa fúngica indicada. Después de ocho días de la inoculación, las plantas se asperjaron semanalmente con los tratamientos, durante siete semanas. Los tratamientos evaluados fueron T1: extracto acuoso de la corteza de *B. flammaea* (30 g  $\text{L}^{-1}$ ), T2: extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri* (30 g  $\text{L}^{-1}$ ), paralelamente dos testigos, T3: Control negativo (agua) y T4: fungicida comercial Captan (2 g  $\text{L}^{-1}$ ).

El control de la enfermedad se realizó con la estimación de la severidad de la enfermedad, con el uso de una escala logarítmica diagramática de severidad para el patosistema *C. morifolium*-*A. chrysanthemi* (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Las mediciones se iniciaron al observarse los síntomas de la enfermedad (ocho días después de la inoculación con el fitopatógeno) y se continuaron semanalmente con muestreos al azar, y en cada repetición, un total de 20 plantas centrales, de las cuales se consideraron 30 hojas basales de cada planta. Con base en el porcentaje de severidad, se construyeron curvas del progreso de la enfermedad y se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), mediante el método de integración

Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was estimated using the trapezoidal integration method (Campbell and Madden, 1990), apparent infection rates with Weibull's description model, with the reverse parameter  $b^{-1}$  (Thal *et al.*, 1984) and the final severity of the disease ( $Y_{\text{final}}$ ) with the final evaluation, and which was used to calculate the effectiveness of the control of the disease (Abbott, 1925).

$$\text{Effectiveness} = \frac{\% \text{ severity of the negtive control} - \% \text{ treatment severity}}{\% \text{ severity of the negtive control}} \times 100$$

In addition, as growth variables, the number of buttons and the diameter of a bunch were recorded in 20 central plants. The experiment was carried out twice more and the results were averaged for their statistical analyses. The general management of the crop was carried out according to the traditional practices of the farmer. At the end of the experiment, the fungus was isolated to verify the presence of strain CICY004.

**Data analysis.** The data obtained from the epidemiological parameters, as well as the growth variables, were analyzed using the SAS for Windows version 9 computer package using a one-way analysis of variance and a test of comparison of averages (Tukey,  $p \leq 0.01$ ).

## RESULTS

**Morphological and molecular identification.** The strain of fungus CICY004 in a malt extract medium displayed a velvet-like growth, initially olive-colored on the edges, and later brown. On the back of the Petri dish observed in black color. The conidia displayed an obclavate or cylindrical

trapezoidal (Campbell y Madden, 1990); tasas de infección aparente con el modelo de descripción de Weibull, con el parámetro inverso  $b^{-1}$  (Thal *et al.*, 1984) y severidad final de la enfermedad ( $Y_{\text{final}}$ ) con la última evaluación y con la que se calculó la efectividad del control de la enfermedad (Abbott, 1925).

$$\text{Efectividad} = \frac{\% \text{ severidad del control negativo} - \% \text{ severidad del tratamiento}}{\% \text{ severidad del control negativo}} \times 100$$

En adición, como variables de crecimiento se registraron el número de botones y diámetro del racimo en 20 plantas centrales. El experimento se repitió dos veces y los resultados se promediaron para sus análisis estadísticos. El manejo general del cultivo se realizó de acuerdo a las prácticas tradicionales del productor. Al finalizar del experimento se aisló el hongo para verificar la presencia de la cepa CICY004.

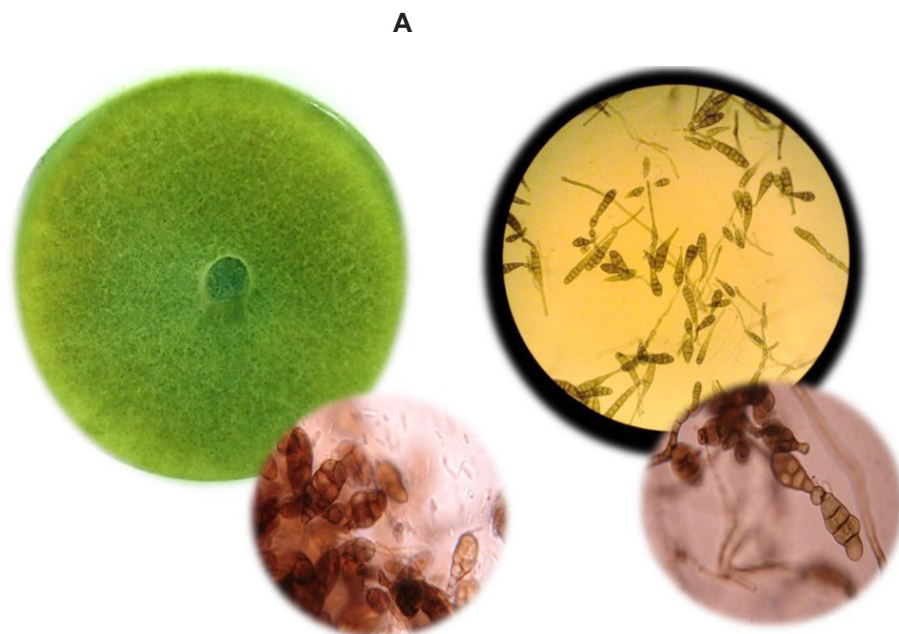
**Análisis de datos.** Los datos obtenidos de los parámetros epidemiológicos, así como las variables de crecimiento, se analizaron con el paquete computacional SAS para Windows versión nueve, mediante un análisis de varianza de una vía y prueba de comparación de medias (Tukey,  $p \leq 0.01$ ).

## RESULTADOS

**Identificación morfológica y molecular.** La cepa del hongo CICY004 en medio extracto de malta mostró un crecimiento aterciopelado, inicialmente de color olivo en los bordes y posteriormente de color café; al reverso de la caja Petri se observó de color negro. Los conidios presentaron forma obclavada o cilíndrica de color oscuro. En su morfometría, con una longitud de 52 a 82  $\mu\text{m}$  por 12.5

shape, with a dark color. In its morphometry, it displays a length of 52 to 82  $\mu\text{m}$  by 12.5 to 15  $\mu\text{m}$  in width, at its widest, with 5 to 9 transversal septa and 0 to 4 longitudinal ones, frequently in chains of twos or on their own (Figure 1). The morphological analysis of strain CICY004 displayed differences with the strains reported by Domínguez-Serrano *et al.* (2016), since it presented larger conidia (52-82  $\times$  12.5-15  $\mu\text{m}$ ) than *A. alternata* (15-35  $\times$  7.5-12.5  $\mu\text{m}$ ) and then *A. tenuissima* (30-67,5  $\times$  7,5-12,5  $\mu\text{m}$ ). Likewise, strain CICY004 presented short chains with one or two conidia, whereas in *A. alternata*, chains presented 10-37 conidia, and in *A. tenuissima*, 5-12 conidia (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007). These data confirmed that strain CICY004 is different, and according to the description of the fungus, it corresponded to the species *A. chrysanthemi* (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007). The pathogenicity of the strain

a 15  $\mu\text{m}$  de ancho en la parte más ancha. Con 5 a 9 septos trasversales y 0 a 4 longitudinales, solitarios o en cadenas de dos frecuentemente (Figura 1). El análisis morfológico de la cepa CICY004 mostró diferencias con las cepas reportadas por Domínguez-Serrano *et al.* (2016), ya que presentó conidios de mayor tamaño (52-82  $\times$  12.5-15  $\mu\text{m}$ ) que *A. alternata* (15-35  $\times$  7.5-12.5  $\mu\text{m}$ ) y *A. tenuissima* (30-67,5  $\times$  7,5-12,5  $\mu\text{m}$ ). De igual forma, la cepa CICY004 presentó cadenas cortas con uno o dos conidios, mientras en *A. alternata* cadenas de 10-37 conidios y en *A. tenuissima* cadenas de 5-12 conidios (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007). Estos datos confirmaron que la cepa CICY004 es diferente y de acuerdo a la descripción del hongo este correspondió a la especie de *A. chrysanthemi* (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007). La patogenicidad de la cepa se comprobó al ser inoculado y reaislado en plantas de crisantemo.



**Figure 1. Morphological characteristics of strain CICY004 (*A. chrysanthemi*), A). Morphology of the culture in malt extract agar medium, B) conidia of strain CICY004.**

**Figura 1. Características morfológicas de la cepa CICY004 (*A. chrysanthemi*), A). Morfología de la colonia en medio agar extracto de malta, B) conidios de la cepa CICY004.**

was proven after being inoculated and reisolated in chrysanthemum plants.

In the BLAST analysis of the ITS region of strain CICY004, it was homologous to sequences that correspond with *Alternaria* with a 100% coverage and a 99.81% identity, therefore confirming that it belongs to this genus. To confirm that the strain registered as CICY004 corresponds with some of the species of *Alternaria* previously reported in Mexico (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016), the sequence of the ITS region of CICY004 was compared with those strains (*A. alternata* KF728748, KF728750 and *A. tenuissima* KF728749, KF728751), and an identity of 99.62% was found with both species, discarding that CICY004 is one of them. Based on morphological identification and sequence analysis, the strain with record CICY004, was identified as *A. chrysanthemi*. This sequence was deposited in the GenBank as *A. chrysanthemi* CICY004 with accession number MH846127.

**Effect of extracts in the field over the control of the disease.** The symptoms of leaf blight disease in the crop were presented 37 days after transplanting (dat). In the negative control (water), the progress of the disease was higher than in the rest of the treatments (Figure 2). Based on the AUDPC and  $Y_{final}$ , the aqueous extracts of *A. gaumeri* (T2) (165% a day, 8 and 67%, respectively) and cortex of *B. flammea* (T1) (186% a day, 13 and 50%, respectively) reduced the disease severity, with a significant difference with the negative control (T3) (369% a day, 25 and 0%, respectively). Likewise, the application of these extracts was significantly equal to the fungicide Captan® (T4) (179% a day, 14 and 45%, respectively) (Tables 1 and 2). However, when the speed of the diseases was estimated using the infection rate with the Weibull description model ( $b^{-1}$ ), only the aqueous extract from *A. gaumeri* T2 (0.017 unit day<sup>-1</sup>) significantly reduced the progress of the disease (Table 1) (Figure 3).

En el análisis BLAST de la región ITS de la cepa CICY004, fue homóloga a secuencias que corresponden con *Alternaria* con 100% de cobertura y 99.81% de identidad, por lo que se confirmó que la cepa pertenece a este género. Para confirmar la cepa con registro CICY004 corresponde con alguna de las especies de *Alternaria* previamente reportadas en México (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016), se comparó la secuencia de la región ITS de CICY004 con esas cepas (*A. alternata* KF728748, KF728750 y *A. tenuissima* KF728749, KF728751), se encontró con ambas especies una identidad del 99.62 %, lo que descarta que CICY004 se trate de alguna de ellas.

Con base en la identificación morfológica, y al análisis de la secuencia, la cepa con registro CICY004, se identificó como *A. chrysanthemi*. La secuencia se depositó en el GenBank como *A. chrysanthemi* CICY004 con el número de acceso MH846127.

**Efecto de extractos en campo sobre el control de la enfermedad.** Los síntomas de la enfermedad del tizón foliar en el cultivo se presentaron a los 37 días después del trasplante (ddt). En el control negativo (agua) el progreso de la enfermedad fue mayor que en el resto de los tratamientos (Figura 2).

Con base al ABCPE y  $Y_{final}$  los extractos acuosos *A. gaumeri* (T2) (165% por día, 8 y 67%, respectivamente) y corteza de *B. flammea* (T1) (186% por día, 13 y 50%, respectivamente) redujeron la severidad de la enfermedad, con diferencia significativa con respecto al control negativo (T3) (369% por día, 25 y 0%, en su orden). Asimismo, la aplicación de estos extractos fue significativamente igual al fungicida Captan® (T4) (179% por día, 14 y 45%, respectivamente) (Cuadro 1 y 2). Sin embargo, cuando se estimó la velocidad de la enfermedad mediante la tasa de infección con el modelo de descripción Weibull ( $b^{-1}$ ), solo el extracto acuoso de *A. gaumeri* T2 (0.017 unidad día<sup>-1</sup>) redujo significativamente el progreso de la enfermedad (Cuadro 1) (Figura 3).

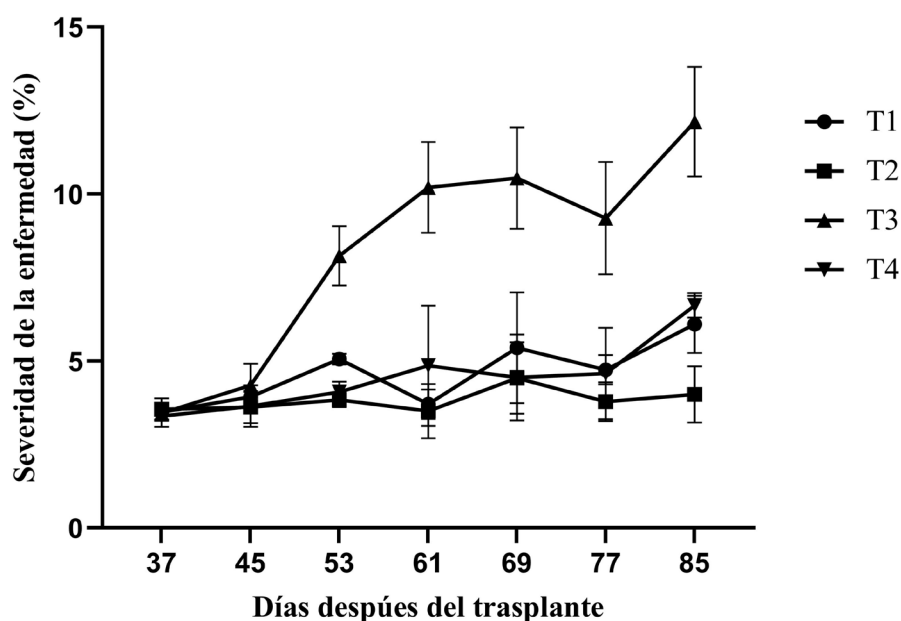


Figure 2. Progress curves of the severity of leaf blight caused by *A. chrysanthemi* on the chrysanthemum crop and effect of the application of treatments T1: Aqueous extract of the cortex of *B. flammea*, T2: Aqueous extract of the root of *A. gaumeri*, T3: Negative control (water) and T4: Captan® fungicide.

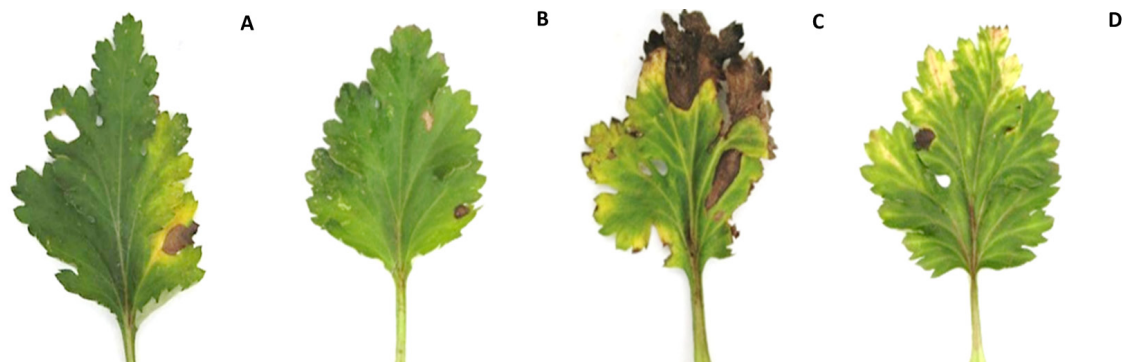
Figura 2. Curvas de progreso de la severidad del tizón foliar causado por *A. chrysanthemi* en el cultivo de crisantemo y efecto de la aplicación de tratamientos: T1: Extracto acuoso de la corteza de *B. flammea*, T2: Extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri*, T3: Control negativo (agua) y T4: Fungicida da Captan®.

Table 1. Effect of the application of treatments on the epidemiological intensity of leaf blight caused by *A. chrysanthemi* on the chrysanthemum crop.

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de tratamientos sobre la intensidad epidemiológica del tizón foliar causado por *A. chrysanthemi* en el cultivo de crisantemo.

| Tratamientos  | ABCPE (% día <sup>-1</sup> ) | Tasa de infección aparente (Weibull 1/b % día <sup>-1</sup> ) | Ajuste del modelo Weibull (r <sup>2</sup> ) | Y <sub>final</sub> (%) |
|---|------------------------------|---|---|------------------------|
| T1: Extracto acuoso de corteza de <i>B. flammea</i> | 186 b                        | 0.022 a   | 0.97  | 13 b                   |
| T2: Extracto acuoso de raíz de <i>A. gaumeri</i>    | 165 b                        | 0.017 b   | 0.98  | 8 b                    |
| T3: Control negativo (agua)                         | 369 a                        | 0.025 a   | 0.96  | 25 a                   |
| T4: Fungicida Captan® (2 g L <sup>-1</sup> )        | 179 b                        | 0.023 a   | 0.96  | 14 b                   |
| DE  | 12                           | 0.003   | -   | 1.3                    |

Means with the same letter between columns are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DS: Standard Deviation. / Medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DS: desviación estándar.



**Figure 3.** Effect of treatments on the control of leaf blight in chrysanthemum, T1: Aqueous extract of the cortex of *B. flammea*, T2: Aqueous extract of the root of *A. gaumeri*, T3: Negative control (water) and T4: Captan® fungicide.  
**Figura 3.** Efecto de tratamientos en el control del tizón foliar en crisantemo, T1: Extracto acuoso de la corteza de *B. flammea*, T2: Extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri*, T3: Control negativo (agua) y T4: Fungicida Captan®.

In the chrysanthemum crop growth variables: number of buds and bunch diameter, the treatments that included the extracts and the synthetic fungicide significantly improved these variables ( $p \leq 0.01$ ) (Table 2).

En las variables de crecimiento del cultivo evaluadas: número de botones y diámetro del racimo, los tratamientos que incluyeron a los extractos y al fungicida sintético, mejoraron significativamente estas variables ( $p \leq 0.01$ ) (Cuadro 2).

## DISCUSSION

The diseases caused by fungi severely affect the chrysanthemum industry (Borah *et al.*, 2019;

## DISCUSIÓN

Las enfermedades causadas por hongos afectan severamente la industria del crisantemo (Borah *et*

**Table 2.** Effectiveness of the aqueous extracts of plants to control leaf blight and growth variables in chrysanthemum.

**Cuadro 2.** Efectividad de los extractos acuosos vegetales para controlar al tizón foliar y variables de crecimiento en crisantemo.

| Tratamientos  | Efectividad (%)   | Variables Agronómicas                       |                         |
|---|-------------------|---|-------------------------|
|   |                   | Número de Botones (n planta <sup>-1</sup> ) | Diámetro de racimo (cm) |
| T1: Extracto acuoso de corteza de <i>B. flammea</i> | 50 a <sup>2</sup> | 18 a  | 15 a                    |
| T2: Extracto acuoso de raíz de <i>A. gaumeri</i>    | 67 a              | 17 a  | 14 a                    |
| T3: Control negativo (agua)                         | 0 b               | 12 b  | 10 b                    |
| T4: Fungicida Captan® (2 g L <sup>-1</sup> )        | 45 a              | 19.2 a                                      | 14 a                    |
| DE <sup>3</sup>                                     | 5.57              | 2.63  | 1.44                    |

<sup>3</sup>DE: standard deviation of the mean. <sup>2</sup>Means with the same letter between columns are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). / DE: desviación estándar de la media. Medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



Trolinger *et al.*, 2018). This study identified *A. chrysanthemi* as the causal agent of leaf blight in the chrysanthemum in Mexico. This species has been reported in chrysanthemum in other countries such as Australia, the United States, the Netherlands and India (Sober, 1965). In Mexico, Domínguez-Serrano *et al.* (2016) reported the species of *A. alternata* (KF728748, KF728750) and *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) as causal agents of blight in chrysanthemum, the morphological and molecular analyses of which do not coincide with the isolated strain in this study. The alignment with the previously reported sequences of *A. alternata* (KF728748, KF728750) and *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) present two and three different nucleotides with the strain CICY004. It is important to mention that Domínguez-Serrano *et al.* (2016) found only one difference in the region they studied (540 nucleotides) of the ITS of *A. alternata* and *A. tenuissima*; only one insertion of a “T” nucleotide in the sequence of the second and absent in *A. alternata*, whereas the rest was identical. This difference was accepted as a criterion to distinguish both species, since the authors sequenced each species 5 times and that difference was reproducible.

In this investigation, the differences found between CICY004, *A. alternata* and *A. tenuissima* were also few and accepted, since the sequence of CICY004 corresponds to a consensus sequence, 100% confirmed with the sense and antisense strand sequences. These nucleotide differences are informative and tell CICY004 apart from *A. alternata* and *A. tenuissima*, as well as from *A. eichhorniae*. The morphology revealed that it is *A. chrysanthemi*, making this the first report of the ITS sequence of this phytopathogen, since it did not exist earlier in the GenBank or in the RDP. This study is now a reference for future investigations on *A. chrysanthemi* as the causal agent of leaf blight in chrysanthemum.

*al.*, 2019; Trolinger *et al.*, 2018). En este trabajo se identificó a *A. chrysanthemi* como agente causal del tizón foliar del crisantemo en México. Esta especie se ha reportado en crisantemo en otros países como Australia, EE.UU., Holanda e India (Sober, 1965). En México, Domínguez-Serrano *et al.* (2016) reportaron a las especies *A. alternata* (KF728748, KF728750) y *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) como agentes causales del tizón en crisantemo, cuyos análisis morfológico y molecular no coinciden con la cepa aislada en este estudio. El alineamiento con las secuencias previamente reportadas de *A. alternata* (KF728748, KF728750) y *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) presentan dos y tres nucleótidos diferentes con la cepa CICY004. Es importante mencionar que Domínguez-Serrano *et al.* (2016) encontraron una sola diferencia en la región que estudiaron (540 nucleótidos) de los ITS de *A. alternata* y *A. tenuissima*; una sola inserción de un nucleótido “T” en la secuencia de la segunda y ausente en *A. alternata*, mientras lo demás fue idéntico. Esta diferencia fue aceptada como criterio para distinguir ambas especies, ya que los autores secuenciaron 5 veces cada especie y esa diferencia fue reproducible.

En el presente trabajo las diferencias encontradas entre CICY004, *A. alternata* y *A. tenuissima* también fueron pocas, y estas diferencias aceptadas ya que la secuencia de CICY004 corresponde a una secuencia consenso, confirmada al 100% con las secuencias de la hebra sentido y de la hebra antisentido. Estas diferencias nucleotídicas son informativas, y diferencian a CICY004 de *A. alternata* y *A. tenuissima*, y también de *A. eichhorniae*. La morfología reveló que se trata de *A. chrysanthemi*, por lo que este es el primer reporte de la secuencia ITS de este fitopatógeno, ya que previamente no existía en el GenBank o en el RDP. Este estudio ahora permite ser referencia de futuras investigaciones sobre *A. chrysanthemi* como agente causal del tizón foliar en crisantemo.

In the control of leaf blight, both *A. gaumeri* and *B. flammaea* aqueous extracts and the Captan® fungicide displayed the same effect in stopping the progress of the disease and improved upon what was reported by Kumar *et al.* (2017) when evaluating garlic extracts (effectiveness of 36.64%) in the same crop. In addition, the *A. gaumeri* and *B. flammaea* aqueous extracts displayed a greater effect in comparison with the *Eucalyptus globulus* and *Ocimum sanctum* aqueous extracts at 5% against the early potato blight (20.83 and 25.37%) (Debbarma *et al.*, 2017). These results indicated that the *A. gaumeri* and *B. flammaea* extracts at 3% can reduce the severity caused by *A. chrysanthemi*, and the information previously reported on the *in vitro* tests against this pathogen (Vargas-Díaz *et al.*, 2014) was confirmed.

In parameters AUDPC and  $Y_{final}$ , both extracts turned out to be as effective in the reduction of the severity as the Captan® fungicide. A study by Ortega-Centeno *et al.* (2010) reported in cauliflower, broccoli and radishes (Brassicaceae), the same effectiveness of control as with synthetic fungicides (captan, amistar and manzate) against *Uromyces transversalis*, which causes rust in gladiolus rust.

The plants *A. gaumeri* and *B. flammaea* are considered endemic to the Yucatán Peninsula, meaning there is scarce information on their phytochemical and biological properties (Hernández-Bolio *et al.*, 2019). *A. gaumeri* is a plant on which there are few reports regarding its antifungal activity (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). In the genus there have been chemical families found, depending on the solvent used (terpenes, steroids, tannins, saponins alkaloids, anthocyanins, polyketides and flavonoids) mainly responsible for antifungal activities (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Seebaluck *et al.*, 2015).

En el control del tizón foliar, ambos extractos acuosos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea* y el Fungicida Captan® mostraron el mismo efecto, para detener el progreso de la enfermedad y mejoraron lo reportado por Kumar *et al.* (2017) cuando evaluó extracto de ajo (efectividad 36.64%) en el mismo cultivo. También, los extractos acuosos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea*, mostraron un mayor efecto, en comparación con extractos acuosos de *Eucalyptus globulus* y *Ocimum sanctum* al 5% contra el tizón temprano de la papa (20.83 y 25.37%) (Debbarma *et al.*, 2017). Estos resultados indicaron que los extractos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea* al 3% son capaces de reducir la severidad causada por *A. chrysanthemi*, y se confirmó lo previamente reportando en las pruebas *in vitro* contra este patógeno (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

En los parámetros ABCPE y  $Y_{final}$ , ambos extractos resultaron igual de efectivos para reducir la severidad que el fungicida Captan®. Un estudio, Ortega-Centeno *et al.* (2010) reportaron con extractos de coliflor, brócoli y rábanos (Brassicaceae), misma efectividad de control con fungicidas sintéticos (captan, amistar y manzate) contra *Uromyces transversalis* causante de la roya en gladio.

Las plantas *A. gaumeri* y *B. flammaea* son consideradas endémica de la Península de Yucatán, lo que significa poca información sobre sus propiedades fitoquímicas y biológicas (Hernández-Bolio *et al.*, 2019). *A. gaumeri* es una planta en la que existen pocos reportes de su actividad antifúngica (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). En el género se han reportado familias químicas, que de acuerdo con el disolvente utilizado están presentes: terpenos, esteroides, taninos, saponinas alcaloides, antocianinas, policétidos y flavonoides principalmente responsables de actividades antifúngicas (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Seebaluck *et al.*, 2015).

Regarding *B. flammaea*, from methanolic root extracts, García-Sosa *et al.* (2011) reported an inhibiting effect against *C. gloeosporioides*. Sánchez-Medina *et al.* (2010) identified the presence of a sakurososaponin from the aqueous residue from the liquid-liquid partition of the extract, with a cytotoxic activity and against *C. gloeosporioides*. Sakurososaponin is one of the main metabolites responsible for the antifungal activity of *B. flammaea*, and it is known to have the ability to form complexes with sterols of the cell membrane, which causes a loss in its integrity and the death of the fungus (Morrissey and Osbourn, 1999).

When growing ornamental plants, the esthetic damage on the foliage and flowers caused by phytopathogens is considered crucially important, since it reduces their quality, shelf life and price for sale (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The reduction in the intensity of the disease with the application of extracts and the fungicides allowed for a higher number of buttons and diameter of the bunches, with a significant difference with the negative control, which is crucial to obtain higher yields in the production of chrysanthemum (Kumar *et al.*, 2011).

In addition to being easily obtainable for application on the field by farmers, aqueous extracts are environmentally safer in comparison with other methods of extraction with solvents. This represents an important step in the development of environmentally friendly plant-based pesticides. This study is the beginning of future investigations that contributes to proposing strategies for the control of diseases in the sustainable planting of chrysanthemum.

En cuanto a *B. flammaea*, García-Sosa *et al.* (2011), a partir de extractos metanólicos de raíces, reportaron efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides*. Sánchez-Medina *et al.* (2010) identificaron la presencia de una sakurososaponina a partir del residuo acuoso procedente de la partición líquido-líquido del extracto, con actividad citotóxica y contra *C. gloeosporioides*. La sakurososaponina es uno de los principales metabolitos responsables de actividad antifúngica de *B. flammaea*, y se sabe que tiene la habilidad de formar complejos con esteroides de la membrana celular, lo que causa una pérdida en la integridad de la misma y la muerte del hongo (Morrissey y Osbourn, 1999).

En el cultivo de ornamentales se considera que el daño estético en follaje y flores causado por fitopatógenos es de vital importancia, ya que merman la calidad, la vida de anaquel y el precio de su comercialización (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). La disminución de la intensidad de la enfermedad mediante las aplicaciones de los extractos y el fungicida, permitieron mayor número de botones y diámetro del racimo, con diferencia significativa al control negativo, lo que es fundamental para obtener mayores rendimientos en la producción de crisantemo (Kumar *et al.*, 2011).

Además de su obtención fácil para aplicarse en campo por productores, los extractos acuosos son ambientalmente más seguros en comparación con otros métodos de extracción con disolventes. Esto representa un paso importante en el desarrollo de plaguicidas amigables con el ambiente a base de plantas. Este estudio es el inicio de futuras investigaciones que contribuye a plantear estrategias de control de enfermedades en el cultivo sustentable del crisantemo.

## CONCLUSIONS

*Alternaria chrysanthemi* was identified as the causal agent of leaf blight in chrysanthemum. The aqueous extracts of *A. gaumeri* roots and *B. flammea* cortex were as effective as the fungicide Captan® in the control of the leaf blight disease under field conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our acknowledgements go to the National Science and Technology Council for the financial support of this investigation (Project PDCPN- 2015-266) and to project Cátedra CONACYT 364 “Reconversión productiva sustentable para el desarrollo de los productores rurales de Campeche” (Productive sustainable reconversion for the development of rural farmers in Campeche), of which the main author of this manuscript is a member. To the technical support given by Filogonio May Pat, Paulino Simá Polanco and Irma L. Medina Baizabal.

## LITERATURE CITED

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Adesina SK, Idowu O, Ogundaini AO, Oladimeji H, Olugbade TA, Onawunmi GO and Pais M. 2000. Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14: 371-374. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F).
- Ahmad F, Raziq F, Ullah N, Khan H and Din N. 2017. *In vitro* and *in vivo* bio-assay of phytobiocidal effect of plant extracts on *Alternaria solani* causing agent of early blight disease in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50(11-12): 568-583. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1352247>.
- Anderson NO. 2007. *Chrysanthemum. Dendranthema* × *grandiflora* Tzvelv. Pp 389-437. In: Anderson NO (ed) *Flower breeding and genetics*. Springer, Dordrecht. 824 p [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1_14)
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Minneapolis, USA. 241 p.

## CONCLUSIONES

Se identificó a *Alternaria chrysanthemi* como el agente causal del tizón foliar en crisantemo. Los extractos acuosos de raíz de *A. gaumeri* y corteza de *B. flammea* fueron igual de efectivos que el fungicida Captan® para controlar la enfermedad del tizón foliar bajo condiciones de campo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación (Proyecto PDCPN- 2015-266) y al proyecto Cátedra CONACYT 364 “Reconversión productiva sustentable para el desarrollo de los productores rurales de Campeche” del cual es integrante el primer autor del manuscrito. Al apoyo técnico de Filogonio May Pat, Paulino Simá Polanco e Irma L. Medina Baizabal.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Barrera-Necha LLB and Bautista-Baños S. 2016. Prospects for the use of chitosan and other alternatives in ornamental conservation. Pp: 221-249. In: Bautista-Baños S, Romanazzi G and Jiménez-Aparicio A. (eds.). *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. Academic Press, México. 366p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00008-2>
- Borah M, Rajkhowa M and Ali S. 2019. Occurrence of diseases in floricultural crops in and around Jorhat, Assam. *International Journal of Economic Plants* 6(2): 54-63. <https://doi.org/10.23910/IJEP/2019.6.2.0294>
- Breda CA, Gasperini AM, Garcia VL, Monteiro KM, Bataglion GA, Eberlin MN and Duarte MCT. 2016. Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of *Brazilian Savanna* plants aiming its use as safe fungicides. *Natural Product Bioprospecting* 6: 195-204. <https://doi.org/10.1007/s13659-016-0101-y>
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons, New York, USA. 532 p.
- Carvalho FP. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6:48-60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>.

- Castillo-Reyes F, Castillo-Quiroz D, Muñoz-Flores HJ y Sánchez AR. 2018. Uso de bio-pesticidas de origen vegetal en el manejo de enfermedades de cultivos en México. *Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México* 4(5): 107-121.
- Debbarna S, Sunil Z and Sobita S. 2017. Effect of plant extracts on early blight potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(4): 1415-1417. Disponible en línea: <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue4/PartU/6-4-191-590.pdf>.
- Deng Y, Chen S, Chang Q, Wang H and Chen F. 2012. The *chrysanthemum* × *Artemisia vulgaris* intergeneric hybrid has better rooting ability and higher resistance to *Alternaria* Steel leaf spot than its chrysanthemum parent. *Scientia Horticulturae* 134: 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.012>
- Domínguez-Serrano D, Yáñez-Morales MJ, García-Velasco R, Alanís-Martínez I and Segura-León O. 2016. First report of *Chrysanthemum morifolium* leaf spot caused by *Alternaria* species in Mexico. *Plant Disease* 100(3): 647. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0723-PDN>
- Gamboa-Angulo MM, Cristóbal-Alejo J, Medina-Baizabal IL, Chi-Romero F, Méndez-González R, Simá-Polanco P and May-Pat F. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(9): 1955-1959. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9658-x>
- García-Sosa K, Sánchez-Medina A, Álvarez SL, Zacchino S, Veitch NC, Simá-Polanco P and Peña-Rodríguez LM. 2011. Antifungal activity of sakurasaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research* 25(12): 1185-1189. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.511215> PMID: 21740284
- Gutierrez-Lugo MT, Singh MP, Maiese WM and Timmermann BN. 2002. New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Product* 65:872-875. <https://doi.org/10.1021/np020044g>
- 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.
- Hernández-Bolio GI, Ruiz-Vargas JA and Peña-Rodríguez LM. 2019. Natural products from the Yucatecan flora: structural diversity and biological activity. *Journal of Natural Products* 82(3): 647-656. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00959>
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Tún-Suárez M, Gamboa-Angulo MM y Marbán-Mendoza N. 2009. Extractos acuosos de *Calea urticifolia* Mill. para el control de *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 39: 289-296.
- Hungeling M, Lechtenberg M, Fronczek FR and Nahrstedt A. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridine glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 70:270-277. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.011>
- Johanson A and Jeger MJ. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97: 670-674. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80145-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80145-7)
- Kim KH, Kabir E and Jahan SA. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* 575: 25-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kumar A, Kumar M, Ghosh S, Tewari T and Bhardwaj SB. 2017. Effect of weed management practices in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.) Under Tarai Conditions of Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8): 3028-3034. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.362>
- Kumar GA, Kamanna BC and Benagi VI. 2011. Management of chrysanthemum leaf blight caused by *Alternaria alternata* (fr.) Keissler under field condition. *Plant Archives* 11: 553-555.
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD and Lopez R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* 47(W1): W636-W641. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkz268>.
- Moo-Koh FA, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Sandoval-Luna R and Ramírez-Pool JA. 2014. *In vitro* activity of an aqueous extract of *Bonellia flammea* against phytopathogenic fungi. *Agrociencia* 48(8): 833-845. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v48n8/v48n8a6.pdf>.
- Morrisse JP and Osbourn AE. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 708-724. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.708-724.1999>.
- Ngegba PM, Kanneh SM, Bayon MS, Ndoko EJ and Musa PD. 2018. Fungicidal effect of three plants extracts in control of four phytopathogenic fungi of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit rot. *International Journal Environ of Environment, Agriculture and Biotechnology* 3: 112-117. <https://doi.org/10.22161/ijeab/3.1.14>
- Nivedha M, Ebenezer EG, Kalpana K and Arun Kumar R. 2019. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against leaf blight disease of *Jasminum grandiflorum* caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(3): 2143-2147. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartAC/8-3-28-815.pdf>.
- Olejnik A, Parkitna K, Kozak B, Florczak S, Matkowski J and Nowosad K. 2021. Assessment of the Genetic Diversity of *Chrysanthemum* Cultivars Using SSR Markers. *Agronomy* 11(11): 2318. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112318>.
- Ortega-Centeno S, Guillén-Sánchez D, Ramos-García M, Troncoso-Rojas R, Villanueva-Arce R, Bosquez-Molina E y Bautista-Baños S. 2010. Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia Brassicaceae en el control de la roya del gladiolo. *Revista de Chapingo Serie Horticultura* 16(1): 13-21. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rhsh/v16n1/v16n1a3.pdf>
- Riaz T, Khan SN and Javaid A. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*—the cause of corm-rot disease of Gladiolus. *Mycopath* 6 (1–2): 13-15.
- Riego E, Hayes O, Musacchio A y Leonart R. 1997. Los postulados de Koch y la neuropatía epidémica. *Biotecnología Aplicada* 14: 137-141.

- Sánchez-Medina A, Peña-Rodríguez LM, May-Pat F, Karagianis G, Waterman PG, Mallet AI and Habtemariam S. 2010. Identification of sakurasaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications* 5(3): 1934578X1000500304. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1000500304>.
- Seebaluck R, Gurib-Fakim A and Mahomoodally F. 2015. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)—A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology* 159: 137-157. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.040>
- Shuping DSS and Eloff JN. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14: 120-127. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Cierre de la producción agrícola. Crisantemo (planta). [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (Consulta el 10 de diciembre de 2021).
- Silva DPCD, Ozudogru EA, Reis MVD and Lambardi M. 2018. *In vitro* conservation of ornamental plants. *Ornamental Horticulture* 24(1): 28-33. <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v24i1.1163>.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*: an identification manual. CS biodiversity series 6: 1-775.
- Sobers EK. 1965. *Alternaria chrysanthemi* in Florida. Annual meeting of the Florida State. *Plant Pathology Circular* 36. <https://www.fdacs.gov/content/download/11042/file/pp36.pdf>
- 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* 10:512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Thal WM, Campbell CL and Madden LV. 1984. Sensibility of weibull model parameters estimates to variation in simulated disease progression data. *Phytopathology* 74: 1425-1430. <https://doi.org/10.1094/phyto-74-1425>.
- Tomazoni EZ, Pauletti GF, Da Silva Ribeiro RT, Moura S and Schwambach J. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticultura* 223: 2-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>.
- Trolinger JC, McGovern RJ, Elmer WH, Rechcigl NA and Shoemaker CM. 2018. Diseases of *Chrysanthemum*. Pp. 439-502. In: McGovern R. and Elmer W. (Eds.). *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. New Haven, CT, USA. 1365 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_16)
- Vargas-Díaz AA, Gamboa-Angulo M, Medina-Baizabal IL, Pérez-Brito D, Cristóbal-Alejo J y Ruiz-Sánchez E. 2014. Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 1-11. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a1.pdf>.
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J y Tún-Suárez J. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramant.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 49-56. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223107.pdf>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (Eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA. 482 p. <https://msafungi.org/wp-content/uploads/2019/03/February-2013-Inoculum.pdf>.
- Xu G, Chen S and Chen F. 2010. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpinxoo gene demonstrate induced resistance to *Alternaria* leaf spot and accelerated development. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 548-553. <https://doi.org/10.1134/S1021443710040138>
- Zhu WY, Zhang F, Chen SM, Xu LL, Wang L, Wang HB and Chen F. 2014. Intergeneric hybrids between *Chrysanthemum morifolium* 'Nannongxiaoli' and *Artemisia vulgaris* 'Variegata' show enhanced resistance against both aphids and *Alternaria* leaf spot. *Euphytica* 197(3): 399-408. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1076-6>.

# Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitácuaro, Michoacán

## Caracterización y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Phytophthora cinnamomi* causante de pudrición de raíz en aguacate en Zitácuaro, Michoacán

Alejandra Mondragón-Flores<sup>1,2</sup>, <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. UMSNH, Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5 Tarímbaro Michoacán. CP 58880. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de Apatzingán-INIFAP. Carretera Apatzingán-Cuatro caminos km 17.5, Antúnez, Michoacán. CP. 60780; Patricia Manosalva, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside, CA. CP 92521; Salvador Ochoa-Ascencio, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas no. 2290 Jardines del Cupatitzio Uruapan, Michoacán. CP 60170; Marlene Díaz-Celaya<sup>1</sup>, Gerardo Rodríguez-Alvarado<sup>1</sup>, Sylvia P. Fernández-Pavía<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author: patricia.pavia@umich.mx

Received: September 29, 2021.

Accepted: December 23, 2021.

Mondragón-Flores A, Manosalva P, Ochoa-Ascencio S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G and Fernández-Pavía SP. 2022. Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitacuaro, Michoacan. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 59-81.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-4>

First DOI publication: December 29, 2021.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** *Phytophthora cinnamomi* is the pathogen most frequently associated with avocado root rot. In Zitácuaro, Michoacán, production

**Resumen.** *Phytophthora cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz en aguacate. En Zitácuaro, Michoacán la producción ha aumentado un 19.8 %; sin embargo, actualmente no existen estudios de esta enfermedad en la región. El objetivo de este estudio fue caracterizar aislados obtenidos de raíces de aguacate y evaluar la sensibilidad a fungicidas. Se tomaron muestras de cinco huertas de aguacate, tomando cinco árboles por huerta (25 muestras en total). A partir de las muestras se aislaron, y se identificaron morfológica y molecularmente las cepas obtenidas. Se analizó el tipo de compatibilidad con aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate). Para comprobar

has increased by 19.8%; however, there are no studies of root rot in this area. The objective of the study was to characterize the isolates obtained from avocado roots and assess the sensitivity to fungicides. Samples from 5 avocado orchards were collected, sampling 5 trees per orchard (a total of 25 samples). The samples isolated were characterized morphological and molecularly. Mating type was analyzed using reference isolates of *P. cinnamomi* A1 (isolate from camelia) and A2 (isolate from avocado). To confirm the pathogenicity, tests were performed on avocado fruits with the isolates. The sensitivity of 15 isolates to potassium phosphite and to metalaxyl-M at different concentrations was evaluated *in vitro*. In a subgroup of six isolates, it was evaluated whether there was a relationship between growth rate and potassium phosphite sensitivity. Fifteen isolates were obtained with coenocytic coraloid mycelium, chlamydospores, sporangia without papilla, ovoid to ellipsoid, with internal proliferation, heterothallic with mating type A2, with amphigynous antheridia and plerotic oospores, characteristics consistent with *P. cinnamomi*. The inoculated isolates were pathogenic on avocado fruits. The isolates were more sensitive to potassium phosphite than to metalaxyl-M, with mean  $EC_{50}$  values of 24.62 and  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., respectively. No relationship was observed between growth rate and potassium phosphite sensitivity. It is necessary to obtain a greater number of *P. cinnamomi* isolates for virulence studies.

**Key words:** sensitivity, mating type, mycelial growth, wilt.

Avocado (*Persea americana*) is an extremely important fruit crop produced in several areas of the world. Nowadays, it is widely documented as

la patogenicidad, se realizaron pruebas en frutos de aguacate con los aislados. Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio y metalaxil-M en diferentes concentraciones bajo condiciones *in vitro*. En un subgrupo de seis aislados se evaluó la relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Se obtuvieron 15 aislados con micelio cenocítico coraloide, clamidosporas, esporangios sin papila, ovoides y elipsoides, con proliferación interna, heterotáticos, tipo de compatibilidad A2, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas características que concuerdan con *P. cinnamomi*. Los aislados inoculados fueron patógenicos en frutos de aguacate. Los aislados fueron más sensibles a fosfito de potasio que a metalaxil-M, con valores promedio de  $CE_{50}$  de 24.62 y  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., respectivamente. No se observó relación entre la tasa de crecimiento y la sensibilidad a fosfito de potasio. Es necesario obtener mayor número de aislados para estudios de virulencia.

**Palabras clave:** sensibilidad, tipo de compatibilidad, crecimiento micelial, marchitez.

El aguacate (*Persea americana*) es un cultivo frutal de gran importancia que se produce en diversas regiones del mundo, en la actualidad se encuentra plenamente documentado que el aguacate es fuente importante de energía y vitaminas (Araújo *et al.*, 2018). México es el principal productor y exportador de aguacate con una producción de más de 2.3 millones de toneladas, seguido de República Dominicana, Perú e Indonesia (FAOSTAT, 2020). A nivel nacional, Michoacán aporta más del 70 % de la producción, destacando los municipios de Ario de Rosales, Salvador Escalante, Tacámbaro y Tancítaro, por el volumen producido (SIAP, 2019). De acuerdo con el Servicio de Información Alimentaria y Pesquera en el municipio de Zitácuaro



being an important source of energy and vitamins (Araújo *et al.*, 2018). Mexico is the main avocado producer and exporter, with a production of over 2.3 million t, followed by the Dominican Republic, Peru and Indonesia (FAOSTAT, 2020). Nationwide, Michoacán provides over 70% of the production, particularly in the municipalities of Ario de Rosales, Salvador Escalante, Tacámbaro and Tancítaro, due to the volume produced (SIAP, 2019). According to the Food and Fishing Information Service in the municipality of Zitácuaro, the avocado production has increased, since in 2010 it reached 10,027 t and 12,509 t in 2019, which represents an increase of 19.8%.

One of the most devastating diseases on avocado in the world due to its frequency, severity and economic losses is root rot or wilt (Coffey, 1992; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). In Mexico, this disease affects all the varieties and is responsible for the deaths of trees in the main avocado-producing areas, covering 5% of the total surface of the crop in Michoacán (Téliz, 2000). Root rot causes necrosis in feeder roots, chlorosis, defoliation and dieback, which reduces yield and leads to the death of trees (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). The disease is more severe and develops faster in heavy soils, with poor drainage and at an average temperature of 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin and Ribeiro 1996). Phytopathogenic fungi such as *Calonectria ilicicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma*, *Rosellinia necatrix*, and others have been associated to this disease (Ruano-Rosa and López-Herrera, 2009; Dann *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2012; Olalde-Lira *et al.*, 2020). Recently, in the Canary Islands, the species *P. cinnamomi*, *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora* and *Phytophthora vexans* have been identified as the cause of rot in avocado (Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). In Michoacán, *Pythium* sp. *amazonianum* and

la producción de aguacate ha ido en aumento, ya que en 2010 alcanzó 10,027 t y en 2019 12,509 t, lo que representó un incremento del 19.8%.

Una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de aguacate a nivel mundial debido a su frecuencia, severidad y pérdidas económicas, es la pudrición de raíz o marchitez (Coffey, 1992; Ramírez-Gil *et al.*, 2014). En México, esta enfermedad afecta a todas las variedades y es responsable del aumento de la mortalidad de los árboles en las principales zonas de producción de aguacate, encontrándose en el 5 % de la superficie total del cultivo en Michoacán (Téliz, 2000). La pudrición de raíz, ocasiona necrosis en las raíces alimentadoras, clorosis, defoliación y muerte descendente, lo que reduce el rendimiento y la muerte de los árboles (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). La enfermedad es más severa y se desarrolla rápidamente en suelos pesados, con poco drenaje y a una temperatura promedio de 24 °C (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996). Hongos fitopatógenos como *Calonectria ilicicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* y *Rosellinia necatrix*, entre otros, se han asociado a esta enfermedad (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009; Dann *et al.*, 2012; Vitale *et al.*, 2012; Olalde-Lira *et al.*, 2020). Recientemente, en las islas Canarias se identificaron las especies *P. cinnamomi*, *P. citricola* sensu lato, *P. nicotianae*, *P. niederhauserii*, *P. palmivora* y *Phytophthora vexans*, ocasionando pudrición de raíz en aguacate (Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En Michoacán, se reportó a *Pythium* sp. *amazonianum* y a *P. vexans* asociados a marchitez y a pudrición de raíz (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, *P. cinnamomi* es el patógeno más frecuentemente asociado a la pudrición de raíz de aguacate, el cual generalmente, infecta raíces finas y alimentadoras por medio de zoosporas móviles (O’Gara *et al.*, 2015; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). En el

*P. vexans* were reported as related to wilt and root rot (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). However, *P. cinnamomi* is the pathogen most frequently associated to root rot in avocado, and it generally infects fine and feeder roots using mobile zoospores (O’Gara *et al.*, 2015; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018). In the genus *Phytophthora*, it is easier to identify the species *P. cinnamomi* due to its particular morphological characteristics. In a V8 medium, it develops cotton-like cultures with a prominent cenocytic mycelium, with resistant hyphae with swellings (coraloid), chlamydospores, ovoid and non-papillated sporangia, absent in culture medium. These characteristics are usually enough for its identification (Erwin and Ribeiro, 1996; Robin *et al.*, 2012).

The most commonly used fungicides to control *P. cinnamomi* are metalaxyl-M (Mtx) and potassium phosphite (Fp) (Ramírez-Gil *et al.*, 2017). Since Mtx was introduced in the market in 1977, it is known to affect the polymerase I complex, inhibiting rRNA synthesis, affecting the growth of hyphae and the formation of haustoria and spores (Müller and Ulrich, 2012). In 1984, Darvas and Becker reported that after constant applications of Mtx on soils, it becomes difficult to control root rot in young avocado plants, suggesting a loss of sensitivity. Studies show that species such as *P. cryptogea*, *P. nicotianae* are insensitive or have an intermediate sensitivity to mefenoxam at concentrations of 1 or 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i. a. (Hwang and Benson, 2005). However, when testing for sensitivity to Mtx in *P. cinnamomi* populations isolated from avocado in California, EC50 value were obtained between 0.023 and 0.138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., confirming the sensitivity of the isolates to the fungicide (Belisle *et al.*, 2019a).

Potassium phosphite has a complex action mechanism. It is known to have a direct fungistatic effect that reduces the growth and sporulation of

género *Phytophthora*, la identificación de la especie *P. cinnamomi* se facilita por sus características morfológicas particulares; en medio V8 desarrolla colonias algodonosas con micelio cenocítico prominente, con hifas resistentes e hinchamientos (coraloide), clamidosporas, esporangios ovoides y elipsoides no papilados ausentes en medio de cultivo, usualmente estos caracteres son suficientes para su identificación (Erwin y Ribeiro, 1996; Robin *et al.*, 2012).

Los fungicidas más utilizados para el control de *P. cinnamomi* son metalaxil-M (Mtx) y fosfito de potasio (Fp) (Ramírez-Gil *et al.*, 2017). Desde 1977, el Mtx fue introducido al mercado, se sabe que afecta el complejo polimerasa I, inhibiendo la síntesis de la ARNr, además afecta el crecimiento de las hifas y la formación de haustorios y esporas (Müller y Ulrich, 2012). En 1984, Darvas y Becker reportaron que después de constantes aplicaciones de Mtx a los suelos, es difícil controlar la pudrición de raíz en plantas de aguacate jóvenes, sugiriendo una pérdida de sensibilidad. Estudios demuestran que especies como *P. cryptogea*, *P. nicotianae* son insensibles o de insensibilidad intermedia a mefenoxam a concentraciones de 1 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i. a. (Hwang y Benson, 2005). Sin embargo, en pruebas de sensibilidad a Mtx de poblaciones de *P. cinnamomi* aisladas de aguacate en California, se obtuvieron valores de CE50 de 0.023 a 0.138  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., confirmando la sensibilidad de los aislados al fungicida (Belisle *et al.*, 2019a).

El fosfito de potasio tiene un mecanismo de acción complejo, se sabe que tiene efecto fungistático directo, que reduce el crecimiento y esporulación del patógeno, permitiendo al hospedante que su sistema de defensa tenga más tiempo para matar al organismo invasor (Guest y Grant, 1991; Dann y MacLeod, 2021). Estudios con *Phytophthora* spp. confirman la variación inter e intraespecífica en la tolerancia a Fp, además de la promoción del

the pathogen, allowing the defense system of the host to have more time to kill the invasive organism (Guest and Grant, 1991; Dann and MacLeod, 2021). Studies with *Phytophthora* spp. confirm the inter- and intraspecific variation in the tolerance to Fp, as well as the promotion of the mycelial growth on isolates exposed to low concentrations (Hunter *et al.*, 2018). In Australia, *P. cinnamomi* populations displayed variations in sensitivity to Fp, with CE50 values ranging between 4 and 148  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a., (Wilkinson *et al.*, 2001). Recently, in California, in *P. cinnamomi* populations of lineage A2, genetically different isolates were found, which are less sensitive to potassium phosphite and have high virulence (Belisle *et al.*, 2019b). Linde *et al.* (1999) suggest that *P. cinnamomi* isolates with a higher growth rate may be more virulent, and other investigations have concluded that some isolates, less sensitive to potassium phosphite, are also more virulent (Belisle *et al.*, 2019b).

The surface planted with avocado in the municipality of Zitácuaro, Michoacán, has increased in recent years, given the agroclimatic conditions that are adequate for its development. However, root rot is also present in commercial orchards and there are currently no studies on the etiology of the disease in this production region. Therefore, the aim of this study was to phenotypically characterize isolates obtained from avocado tree roots in Zitácuaro, Michoacán and evaluate their sensitivity to fungicides.

## MATERIALS AND METHODS

**Characteristics of the orchards.** In November of 2019, five avocado orchards, located in the municipality of Zitácuaro, Michoacán, were sampled. All orchards are located in a A(C)(w<sub>1</sub>)(w) semi-warm subhumid climate with abundant

crecimiento del micelio de los aislados expuestos a bajas concentraciones (Hunter *et al.*, 2018). En Australia, poblaciones de *P. cinnamomi* presentaron variación en la sensibilidad a Fp, con valores de CE50 que oscilan entre 4 a 148  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a., (Wilkinson *et al.*, 2001). Recientemente en California se detectaron en poblaciones de *P. cinnamomi* del linaje A2, aislados genéticamente distintos, los cuales son menos sensibles a fosfito de potasio y con alta virulencia (Belisle *et al.*, 2019b). Linde *et al.* (1999) sugieren que aislados de *P. cinnamomi* con una mayor tasa de crecimiento pueden ser más virulentos, además otras investigaciones han concluido que algunos aislados menos sensibles a fosfito de potasio también son más virulentos (Belisle *et al.*, 2019b).

La superficie cultivada con aguacate en el municipio de Zitácuaro, Michoacán ha ido en aumento en los últimos años, dadas las condiciones agroclimáticas dominantes que resultan aptas para su desarrollo; sin embargo, la pudrición de raíz en huertos comerciales de aguacate también está presente y no se tienen a la fecha estudios sobre la etiología de la enfermedad en esta región productora. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípicamente aislados obtenidos de raíces de aguacate en Zitácuaro, Michoacán y evaluar la sensibilidad a fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Características de las huertas.** En noviembre del 2019, se muestrearon cinco huertas de aguacate ubicadas en el municipio de Zitácuaro, Michoacán. Todas las huertas se encuentran en un clima A(C)(w<sub>1</sub>)(w), semicálido subhúmedo con abundantes lluvias en verano, lluvia invernal menor a 5 %, humedad intermedia, de acuerdo con el sistema climático Köppen modificado por García (1981) y

rainsfall in the summer, winter rains below 5%, intermediate humidity, according to the Köppen climate system, modified by García (1981), and the established variety is ‘Hass’; in addition, they have heavy, clay-rich soils. Other characteristics of the orchards are indicated in Table 1.

**Collection of samples and isolation.** Root and soil samples were collected from the rhizosphere, one sample per tree and five trees per orchard, with symptoms of yellowing, defoliation and dieback. The samples were placed in labelled plastic bags in a cooler and transported to the Plant Pathology Laboratory of the Institute of Farming and Forestry Research (Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - IIAF), of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). In order to obtain a greater percentage of isolates from roots, the protocols by Erwin and Ribeiro (1996) and Rodríguez-Padrón *et al.* (2018) were modified. Lateral, partially necrotized roots were selected, washed with tap water and dried using sterilized paper towels. Approximately 2 cm cuts were made, with one healthy part and one necrotized part, placed in inclusion *cassettes*, which were submerged in commercial chlorine bleach at 2% (v/v) for 45 s and rinsed with sterile distilled water three times. The excess water was removed from the tissue cuts using sterilized paper towels and placed in Petri dishes with

tienen establecida la variedad ‘Hass’, además tienen suelos pesados, ricos en arcilla. Otras características de las huertas se indican en el Cuadro 1.

**Colecta de muestras y aislamiento.** Se colectaron muestras de raíces y suelo de la rizósfera, una muestra por árbol y cinco árboles por huerta, con síntomas de amarillamiento, defoliación y muerte descendente. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas en una hielera y se transportaron al laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de aislados a partir de raíces, se modificaron los protocolos de Erwin y Ribeiro (1996) y Rodríguez-Padrón *et al.* (2018). Se seleccionaron raíces laterales parcialmente necrosadas, se lavaron con agua corriente y se secaron con toallas de papel estériles. Cortes de tejido de aproximadamente 2 cm, con una parte sana y una necrosada se colocaron en *cassettes* de inclusión, los cuales se sumergieron en cloro comercial al 2% (v/v) durante 45 s y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Se retiró el exceso de agua de los cortes de tejido con toallas de papel, estériles y se colocaron en cajas Petri con medio selectivo NARPH-V8 (Natamicina 0.02 g L<sup>-1</sup>, PCNB (Pentacloronitrobenceno) 0.10 g L<sup>-1</sup>, Ampicilina 0.27 g L<sup>-1</sup>, Rifampicina 0.01 g L<sup>-1</sup>, Himexazol 0.075 g L<sup>-1</sup>).

**Table 1. Characteristics of the avocado root-collecting sites in Zitácuaro Michoacán.**  
**Cuadro 1. Características de los sitios de colecta de raíces de aguacate en Zitácuaro Michoacán.**

| Huerta       | Localidad   | Altura<br>msnm | Latitud       | Longitud       | Humedad  | Total de<br>muestras |
|--------------|-------------|----------------|---------------|----------------|----------|----------------------|
| Benedicto    | San Felipe  | 1890           | 19° 49' 00" N | 100° 37' 41" W | Temporal | 5                    |
| Los llanos   | San Felipe  | 1890           | 19° 49' 08" N | 100° 37' 52" W | Temporal | 5                    |
| Los llanos 2 | Macutzio    | 1900           | 19° 49' 17" N | 100° 35' 50" W | Riego    | 5                    |
| El Martín    | Carpinteros | 2176           | 19° 49' 05" N | 100° 31' 58" W | Temporal | 5                    |
| El dorado    | La soledad  | 2266           | 19° 46' 80" N | 100° 29' 50" W | Riego    | 5                    |

a NARPH-V8 (Natamycin 0.02 g L<sup>-1</sup>, PCNB (Pentachloronitrobenzene) 0.10 g L<sup>-1</sup>, Ampicillin 0.27 g L<sup>-1</sup>, Rifampicin 0.01 g L<sup>-1</sup>, Hymexazol 0.075 g L<sup>-1</sup>) selective medium. The dishes were incubated at 25 °C in the dark for 24 to 48 h, until the growth of cenocytic mycelium and with the characteristic *P. cinnamomi* swellings were observed. The cultures were purified by the successive cultivation of hyphal tips on corn meal agar (HMA, Fluka®) culture medium.

**Compatibility type.** The compatibility of the isolates obtained was determined using the reference *P. cinnamomi* isolate A1 (camellia isolate) and A2 (avocado isolate) which were donated by the University of California, Riverside to the Plant Pathology Laboratory (IIAF). In a Petri dish containing scV8 agar medium (900 mL distilled water, 100 mL Campbell's V8 juice, 1 g CaCO<sub>3</sub>), a mycelium disc of the isolate with compatibility type A1 was placed, and in another dish, the type A2. Likewise, in each dish, a mycelium disc of the isolate of interest was placed, approximately one centimeter away. The dishes were incubated at 25 °C in the dark for 10 days. The isolates that formed oospores were assigned the complementary compatibility type in the cross.

**Morphological characterization.** The pure cultures were cultivated on HMA medium and cV8 agar medium (10 g of CaCO<sub>3</sub>, 1 L of V8 juice, centrifuged at 4,000 rpm for 20 min) (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). The shape of the culture was characterized, along with the appearance of the mycelium. For the production of sporangia, the protocol by Hwang *et al.* (1975) was modified. Three 5 mm mycelium discs from each isolate were plated in triplicate in Petri dishes measuring 60 x 15 mm with 10 mL of V8 agar medium over a sheet of transparent cellophane and exposed to light for

Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad de 24 a 48 h, hasta que se observó el crecimiento de micelio cenocítico y con hinchamientos característico de *P. cinnamomi*. Las colonias se purificaron por cultivo sucesivo de punta de hifa en medio de cultivo harina de maíz agar (HMA, Fluka®).

**Tipo de compatibilidad.** La compatibilidad de los aislados obtenidos se determinó usando los aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 (aislado de camelia) y A2 (aislado de aguacate) que fueron donados por la Universidad de California de Riverside al Laboratorio de Patología Vegetal (IIAF). En una caja Petri con medio scV8 agar (900 mL de agua destilada, 100 mL de jugo V8 Campbell's, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se colocó un disco de micelio de un aislado con tipo de compatibilidad A1 y en otra caja el tipo A2. Asimismo, en cada una de las cajas se colocó un disco de micelio del aislado de interés aproximadamente a un centímetro de distancia. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 10 días. A los aislados que formaron oosporas se les asignó el tipo de compatibilidad complementario en la cruce.

**Caracterización morfológica.** Los cultivos puros se cultivaron en medio HMA y medio cV8 agar (10 g de CaCO<sub>3</sub>, 1 L de jugo V8, centrifugado a 4,000 rpm por 20 min) (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). Se caracterizó la forma de la colonia y la apariencia del micelio. Para la producción de esporangios se modificó el protocolo de Hwang *et al.* (1975); tres discos de micelio de 5 mm de cada aislado se cultivaron por triplicado en cajas Petri 60 x 15 mm con 10 mL de medio scV8 agar, sobre papel celofán transparente y expuestos a luz por 24 h. El papel celofán con el micelio se transfirió a una caja Petri, se le agregaron 10 mL de medio líquido scV8 (900 mL de agua destilada, 100 mL jugo-V8, 1 g CaCO<sub>3</sub>), se incubaron durante 24 h a 18 °C en os-

24 h. The cellophane paper with the mycelium was transferred to new Petri dishes, 10 mL of liquid scV8 medium (900 mL of distilled water, 100 mL of V8 juice, 1 g  $\text{CaCO}_3$ ), were added and incubated for 24 h at 18 °C in the dark. The liquid medium was then poured out, they were rinsed three times and were flooded with a salt solution, following the protocol by Chen and Zentmyer, (1970) (1.64 g of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.05 g of  $\text{KNO}_3$  and 0.48 g of  $\text{MgSO}_4$  were dissolved in one liter of distilled water and the solution was sterilized for 20 min at a pressure of 15 lb). They were then exposed to white light at 25 °C every 24 h, rinsed three times with the salt solution for two consecutive days and the reproductive structures observed were registered (Erwin and Ribeiro, 1996; Abad *et al.*, 2019).

**Pathogenicity tests.** To perform the pathogenicity tests, four isolates were chosen to be inoculated on avocado fruits with physiological maturity; they were washed with soap and tap water and sprayed with alcohol at 75% to disinfect them. Two mycelium discs, 6 mm in diameter, from isolates ZITR-1-3, ZITR-2-5, ZITR-3-4 and ZITR-5-3, four days old and grown on HMA, were placed on the sides of the fruits; the discs were then covered in Janel™ brand masking tape. Three fruits were used for every isolate, and after inoculation, they were placed in a moist chamber and incubated at 25 °C. As controls, three fruits were inoculated with HMA discs.

**Sensitivity to fungicides.** The sensitivity of 15 isolates to potassium phosphite (Fp) (Nutriphite plus magnum 40% Gowan®) were evaluated, at final concentrations of 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 and 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a. and metalaxyl-M (Mtx) (Ridomil Gold® 480SL) 0, 0.5, 1, 3 and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a. A completely randomized experimental design was used with a factorial arrangement with three

curidad, se decantó el medio líquido, se enjuagaron tres veces y se inundaron con una solución de sales de acuerdo con el protocolo de Chen y Zentmyer, (1970) (se disolvieron en un litro de agua destilada: 1.64 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.05 g de  $\text{KNO}_3$  y 0.48 g de  $\text{MgSO}_4$ , la solución se esterilizó 20 min a 15 lb de presión); a continuación se expusieron a luz blanca a 25 °C, cada 24 h, se enjuagaron tres veces con la solución salina, por dos días consecutivos y se registraron las estructuras reproductivas observadas (Erwin y Ribeiro, 1996; Abad *et al.*, 2019).

**Pruebas de patogenicidad.** Para realizar las pruebas de patogenicidad se seleccionaron cuatro aislados que se inocularon en frutos de aguacate con madurez fisiológica, se lavaron con jabón y agua corriente y se asperjaron con alcohol al 75% para desinfectarlos. Dos discos de micelio de 6 mm de diámetro de los aislados ZITR-1-3, ZITR-2-5, ZITR-3-4 y ZITR-5-3, de cuatro días de crecimiento desarrollados en medio harina de maíz, se colocaron en los costados de los frutos, los discos se cubrieron con cinta masking tape Janel™, se usaron tres frutos por aislado, una vez inoculados se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 25 °C. Como testigos tres frutos fueron inoculados con discos de medio harina de maíz.

**Sensibilidad a fungicidas.** Se evaluó la sensibilidad de 15 aislados a fosfito de potasio (Fp) (Nutriphite plus magnum 40 % Gowan®) a concentraciones finales de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 300 y 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. y a metalaxil-M (Mtx) (Ridomil Gold® 480SL) 0, 0.5, 1, 3 y 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, con tres réplicas. La concentración efectiva a la cual se inhibió el 50% del crecimiento micelial (valor de  $\text{CE}_{50}$ ) se calculó utilizando el método tradicional de dilución en agar (Gray *et al.*, 2018). El fungicida se agregó en medio cV8-A al

replications. The effective concentration at which 50% of the mycelial growth was inhibited (value of  $EC_{50}$ ) was calculated using the traditional method of dilution in agar (Gray *et al.*, 2018). The fungicide was added to the cV8-A medium at 10% to obtain the final concentrations. Discs measuring 6 mm with the mycelium from the four-day-old isolates cultivated on HMA were placed in the center of the Petri dishes containing the different concentrations. After three days of incubation in the dark at 22 °C, the growth of the culture was measured in two perpendicular directions, the measurement of the inoculum disc was subtracted and the average was obtained. The growth was calculated by dividing the diameter of the culture in the Petri dishes with fungicide by the average growth of the control dishes and it was expressed as a percentage (Hu *et al.*, 2010).

**Effect of the temperature and culture medium on the growth of the mycelium.** Six isolates were selected, based on the percentage of inhibition to Fp, along with three isolates with low percentage of inhibition and three with high percentage of inhibition (an A [high] and a B [low] were added at the end of the identification code of each isolate used in this test), to determine whether there was or was not a relationship between the velocity of growth and sensitivity. Growth rate (mm per day) was determined at 22 and 25 °C in the cV8 agar and HMA media, following the methodology described by Belisle *et al.* (2019b). Agar discs, 7 mm in diameter, were cut from the edge of the 4-day-old cultures plated on HMA medium, transferred to the dishes with the corresponding media and incubated in the dark for four days at both temperatures. The diameter of the culture was measured every day.

To calculate the values of the  $EC_{50}$ , the average percentage of inhibition of both repetitions was estimated for each concentration of the fungicides

10% para obtener las concentraciones finales. Discos de 6 mm de micelio de los aislados de cuatro días de crecimiento cultivados en HMA, se colocaron en el centro de las cajas Petri que contenían las diferentes concentraciones. Después de tres días de incubación en oscuridad a 22 °C, se midió el crecimiento de la colonia en dos direcciones perpendiculares, se restó la medida del disco de inóculo y se obtuvo el promedio. El crecimiento se calculó dividiendo el diámetro de la colonia en las cajas Petri con fungicida, entre el promedio de crecimiento de las cajas testigo y se expresó como porcentaje (Hu *et al.*, 2010).

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Se seleccionaron seis aislados con base en el porcentaje de inhibición a Fp; tres aislados con bajo porcentaje de inhibición y tres con alto porcentaje de inhibición (se agregó una A (alto) y una B (bajo) al final del código de identificación de cada aislado usado en esta prueba), para determinar si existía o no una relación entre velocidad de crecimiento y sensibilidad. La tasa de crecimiento (mm por día) se determinó a 22 y 25 °C en los medios de cV8 agar y HMA, siguiendo la metodología descrita por Belisle *et al.* (2019b). Se cortaron discos de agar de 7 mm de diámetro del margen de las colonias de 4 días desarrolladas en medio HMA, se transfirieron a las cajas con los medios correspondientes y se incubaron en la oscuridad durante cuatro días a las dos temperaturas. El diámetro de la colonia se midió diariamente.

Para calcular los valores de la  $CE_{50}$  se estimó el porcentaje promedio de inhibición de las dos repeticiones para cada concentración de los fungicidas en función del porcentaje observado en el grupo testigo, utilizando la siguiente fórmula  $ICR (\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , donde ICR es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, CRT es el crecimiento radial del testigo y CRF es el crecimiento

based on the percentage observed in the control group, using the formula  $ICR (\%) = (CRT - CRF) / CRT \times 100$ , where ICR is the percentage of inhibition of the radial growth, CRT is the radial growth of the control, and CRF is the radial growth in each of the concentrations. To obtain the  $EC_{50}$ , the natural logarithm of each of the studied concentrations was included and a probit analysis was carried out for each isolate related to 50% of its inhibition (Adaskaveg *et al.*, 2015). The experiments were carried out in duplicate.

To determine the effect of the temperature and of the medium on the isolate, the final growth was taken into consideration; the average was obtained and with these values, an analysis of variance and a multiple comparison of averages were carried out (Tukey, 0.05) for a 2x2 factorial experiment. Using the information on the final growth, interaction graphs were created to observe the effect of the factor over the variable. The analyses were carried out and graphs created using R version 4.0.1 (2020-06-06).

**Molecular characterization.** Isolates ZITR-1-3 and ZITR-5-3 were grown in a green bean medium (green bean and zucchini baby food: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g and water 646 mL) for five days. The mycelium was collected, dehydrated at 39 °C for 24 h, stored at -20 °C for 24 h, ground, and the genomic DNA extracted following an extraction protocol based on CTAB (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). The DNA was quantified in a spectrophotometer (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) and diluted to obtain a concentration of 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . The DNA was amplified by PCR using oligonucleotides for the region of the internal transcribed spacer (ITS). The reactions contained 6.25  $\mu\text{L}$  of GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 0.0675  $\mu\text{L}$  of each of the oligonucleotides

radial en cada una de las concentraciones. Para obtener la  $CE_{50}$  se incluyó el logaritmo natural de cada una de las concentraciones examinadas; se hizo el análisis probit para cada aislado asociado con el 50% de su inhibición (Adaskaveg *et al.*, 2015). Los experimentos se hicieron por duplicado.

Para determinar el efecto de la temperatura y del medio en los aislados, se tomó en consideración el crecimiento final; se obtuvo el promedio y con estos valores se procedió a realizar un análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, 0.05) para un experimento factorial 2x2. Con la información del promedio de crecimiento final se construyeron gráficos de interacción para observar el efecto del factor sobre la variable. Los análisis y gráficos se realizaron con R versión 4.0.1 (2020-06-06).

**Caracterización molecular.** Los aislados ZITR-1-3 y ZITR-5-3 se crecieron en medio de ejote (papa de ejote y calabacita: Gerber Nestlé®, 339 g, agar 15 g y agua 646 mL) por cinco días. El micelio se colectó, deshidrató a 39 °C durante 24 h, almacenó a -20 °C por 24 h, molió y se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo de extracción con base en CTAB (Fernández-Pavía *et al.*, 2020). El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Varioskan Flash Thermo Scientific NanoDrop 2000®) y diluyó para obtener una concentración de 12 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El ADN se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos para la región del espaciador interno transcrito (ITS). Las reacciones contenían 6.25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 0.0675  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos ITS4 (TCCTCCgCTTATTgATATgC) e ITS6 (gAAGAAggTgAAGTCgTAA-CAAgg) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (30 ng) y agua destilada ultrapura hasta tener un volumen final de 13  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de amplificación se hicieron en las siguientes condiciones:



ITS4 (TCCTCCgCTTATTgATATgC) and ITS6 (gAAgAAggTgAAgTCgTAACAagg) (100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  of genomic DNA (12 ng) and ultrapure distilled water, until a final volume of 13  $\mu\text{L}$  was obtained. The amplification reactions were carried out in the following conditions: an initial denaturalization for 2 min at 94 °C, 35 denaturalization cycles for 1 min at 94 °C, alignment for 1 min at 53 °C, extension for 1 min at 72 °C, and a final extension for 10 min at 72 °C. The products of the PCR were sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea) and the sequences were edited using the programs PreGap and Gap (<http://staden.sourceforge.net>). The consensus sequences obtained were analyzed with the BLAST program, from the NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] to compare with other sequences of oomycetes from this database.

## RESULTS

**Isolates obtained.** Plating was carried out for every root sample out of a total of 25 samples. Fifteen isolates were obtained (Table 2) with morphological characteristics of *P. cinnamomi*, and in the rest of the dishes, bacterial growth was observed, therefore they were discarded.

**Compatibility Type.** The crosses of the isolates with a *P. cinnamomi* strain with compatibility type A1 produced plerotic oospores with amphigynous antheridia. The crosses of the isolates with a strain with compatibility type A2 only produced globose chlamydospores (Figure 1D). The results indicate that the isolates are compatibility type A2.

**Morphological and molecular characterization.** The isolates developed rosaceous shaped cultures with wavy edges, with abundant, cotton-like,

una desnaturalización inicial durante 2 min a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 94 °C, alineación durante 1 min a 53 °C, extensión durante 1 min a 72 °C, y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se secuenciaron (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) y las secuencias fueron editadas usando los programas PreGap y Gap (<http://staden.sourceforge.net>). Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con el programa Blast de NCBI [National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] para comparar con otras secuencias de Oomicetes de esta base de datos.

## RESULTADOS

**Aislados obtenidos.** Se hizo una siembra por cada muestra de raíces de un total de 25 muestras. Se obtuvieron 15 aislados (Cuadro 2) con características morfológicas de *P. cinnamomi*, en el resto de las cajas se observó crecimiento bacteriano, por lo que se descartaron.

**Tipo de compatibilidad.** Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A1 de *P. cinnamomi*, produjeron oosporas pleróticas con anteridios anfíginos. Las cruces de los aislados con una cepa de tipo de compatibilidad A2 solamente produjeron clamidosporas globosas (Figura 1D). Los resultados indican que los aislados corresponden al tipo de compatibilidad A2.

**Caracterización morfológica y molecular.** Los aislados desarrollaron colonias de forma rosácea y bordes ondulados, con micelio abundante, algodonoso, coraloides, hifas cenocíticas con hinchamientos, con clamidosporas globosas, en medio de cultivo HMA, en medio sV8-A las colonias presentaron forma estrellada (Figuras 1F-G). Los aislados produjeron esporangios sin papila, ovoides, elipsoides,

**Table 2. Comparison of averages (Tukey, 0.05) of growth diameter and inhibition (%) of isolates of *P. cinnamomi* collected in Zitácuaro, Michoacán, exposed to potassium phosphite and metalaxil-M.**

**Cuadro 2. Comparación de medias (Tukey, 0.05) de diámetro de crecimiento e inhibición (%) de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro, Michoacán, expuestos a fosfito de potasio y metalaxil-M.**

| Fosfito de potasio (Fp)                    |                     |                    | Metalaxil-M (Mtx)                          |                     |                   |
|--------------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Concentración<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Crecimiento<br>(mm) | Inhibición<br>(%)  | Concentración<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Crecimiento<br>(mm) | Inhibición<br>(%) |
| 0                                          | 16.4 a              | 0.0 a <sup>z</sup> | 0                                          | 17.7 a              | 0 a               |
| 5                                          | 16.5 a              | -0.7 a             | 0.5                                        | 5.0 b               | 72.3 b            |
| 10                                         | 11.2 b              | 31.5 b             | 1                                          | 2.3 c               | 87.1 c            |
| 25                                         | 8.7 c               | 46.8 c             | 3                                          | 0.66 c              | 96.3 d            |
| 50                                         | 3.9 d               | 75.1 d             | 5                                          | 0.46 c              | 97.4 d            |
| 100                                        | 1.0 e               | 93.7 e             |                                            |                     |                   |
| 300                                        | 0.2 e               | 98.6 e             |                                            |                     |                   |
| 600                                        | 0.0 e               | 99.6 e             |                                            |                     |                   |

<sup>z</sup>Means with the same letter are statistically equal. / <sup>z</sup>Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

coraloid mycelia, coenocytic hyphae with swellings, with globose chlamydospores on HMA culture medium, whereas in the sV8-A medium, the cultures were star-shaped (Figures 1F-G). The isolates produced sporangia without papillae, ovoid, ellipsoid, persistent and with internal proliferation in the cultures flooded with a salt solution (Figure 1A-E). The characteristics observed coincide with those reported for *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005; Abad *et al.*, 2019). The analyzed sequences of the ITS region of the isolates selected for molecular identification ZITR-1-3 and ZITR-5-3 coincide with those reported for *P. cinnamomi*.

**Pathogenicity tests.** The tests on the avocado fruits turned out positive. Seventy-two hours after inoculation (hai) dark circular lesions with irregular edges were found on the epidermis. At 96 hai, the

con proliferación interna y persistentes, en los cultivos inundados con una solución de sales (Figura 1A-E). Las características observadas concuerdan con las reportadas para *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005; Abad *et al.*, 2019). Las secuencias analizadas de la región ITS de los aislados seleccionados para la identificación molecular ZITR-1-3 y ZITR-5-3, coinciden con las reportadas para *P. cinnamomi*.

**Pruebas de patogenicidad.** Las pruebas en frutos de aguacate resultaron positivas, a las 72 h posinoculación (hpi) se observaron lesiones oscuras, circulares, con bordes irregulares en la epidermis. A las 96 hpi las lesiones tenían entre 3 y 6 cm de diámetro. Los frutos testigos no presentaron daños y todos los aislados fueron reaislados de los frutos inoculados, demostrándose así la patogenicidad al completarse los postulados de Koch (Figura 1H).



**Figure 1. Morphological characteristics and pathogenicity of *P. cinnamomi*.** A) Coraloid mycelium; B-C) Sporangia without papillae, ovoid-ellipsoid; D) Globose chlamydospores in groups; E) Internal proliferation of sporangia; F) Cotton-like, star-shaped culture, in a cV8A medium; G) Rosaceous-shaped culture in a HM medium; H) Pathogenicity in fruits of the isolates (downwards) ZITR-2-5, ZITR-3-4, ZITR-5-3, ZITR-1-3 and control.

**Figura 1. Características morfológicas y patogenicidad de *P. cinnamomi*.** A) Micelio coraloide; B-C) Esporangios sin papilas ovoides-elipsoides; D) Clamidosporas globosas en grupos; E) Proliferación interna de esporangios; F) Colonia en forma estrellada, algodonosa en medio cV8A; G) Colonia rosácea en medio HM; H) Patogenicidad en frutos de los aislados (de arriba hacia abajo) ZITR-2-5, ZITR-3-4, ZITR-5-3, ZITR-1-3 y testigo.

diameter of the lesions were between 3 and 6 cm. The control fruits displayed no symptoms and all the isolates were reisolated from the inoculated fruits, thus proving the pathogenicity completing Koch's postulates (Figure 1H).

**Sensitivity to fungicides.** The effect of fungicides Fp and Mtx on the growth of the culture and the percentage of inhibition of the isolates between treatments was significant ( $P > 0.001$ ). No fungicide-resistant isolates were found. With Fp, no statistical differences were found between isolates for growth ( $P > 0.63$ ) or for inhibition ( $P > 0.982$ ) of the mycelium, unlike with the different concentrations, in which significance was found. Additionally, something in particular that was observed was the promotion of the growth of eight isolates (ZITR-1-3, ZITR-1-5, ZITR-2-1, ZITR-2-4, ZITR-3-2, ZITR-3-4, ZITR-5-1, ZITR-5-3) by Fp at  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1.15-18.61%) (Figure 2). In the comparison of averages, six groups were formed; no significant difference was found in growth between the control (16.76 mm) and the first concentration (16.02 mm). Growth was mainly inhibited at 100, 300 and  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , with these concentrations it resulted statistically equal, for both growth and for inhibition (Table 2). The values of the effect of Fp on the inhibition of growth ranged between 54.7 and 74.2 % regarding the control, and for the  $EC_{50}$ , between 11.8 and  $37.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a mean of  $24.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  for potassium phosphite. For Mtx, a lower variation was observed between treatments regarding Fp; at concentrations of 3 and  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , the mycelium was mostly inhibited; the percentage of inhibition ranged between 80.4 and 100% and the values of  $EC_{50}$  ranged from 0.08 to  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  with a mean of  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl-M. There was no significance in the growth ( $P > 0.996$ ) or inhibition ( $P > 1.0$ ) of the mycelium among isolates (Table 3).

**Sensibilidad a fungicidas.** El efecto de los fungicidas Fp y Mtx en el crecimiento de la colonia y porcentaje de inhibición de los aislados entre tratamientos resultó significativo ( $P > 0.001$ ). No se detectaron aislados resistentes a los fungicidas. Con Fp no se observaron diferencias estadísticas entre aislados para crecimiento ( $P > 0.63$ ) ni para inhibición ( $P > 0.982$ ) del micelio, caso contrario fue entre las diferentes concentraciones donde si hubo significancia. Además, algo particular que se observó fue la promoción del crecimiento de ocho aislados (ZITR-1-3, ZITR-1-5, ZITR-2-1, ZITR-2-4, ZITR-3-2, ZITR-3-4, ZITR-5-1, ZITR-5-3) por Fp a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1.15-18.61%) (Figura 2). En la comparación de medias se formaron seis grupos, no se observó diferencia significativa de crecimiento entre el control (16.76 mm) y la primera concentración (16.02 mm); el crecimiento fue mayormente inhibido a 100, 300 y  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando estas concentraciones estadísticamente iguales, tanto para crecimiento como para inhibición (Cuadro 2). Los valores del efecto de Fp en la inhibición del crecimiento oscilaron entre 54.7 y 74.2 % con respecto al testigo y para la  $CE_{50}$  entre 11.8 y  $37.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $24.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio. Para Mtx, se observó menor variación entre los tratamientos con respecto a Fp, a concentraciones de 3 y  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  el micelio fue mayormente inhibido, el porcentaje de inhibición osciló entre 80.4 y 100% y los valores de  $CE_{50}$  oscilaron entre 0.08 y  $0.34 \mu\text{g mL}^{-1}$  con una media de  $0.215 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M. Entre los aislados no hubo significancia en el crecimiento ( $P > 0.996$ ) ni en la inhibición ( $P > 1.0$ ) del micelio (Cuadro 3).

**Efecto de la temperatura y medio de cultivo en el crecimiento del micelio.** Los análisis mostraron un efecto significativo ( $P > 0.001$ ) en la tasa de crecimiento del micelio a las dos temperaturas y en los dos medios nutritivos y sus interacciones; en la

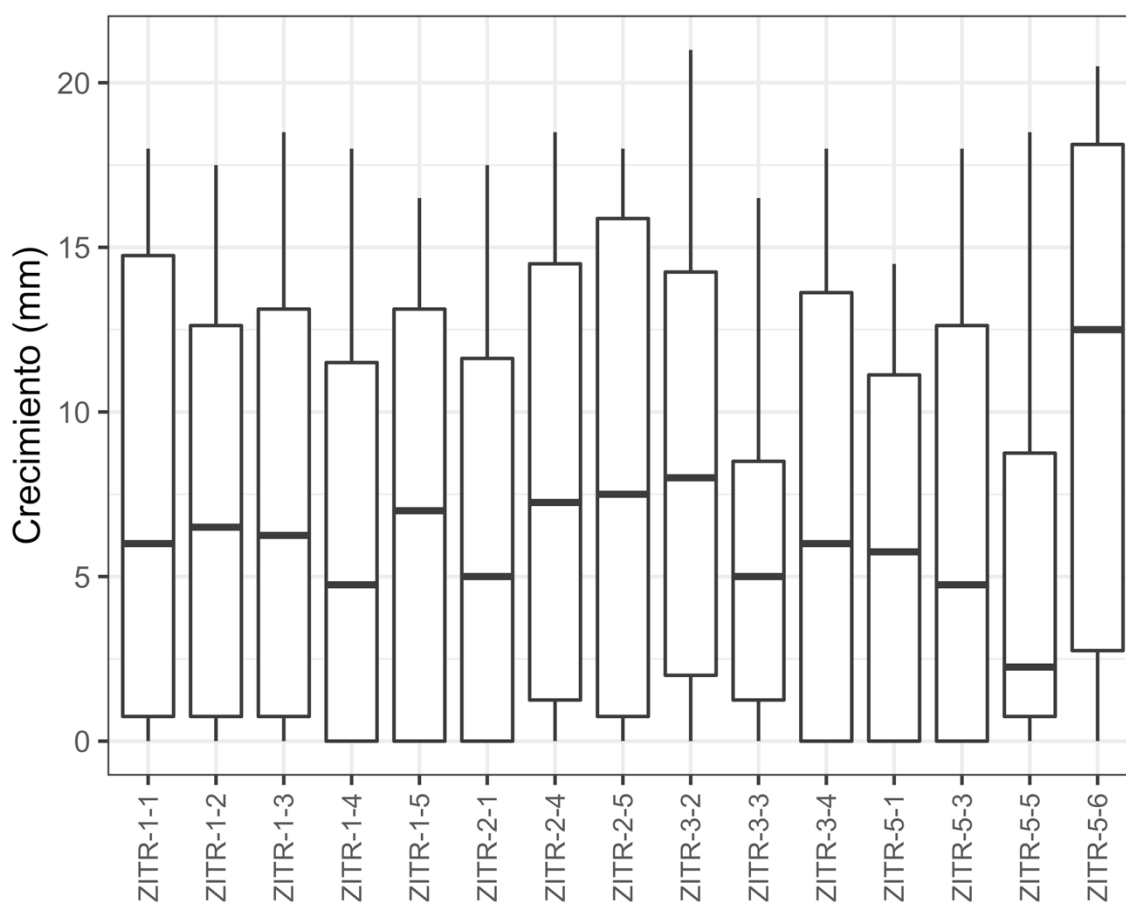


Figure 2. Inhibition of the mycelial growth of *P. cinnamomi* isolates collected in Zitácuaro, Michoacán against potassium phosphite.

Figura 2. Inhibición del crecimiento micelial de aislados de *P. cinnamomi* colectados en Zitácuaro, Michoacán ante fosfito de potasio.

### Effect of the temperature and culture medium on the growth of the mycelium.

The analyses displayed a significant ( $P > 0.001$ ) effect on the mycelium growth rate at both temperatures, in both nutrient media and their interactions. In the test for the comparison of means, six groups were formed and the isolates with the greatest inhibition (%) to Fp presented a greater growth speed than those with the lowest inhibition. However, isolate ZITRA-3-3, with the highest inhibition (%) displayed the lowest

prueba de comparación de medias se formaron seis grupos, los aislados con mayor inhibición (%) a Fp presentaron una mayor velocidad de crecimiento que los de menor inhibición; sin embargo, en el aislado ZITRA-3-3 con mayor inhibición (%) se observó la menor tasa de crecimiento (11.25 mm) y ZITRB-1-5 con menor inhibición (%) una mayor (21.75 mm), aunque éste último también presentó mayor variación en los datos (Figura 3). El crecimiento de los aislados ZITRA-1-4, ZITRA-5-5, ZI-

**Table 3. Compatibility type, EC<sub>50</sub> and inhibition (%) to potassium phosphite and metalaxyl-M of *P. cinnamomi* isolates collected in the municipality of Zitácuaro, Michoacán.**  
**Cuadro 3. Tipo de compatibilidad, CE<sub>50</sub> e inhibición (%) a fosfito de potasio y a metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* colectados en el municipio de Zitácuaro, Michoacán.**

| Aislados | Tipo de compatibilidad | % de inhibición (Fp) | CE <sub>50</sub> (Fp) (µg mL <sup>-1</sup> ) | % de inhibición (Mtx) | CE <sub>50</sub> (Mtx) (µg mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------------|----------------------|----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| ZITR-1-1 | A2                     | 63.3                 | 24.5                                         | 88.7                  | 0.18                                          |
| ZITR-1-2 | A2                     | 65.3                 | 21.6                                         | 90.7                  | 0.15                                          |
| ZITR-1-3 | A2                     | 62.3                 | 37.7                                         | 87.7                  | 0.26                                          |
| ZITR-1-4 | A2                     | 71.1                 | 15.7                                         | 87.8                  | 0.20                                          |
| ZITR-1-5 | A2                     | 60.8                 | 26.4                                         | 88.3                  | 0.15                                          |
| ZITR-2-1 | A2                     | 63.2                 | 21.8                                         | 83.3                  | 0.35                                          |
| ZITR-2-4 | A2                     | 56.5                 | 31.6                                         | 85.8                  | 0.17                                          |
| ZITR-2-5 | A2                     | 61.4                 | 26.9                                         | 88.2                  | 0.25                                          |
| ZITR-3-2 | A2                     | 54.7                 | 34.7                                         | 83.9                  | 0.34                                          |
| ZITR-3-3 | A2                     | 72.7                 | 11.8                                         | 100.0                 | -----                                         |
| ZITR-3-4 | A2                     | 63.2                 | 23.8                                         | 80.4                  | 0.22                                          |
| ZITR-5-1 | A2                     | 63.3                 | 24.0                                         | 88.2                  | 0.26                                          |
| ZITR-5-3 | A2                     | 66.8                 | 18.7                                         | 93.3                  | 0.24                                          |
| ZITR-5-5 | A2                     | 74.2                 | 12.4                                         | 87.1                  | 0.08                                          |
| ZITR-5-6 | A2                     | 55.0                 | 37.7                                         | 90.2                  | 0.17                                          |

growth rate (11.25 mm) and ZITRB-1-5, with the lowest inhibition (%), presented a higher one (21.75 mm), although the latter also displayed a greater variation in data (Figure 3). The growth of isolates ZITRA-1-4, ZITRA-5-5, ZITRB-3-4 and ZITRB-2-4 fluctuated between 18.66 and 15.91 mm. A higher growth rate was observed in cultures at 25 °C and in the cV8-A culture medium, with the exception of isolate ZITRB-1-5, which displayed a higher growth rate at 22 °C (Figure 4). The morphology of the culture varied according to the culture medium. In the isolates in cV8-A, they displayed star-shaped cultures, and in HMA, rosaceous-shaped cultures.

## DISCUSSION

This is the first study on *P. cinnamomi* isolates related to wilt in avocado in eastern Michoacán, in the municipality of Zitácuaro. Other studies

TRB-3-4 y ZITRB-2-4 osciló entre 18.66 y 15.91 mm. Se observó una tasa de crecimiento mayor de las colonias a 25 °C y en medio de cultivo cV8-A, a excepción del aislado ZITRB-1-5, que presentó mayor crecimiento a 22 °C (Figura 4). La morfología de la colonia varió de acuerdo con medio de cultivo, los aislados en cV8-A, presentaron colonias de forma estrellada y en HMA de forma rosácea.

## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de aislados de *P. cinnamomi* asociados con la marchitez del aguacate en la región oriente de Michoacán, que incluye el municipio de Zitácuaro. Otros estudios sobre esta enfermedad han reportado la presencia de *P. cinnamomi* en otras áreas del estado (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). La superficie cultivada de aguacate en

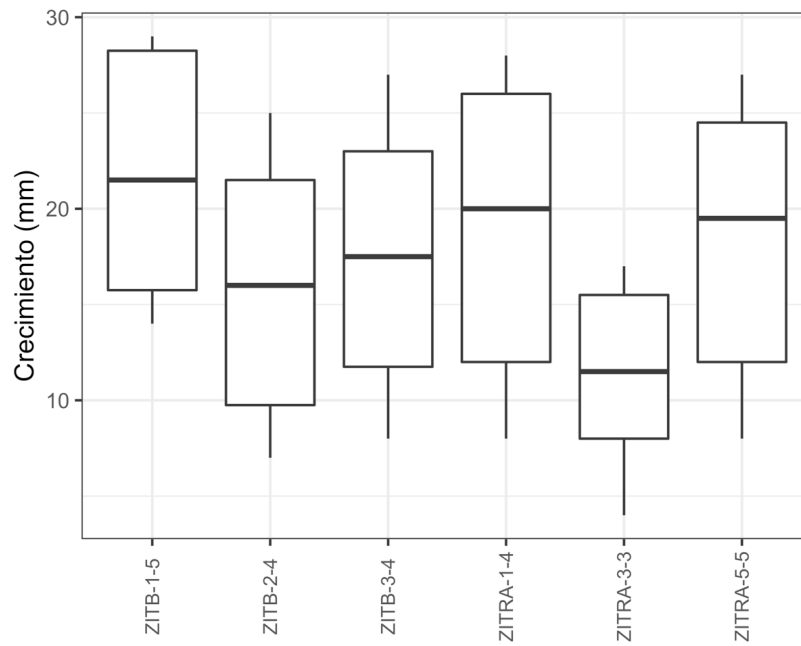


Figure 3. Effect of the temperature and culture medium on the mycelial growth of six *P. cinnamomi* isolates obtained from avocado roots with rotting.

Figura 3. Efecto de temperatura y medio de cultivo en el crecimiento micelial de seis aislados de *P. cinnamomi* obtenidos de raíces de aguacate con pudrición.

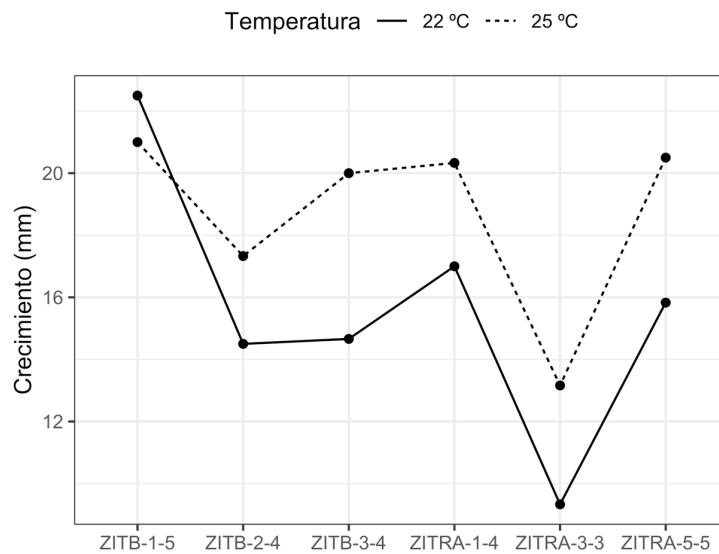


Figure 4. Effect of 22 and 25 °C temperatures on six *P. cinnamomi* isolates from avocado roots with rotting.

Figura 4. Efecto de las temperaturas 22 y 25 °C en seis aislados de *P. cinnamomi* aislados de raíces de aguacate con pudrición.

on this disease have reported the presence of *P. cinnamomi* in other areas of the state (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2018; Hernández-Pérez *et al.*, 2019). The surface with avocado plantations in Zitácuaro has increased in recent years and could potentially be an important production area in the future. However, the presence of the pathogen *P. cinnamomi* represents a threat to the crop. This area displays certain agroclimatic characteristics, such as the presence of Acrisol soils, which promote the development of this disease (Zentmyer, 1980; Guillén-Andrade *et al.*, 2007). The sampled trees were adults, established in orchards with high contents of clay and poor drainage, which contributed to the presence of the disease (Zentmyer, 1980; Erwin and Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Although in this study only isolates with morphological characteristics of *P. cinnamomi* in trees with root rot were recovered, the presence of other oomycetes is not discarded.

All isolates corresponded to compatibility type A2, which indicates that the oomycete is reproducing asexually. Despite Ochoa-Fuentes *et al.* (2005) reporting both compatibility types with molecular markers in Michoacán, they did not prove it with crosses, as performed in this study, which is considered the most accurate way to determine them. The morphological characteristics observed in the isolates coincide with those described for *P. cinnamomi* according to Abad *et al.* (2019). This identity was verified with the amplification of the ITS region in selected isolates and the pathogenicity was proven on avocado fruits. *P. cinnamomi* is one of the 10 main phytopathogenic oomycetes, it infects over 5000 species (Hardham, 2005) and its pathogenicity has been proven (Linde *et al.*, 1999; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018; Belisle *et al.*, 2019b).

For many years, phosphites have been used to control root rot. Avocado producers use potassium phosphite more frequently than metalaxyl-M, due

Zitácuaro se ha incrementado en los últimos años y potencialmente podría ser un área importante de producción en el futuro; sin embargo, la presencia del patógeno *P. cinnamomi* representa una amenaza para el cultivo. Esta zona presenta ciertas características agroclimáticas, como es la presencia de suelos de tipo Acrisol, que favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Zentmyer, 1980; Guillén-Andrade *et al.*, 2007). Los árboles muestreados fueron adultos, establecidos en huertos con suelos con alto contenido de arcilla y poco drenaje, factores que contribuyeron a la presencia de la enfermedad (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro 1996; Hardham, 2005). Aun cuando en este trabajo se recuperaron solamente aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi* en árboles con pudrición de raíces, no se descarta la presencia de otros oomicetes.

Todos los aislados correspondieron al tipo de compatibilidad A2, lo que es indicativo de que el oomiceto se está reproduciendo de manera asexual. Aunque en Michoacán, Ochoa-Fuentes *et al.* (2005) reportaron los dos tipos de compatibilidad mediante marcadores moleculares, no lo demostraron mediante cruces, como se hizo en el presente estudio, que se considera la forma más precisa para determinarlos. Las características morfológicas observadas en los aislados concuerdan con las descritas para *P. cinnamomi* de acuerdo a Abad *et al.* (2019), identidad que se corroboró, con la amplificación de la región ITS en aislados seleccionados y cuya patogenicidad se demostró en frutos de aguacate. *P. cinnamomi* se encuentra entre los 10 principales oomicetos patógenos de plantas, que infecta más de 5000 especies (Hardham, 2005) y su patogenicidad ha sido demostrada (Linde *et al.*, 1999; Rodríguez-Padrón *et al.*, 2018; Belisle *et al.*, 2019b).

Desde hace años, los fosfitos se han utilizado para el control de la pudrición de raíz, los productores de aguacate utilizan con mayor frecuencia el fosfito de potasio que el metalaxil-M, debido a que



to its higher efficiency and lower cost than others (Adaskaveg *et al.*, 2015; Belisle *et al.*, 2019b). Our results prove that there are no resistant isolates to the fungicides evaluated in Zitácuaro, Michoacán. However, regarding potassium phosphite, a lower sensitivity was observed in the isolates than towards metalaxyl-M. The values obtained for  $EC_{50}$  fluctuated between 11.8 and 37.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of potassium phosphite, and for growth inhibition, between 54.7 and 74.2% in comparison with the control, which are similar to those obtained by Wilkinson *et al.* (2001), who obtained inhibition values ranging from 59 to 100%. Eight of the isolates displayed an enhancement in growth when they were exposed to the concentration of 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of i.a of potassium phosphite, and these results coincide with those by Wilkinson *et al.* (2001) and Hunter *et al.* (2018). This may be due to the possibility that, at low potassium phosphite concentrations, in the cV8 nutrient-rich medium, it may be easier for *P. cinnamomi* to alter its growth as a survival strategy, along with the fungistatic effect not affecting the mycelial growth (Guest and Grant, 1991; Hunter *et al.*, 2018). Another reason is the loss in sensitivity of the isolates due to the frequent exposure to the fungicide, since they undergo a pressure of selection, which may eventually lead to the development of resistance, even if there is no sexual recombination (Dobrowolski *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Not only has *P. cinnamomi*, been reported as sensitive to potassium phosphite, also *P. syringae* and *P. citrophthora*, although the inhibition of growth of the species *in vitro* is not indicative of the disease control held in the field as being effective (Hao *et al.*, 2021).

On the other hand, although Marin *et al.* (2021) reported the development of resistance in *Phytophthora* species to metalaxyl-M (mefenoxam), our study observed an average growth inhibition of 88.24% and a  $EC_{50}$  value of 0.08

es eficaz y de menor costo que otros (Adaskaveg *et al.*, 2015; Belisle *et al.*, 2019b). Nuestros resultados demuestran que no hay aislados resistentes a los fungicidas evaluados en Zitácuaro Mich; sin embargo, por lo que respecta a fosfito de potasio se observó menor sensibilidad de los aislados con respecto a metalaxil-M. Los valores obtenidos de  $CE_{50}$  oscilaron entre 11.8 y 37.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfito de potasio y para la inhibición del crecimiento entre 54.7 y 74.2 % comparado con el testigo, los cuales resultan similares a los obtenidos por Wilkinson *et al.* (2001), quienes obtuvieron valores de inhibición que oscilaron entre 59 y 100 %. En ocho de los aislados se observó una promoción de crecimiento cuando fueron expuestos a la concentración de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de i.a de fosfito de potasio, resultados que concuerdan con los de Wilkinson *et al.* (2001) y Hunter *et al.* (2018). Lo anterior podría deberse a que, a bajas concentraciones de fosfito de potasio, en medio rico en nutrientes cV8, sea más fácil para *P. cinnamomi* alterar el crecimiento como una estrategia de supervivencia, además que por su efecto fungistático no afecta el crecimiento micelial (Guest y Grant, 1991; Hunter *et al.*, 2018). Otra razón es la pérdida de sensibilidad de los aislados debido a la posible exposición frecuente al fungicida ya que son sometidos a una presión de selección, situación que eventualmente podría generar el desarrollo de resistencia, incluso aunque no exista recombinación sexual (Dobrowolski *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2018). Además de *P. cinnamomi*, se ha reportado la sensibilidad a fosfito de potasio de *P. syringae*, *P. citrophthora*, sin embargo, la inhibición del crecimiento de las especies *in vitro*, no es indicativo de que en campo el control de la enfermedad sea efectivo (Hao *et al.*, 2021).

Por otro lado, aunque Marin *et al.* (2021) reportaron desarrollo de resistencia de especies de *Phytophthora* a metalaxil-M (mefenoxan), en el presente estudio se observó en promedio un

and 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl-M  $\text{mL}^{-1}$ , suggesting that the *P. cinnamomi* populations obtained from avocado are sensitive to the fungicide. In a similar study, the isolates obtained from ornamental plants in nurseries were less sensitive, with a  $\text{EC}_{50}$  value of 0.01-0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of metalaxyl (Hu *et al.*, 2010). This may be due to the applications being more controlled and less frequent in the nurseries than in the field. In North Carolina, sensitivity tests performed on *P. cinnamomi* isolated from Christmas trees gave percentages of inhibition that fluctuate between 89 and 100%, despite metalaxyl-M applications being carried out in the region two or three times a year (Benson and Grant, 2000). This confirms that *P. cinnamomi* is sensitive to metalaxyl-M, along with the fact that high percentages of inhibition of mycelial growth by metalaxyl-M have also been observed in other species such as *P. nicotianae* (73.5%) and *P. × pelgrandis* (97.5%) (Pánek and Tomšovský *et al.*, 2017).

On the other hand, González *et al.* (2014) indicated that the V8 culture medium promotes the growth of *Phytophthora* in regard to other media. These results are consistent with those obtained in this work, since the isolates with the most growth were those plated on V8. A difference in growth was found between both temperatures, with 25 °C being more favorable, since it is within the optimum growth temperature range of *P. cinnamomi* that ranges between 24 and 28 °C (Erwin and Ribeiro 1996).

In Mexico, the sensitivity studies performed on *P. cinnamomi* isolates to fungicides are scarce. The results of this work provide an estimation of the range of sensitivity to potassium phosphite and metalaxyl-M of *P. cinnamomi* isolates that cause root rot in avocado produced in the municipality of Zitácuaro, Michoacán. However, it is necessary to carry out further studies which include a greater number of isolates from the main producing

88.24% de inhibición del crecimiento y un valor de  $\text{CE}_{50}$  de 0.08 y 0.34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil-M  $\text{mL}^{-1}$  lo que sugiere que las poblaciones de *P. cinnamomi* obtenidas de aguacate son sensible al fungicida. En un estudio similar, los aislados obtenidos de plantas ornamentales de vivero fueron menos sensibles con valores de  $\text{CE}_{50}$  de 0.01-0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de metalaxil (Hu *et al.*, 2010). Lo anterior puede deberse a que en los viveros las aplicaciones son más controladas y con menor frecuencia que en campo. En Carolina del Norte, en pruebas de sensibilidad de *P. cinnamomi* aislada de árboles de navidad a metalaxil se obtuvieron porcentajes de inhibición que oscilan entre 89 y 100 %, esto a pesar de que en el lugar se hacen aplicaciones de metalaxil dos o tres veces al año (Benson y Grant, 2000). Lo anterior confirma que *P. cinnamomi* es sensible a metalaxil-M, además los altos porcentaje de inhibición de crecimiento micelial por metalaxil-M, también se han observado en otras especies como *P. nicotianae* (73.5%) y *P. × pelgrandis* (97.5%) (Pánek y Tomšovský *et al.*, 2017).

Así mismo, González *et al.* (2014) indicaron que el medio de cultivo V8 promueve el crecimiento de *Phytophthora* respecto a otros medios. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo ya que los aislados con mayor crecimiento fueron los cultivados en V8. Se observó diferencia de crecimiento entre las dos temperaturas, favoreciéndoles la de 25 °C, la cual se encuentra dentro del rango de temperatura óptima de crecimiento de *P. cinnamomi* que oscila entre 24 y 28 °C (Erwin y Ribeiro 1996).

En México, los estudios de sensibilidad de aislados de *P. cinnamomi* a fungicidas son escasos. Los resultados de este trabajo dan una estimación del rango de sensibilidad a fosfito de potasio y metalaxil-M de aislados de *P. cinnamomi* causando pudrición de raíz en aguacate en el municipio de Zitácuaro, Michoacán; sin embargo, es necesario hacer más estudios que incluyan un mayor número

municipal areas, in order to help us determine if the populations of the pathogen are becoming tolerant to these fungicides.

## CONCLUSIONS

The results of this work indicate that in Zitácuaro, Michoacán, *P. cinnamomi* is the main oomycete present in avocado roots with rot. Out of 25 root samples, 15 isolates were obtained with the morphological characteristics of *P. cinnamomi*. The isolates were inhibited by more than 98% at concentrations of 300 and 600 µg mL<sup>-1</sup> of potassium phosphite and over 96 % at 3 and 5 µg mL<sup>-1</sup> with metalaxyl- M.

## LITERATURE CITED

- Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M and Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora* Collection. [https://idtools.org/id/phytophthora/about\\_authors.php](https://idtools.org/id/phytophthora/about_authors.php)
- Adaskaveg JE, Hao W and Forster H. 2015. Postharvest strategies for managing *Phytophthora* brown rot of citrus using potassium phosphite in combination with heat treatments. *Plant Disease* 99 (11): 1477-1482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0040-RE>
- Araújo RG, Rodríguez-Jasso RM, Ruíz HA, Pintado MM and Aguilar C. 2018. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 80: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Belisle RJ, Hao W, McKee B, Arpaia ML, Manosalva P and Adaskaveg JE. 2019a. New Oomycota fungicides with activity against *Phytophthora cinnamomi* and their potential use for managing avocado root rot in California. *Plant Disease* 103 (8): 2024-2032. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1698-RE>
- Belisle R, McKee B, Hao W, Crowley M, Arpaia ML, Miles TD, Adaskaveg JE and Manosalva P. 2019b. Phenotypic characterization of genetically distinct *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado. *Phytopathology* 109 (3): 384-394. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0326-R>
- Benson DM and Grand L. F. 2000. Incidence of *Phytophthora* root rot of Fraser fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxyl.

de aislados provenientes de los principales municipios productores, que nos permita determinar si las poblaciones del patógeno están desarrollando tolerancia a dichos fungicidas.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que, en Zitácuaro, Michoacán, *P. cinnamomi* es el principal oomicete presente en raíces de aguacate con pudrición, de 25 muestras de raíces, se obtuvieron 15 aislados con características morfológicas de *P. cinnamomi*. Los aislados se inhibieron más del 98% a concentraciones de 300 y 600 µg mL<sup>-1</sup> de fosfito de potasio y arriba de 96% a 3 y 5 µg mL<sup>-1</sup> con metalaxil- M.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Plant Disease* 84(6): 661- 664. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.661>.
- Chen D and Zentmyer GA. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62 (2): 397-402. <https://doi.org/10.2307/3757597>
- Coffey MD. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Pages 423-444. *in: Plant diseases of international importance. Volumen III. Diseases of fruit crops.* Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN. eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. 456 pp
- Dann EK, Cooke AW, Forsberg LI, Pegg KG, Tan YP and Shivas RG. 2012. Pathogenicity studies in avocado with three necrotrophic fungi, *Calonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriodendri*. *Plant Pathology* 61(5): 896-902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02579.x>
- Dann E and McLeod A. 2021. Phosphonic acid: A long-standing and versatile crop protectant. *Pest Management Science* 77(5): 2197-2208. <https://doi.org/10.1002/ps.6156>
- Darvas J and Becker O. 1984. Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with metalaxyl after its prolonged use. *Avocado Growers' Association Yearbook* 7: 77-78.
- Dobrowolski M, Shearer B, Colquhoun I, O'Brien P and Hardy G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57(5): 928-936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01883.x>

- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. Am. Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- FAOSTAT. 2020. FAO Statistics División 2020. (<http://faostat.fao.org>; accesada agosto 2020).
- Fernández-Pavía S, Díaz-Celaya M, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Abad GZ, Félix-Gastélum R, Ochoa-Ascencio S, Garay-Serrano E, Mondragón-Flores A, Soto-Plancarte A, Grünwald NJ y Santillán-Mendoza R. 2020. Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84p
- García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen. 3ª Edición. Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F.
- González PFD, Costales MD and Falcón RAB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal 29 (1): 33-41. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&tlng=es).
- Gray MA, Hao W, Forster H and Adaskaveg JE. 2018. Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. Plant Disease 102 (4): 734-742. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1155-RE>
- Guest D and Grant BR. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biological Reviews 66 (2):159-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x>
- Guillén-Andrade H, Lara-Chávez BN, Gutiérrez-Contreras M, Ortiz-Catón M y Ángel-Palomares E. 2007. Cartografía Agroecológica del cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado editores de Morelia, Michoacán, México. Primera edición. 141p.
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6 (6): 589–604. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x>
- Hernández-Pérez A, Cerna-Chávez E, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM and Ochoa-Fuentes YM. 2019. First report of *Phytophythium vexans* causing the “avocado sadness” in Michoacan, Mexico. Revista Internacional de Botánica Experimental 88 (1): 11-13. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.04608>
- Hao W, Förster H and Adaskaveg. 2021. Resistance to potassium phosphite in *Phytophthora* species causing citrus brown rot and integrated practices for management of resistant isolates. Plant Disease 105(4): 972-977. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1414-RE>
- Hu J, Hong C, Stromberg E and Moorman G. 2010. Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. Plant Disease 94 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0039>
- Hunter S, Williams N, McDougal R, Scott P and Garbelotto M. 2018. Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its practical implications. PLoS ONE 13(12): e0208961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>
- Hwang J and Benson DM. 2005. Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 89 (2):185-190. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0185>
- Hwang SC, Ko WH and Aragaki M. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 67(6): 1233-1234. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019873>
- Linde C, Kemp GHJ and Wingfield MJ. 1999. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Plant Pathology 105 (3): 231-239 <https://doi.org/10.1023/A:1008780429770>
- Marin MV, Seijo TE, Zuchelli E and Peres NA. 2021. Resistance to mefenoxam of *Phytophthora cactorum* and *P. nicotianae* causing crown and leather rot in Florida strawberry. Plant Disease <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2474-RE>
- Müller U and Urich G. 2012. Newest aspects of nucleic acid synthesis inhibitors: Metalaxyl-M. Pages 901-908 in: Modern Crop Protection Compounds, 2nd ed. W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke, and M. Witschel eds. Wiley, Weinheim, German. 1608 pp
- O’Gara E, Howard K, McComb J, Colquhoun IJ and Hardy GESJ. 2015. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 64 (1): 207-215. <https://doi.org/10.1111/ppa.12244>
- Ochoa-Fuentes YM, Hernandez FD, Landeros J, Olalde V, Cerna E, Morales JL and Flores A. 2005. Compatibilidad sexual de *Phytophthora cinnamomi* Rands en Michoacán México. Phytón 54: 79-85.
- Ochoa-Fuentes YM, Hernández-Pérez A, Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Tapia-Vargas LM, Hernández-Bautista O and Cerna-Chávez E. 2018. First report of avocado tree wilt by *Pythium sp. amazonianum* in Mexico. Ciencia e Investigación Agraria 45(3): 301-305. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i3.1905>
- Ochoa-Fuentes YM, Martínez-de la Vega O, Olalde-Portugal V, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Castillo FD and Flores-Olivas A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 25 (2):161-166.
- Olalde-Lira G, Raya-Montaña YA, Apérez-Barrios P, Vargas-Sandoval M, Pedraza-Santos M, Raymundo T, Valenzuela-Garza R and Lara-Chávez MBN. 2020. Characterization of *Fusarium* spp., a phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.) in Michoacán, México. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 52 (2): 301-316. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFA/article/view/3875>
- Pánek M and Tomšovský M. 2017. *In vitro* growth response of *Phytophthora cactorum*, *P. nicotianae* and *P. × pelgrandis* to antibiotics and fungicides. Folia Microbiol (Praha) 62(4): 269-277. doi: 10.1007/s12223-017-0493-z.
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. Revista Ceres 61(1): 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Ramírez-Gil JG, Castañeda-Sánchez DA and Morales-Osorio JG. 2017. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. Plant Pathology 66(4): 623-632. <https://doi.org/10.1111/ppa.12620>

- Robin C, Smith I and Hansen EM. 2012. *Phytophthora cinnamomi*. Forest *Phytophthoras* 2(1). <https://doi.org/10.5399/osu/fp.2.1.3041>
- Rodríguez-Padrón C, Siverio F, Pérez-Sierra A and Rodríguez A. 2018. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthium vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (1): 89-106. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22022](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022)
- Ruano-Rosa D and López Herrera CJ. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Biological Control* 51(1): 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.005>
- SIAP (Servicio de Información Alimentaria y Pesquera). 2019. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Téliz D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 219 p.
- Vitale A, Aiello D, Guarnaccia V, Perrone G, Stea G and Polizzi G. 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160 (3): 156-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869>.
- Wilkinson CJ, Shearer BL, Jackson TJ and Hardy GESJ. 2001. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology* 50 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00539.x>
- Zentmyer GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No 10. The American Phytopathological Society, St, Paul, Minnesota. 96 p.

# Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp.

## Aspectos moleculares de la marchitez vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y del antagonismo por *Trichoderma* spp.

Paula Andrea Castillo-Sanmiguel, Laura Rocío Cortés-Sánchez, Jovanna Acero-Godoy\*, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, CP 110911, Colombia. \*Corresponding author: jacerog@unicolmayor.edu.co

Received: June 21, 2021.

Accepted: November 28, 2021.

Castillo-Sanmiguel PA, Cortés-Sánchez LR and Acero-Godoy J. 2022. Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 82-102.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-1>

First DOI publication: December 15, 2021.

Primera publicación DOI: 15 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** Tomato plants (*Solanum lycopersicum*) are susceptible to the infection by diverse pathogens that cause devastating diseases such as vascular wilt, which causes great losses at the production level. The fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is one of the etiologic agents of this disease and its control lies in the use of synthetic chemicals which generate a negative impact in both health and the environment; thus, it is necessary to implement biological control as a healthier and

**Resumen.** Las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) son susceptibles a la infección por diversos patógenos causantes de enfermedades devastadoras como la marchitez vascular, que provoca grandes pérdidas a nivel de producción. El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) es uno de los agentes etiológicos de esta enfermedad y su control radica en el uso de fungicidas químicos sintéticos, los cuales, generan un impacto negativo para la salud y para el medio ambiente; por ello, es necesaria la implementación del control biológico como una alternativa más sana y eficiente. Especies del hongo *Trichoderma* spp. son una opción favorable como biocontroladores frente a este patógeno gracias a sus mecanismos antagónicos determinados por características metabólicas y génicas. Por un lado, para *Fol* es indispensable la activación de vías de señalización como MAPK Fmk1, MAPK Mpk1 y HOG, mientras que *Trichoderma* spp. utiliza efectores involucrados en la interacción con la planta como proteínas, enzimas y metabolitos

more efficient alternative. The fungus *Trichoderma* spp. is a favorable option to be employed as a biocontroller against this pathogen thanks to its antagonist mechanisms, determined by metabolic and genetic characteristics. On the one hand, for *Fol* it is indispensable the activation of signaling routes such as MAPK Fmk1, MAPK Mpk1 y HOG, while *Trichoderma* spp. uses effectors involved in the interaction with the plant such as proteins, enzymes and secondary metabolites that also strengthen its immune response against infection, determined by both Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) and effectors. Therefore, this article makes a review about the mentioned characteristics and suggests a greater application of tools and molecular markers for the management of this disease.

**Key words:** vascular wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, biological control, *Trichoderma* spp.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is considered one of the most important vegetables in many countries in the world (González *et al.*, 2012) due to its wide consumption, area planted, the economic value of its production, the importance of incomes it provides for small -and middle- scale farmers (Burbano and Vallejo, 2017) and due to its high nutritional contribution, since it is a source of antioxidant substances such as lycopene, beta-carotene, flavonoids and vitamins (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2020). The most representative of the varieties planted are chonto, cherry and milano (Miranda *et al.*, 2009).

The crop is implemented in the greenhouse or in the open, in ventilated soils, with loamy textures and high contents of organic matters. In addition, this is a warm -and moderate- weather crop, susceptible to frost and low temperatures, therefore

secundarios que también fortalecen su respuesta inmune ante la infección, determinada tanto por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) como por efectores. Por consiguiente, este artículo realiza una revisión acerca de dichas características y sugiere una mayor aplicación de herramientas y marcadores moleculares para el manejo de esta enfermedad.

**Palabras clave:** marchitez vascular, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, control biológico, *Trichoderma* spp.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es considerado una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo (González *et al.*, 2012) debido a su amplio consumo, área cosechada, valor económico de su producción, importancia de ingresos de pequeños y medianos productores (Burbano y Vallejo, 2017) y por su elevado aporte nutricional, ya que es fuente de sustancias antioxidantes como licopeno, betacaroteno, flavonoides y vitaminas (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2020). Dentro de las variedades cultivadas, las más representativas mundialmente son el chonto, cherry y milano (Miranda *et al.*, 2009).

El cultivo se implementa bajo invernadero o a campo abierto, en suelos aireados, con textura franca y alto contenido de materia orgánica. Además, esta es una hortaliza de clima cálido y moderado, susceptible a heladas y a temperaturas bajas; por ello, crece entre 21 a 24 °C (Florido y Álvarez, 2015), lo que favorece el desarrollo normal de los procesos bioquímicos, el crecimiento vegetativo y fructificación. Actualmente la calidad, rendimiento y producción de este cultivo se ve afectado por numerosos problemas fitosanitarios, algunos generados por diversos microorganismos, lo que ocasiona importantes pérdidas a nivel económico (Henao-

it grows in temperatures between 21 to 24 °C (Florido and Álvarez, 2015), which enhances the normal development of the biochemical processes, vegetative growth and fruition. Currently, the quality, yield and production of this crop is affected by numerous phytosanitary problems, some of which are produced by diverse microorganisms, leading to important economic losses (Hena-Hena *et al.*, 2018). Worth highlighting among these microorganisms is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), a frequent inhabitant of the soil, which enters the plant via its roots. The production of proteins, mycotoxins and other components inactivate the defenses of the hosts, allowing the fungal mycelia to accumulate in the xylem, preventing water and nutrients to flow to the leaves and fruits, causing the disease known as vascular wilt. This is one of the most harmful diseases for this crop, due to the easy spread of the phytopathogen, the resistance to adverse conditions and the high cost of the control measures used for their management (Eraso *et al.*, 2014).

Different models have been implemented worldwide for the control of infections by fungi in crops, such as the use of systemic fungicides and diverse agrochemicals, which, in addition to their high cost, are not completely effective or may even lose their effectiveness, leading to multi-resistant microorganisms (Sood *et al.*, 2020), which, in turn, affect both human health and the quality of the environment. Some commonly used fungicides are benzimidazoles and these compounds have been proven to cause mutagenesis of different kinds in plants that come in contact with them (Villa-Martínez *et al.*, 2014). For these reasons, it is currently necessary to reduce the use of fungicides for the control of fungal diseases, and biological control is considered as a healthy, efficient and cheap alternative to solve this problem, with favorable results, not only in the treatment of the disease, but also in the development of the plant.

Hena *et al.*, 2018). Dentro de estos microorganismos destaca el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), un habitante frecuente del suelo, el cual, ingresa a la planta desde la raíz. La producción de proteínas, micotoxinas y otros compuestos, inactiva las defensas del huésped permitiendo la acumulación de micelio fúngico en el xilema, lo que impide el flujo de agua y de nutrientes hasta las hojas y frutos, ocasionando la enfermedad denominada marchitez vascular. Esta es una de las enfermedades más perjudiciales de este cultivo, debido a la fácil propagación del fitopatógeno, la resistencia a condiciones adversas y al alto costo de las medidas de control empleadas para su manejo (Eraso *et al.*, 2014).

Mundialmente, se han implementado diferentes métodos para el control de infecciones por hongos en los cultivos, tales como el uso de fungicidas sistémicos y diversos agroquímicos, estos además de su costo elevado, no son completamente efectivos o pueden incluso perder su efectividad, originando microorganismos multirresistentes (Sood *et al.*, 2020), afectando a su vez tanto la salud humana como la calidad del medio ambiente. Algunos fungicidas comúnmente utilizados son los benzimidazoles y se ha comprobado que dichos compuestos son capaces de causar mutagénesis de diferentes tipos en las plantas que entran en contacto con ellos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Por estas razones, actualmente es necesario reducir el uso de fungicidas para el control de enfermedades fúngicas, y se piensa en el control biológico como una alternativa saludable, eficiente y económica para sobrellevar esta problemática, consiguiendo resultados favorables no solo en el tratamiento de la enfermedad, sino también en el desarrollo de la planta.

En los últimos años se han elaborado productos para el cuidado de los cultivos agrícolas incluyendo el uso del género *Trichoderma* spp., el cual, es un antagonista ampliamente estudiado en el control de enfermedades debido a su facilidad para ser



In recent years, products have been created for the care of agricultural produce, including the use of the genus *Trichoderma* spp., which is a widely studied antagonist for disease control due to the ease with which it is isolated, cultivated, and to its quick growth in a number of substrates (Ronnie-Gakegne and Martínez-Coca, 2018). This fungus, included in the biological control agents of microbial origin (ACB-M), has the ability to suppress the development of pathogens in plants, colonize its internal tissues and stimulate its growth (Córdova-Albores *et al.*, 2021). *Trichoderma* spp. can be used as a bio-controller against *Fol*, due to its chemotaxis, antibiosis and mycoparasitic capacity (Cubillos *et al.*, 2011). The activation of these mechanisms implies the production of metabolites and specific compounds such as hydrolytic enzymes, siderophores, antibiotics, plant growth factors, and others (Poveda *et al.*, 2020).

Vargas-Hoyos and Gilchrist-Ramelli (2015) and Herrera-Téllez *et al.* (2019) have experimentally determined, both *in vivo* and *in vitro*, that *Trichoderma* spp. displays an evident antagonistic effect against *Fusarium* spp., the species *T. harzianum*, *T. viride* and *T. asperellum* being the most effective in their antifungal activity. The reduction of the presence of the pathogen, and therefore the symptoms of wilting in tomato plants, is due to the production of different hydrolytic enzymes and secondary metabolites, providing the ability of inhibition and cell degradation. Likewise, they observed that these species are able to stimulate plant growth, including absolute growth rate, and to induce the systemic resistance in plants (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015; Herrera-Téllez *et al.*, 2019).

One of the main problems with carrying out an adequate management of this disease in tomato crops is the scarce application of information related to the plant-pathogen-antagonist interaction

aislado, cultivado y gracias a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos (Ronnie-Gakegne y Martínez-Coca, 2018). Este hongo, incluido dentro de los agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M), tiene la capacidad de suprimir el desarrollo de patógenos en plantas, colonizar sus tejidos internos y, además, estimular su crecimiento (Córdova-Albores *et al.*, 2021). *Trichoderma* spp. puede ser utilizado como biocontrolador frente a *Fol*, gracias a su capacidad de quimiotaxis, antibiosis y micoparasitismo (Cubillos *et al.*, 2011). La activación de estos mecanismos implica la producción de metabolitos y compuestos específicos como enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos, factores de crecimiento de plantas, entre otros (Poveda *et al.*, 2020).

Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli (2015) y Herrera-Téllez *et al.* (2019), han determinado experimentalmente tanto *in vivo* como *in vitro*, que *Trichoderma* spp. muestra un evidente efecto antagónico frente a *Fusarium* spp., resaltando las especies *T. harzianum*, *T. viride* y *T. asperellum* como las de mayor efectividad en su actividad antifúngica. La reducción de la presencia del patógeno y, por tanto, los síntomas de marchitez en las plantas de jitomate, es gracias a su producción de diferentes enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios, brindando así capacidad de inhibición y degradación celular. De igual manera, evidenciaron que estas especies son capaces de estimular el crecimiento vegetal, incluida la tasa de crecimiento absoluto, el peso fresco y seco, e inducir la resistencia sistémica en las plantas (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015; Herrera-Téllez *et al.*, 2019).

Uno de los principales inconvenientes para llevar a cabo un adecuado manejo de esta enfermedad en el cultivo de jitomate, es la escasa aplicación de la información relacionada con la interacción planta-patógeno-antagonista, que permita esclarecer la maquinaria de resistencia de la planta, los meca-

that helps clarify the machinery of resistance of the plant, the mechanisms used by the fungus to evade this response and how the antagonist may modulate those mechanisms in plants and pathogens, as factors to take into consideration when designing efficient control strategies against this disease (González *et al.*, 2012).

According to the above, this article has the aim of carrying out a revision on the genic and metabolic interactions between the tomato plant (*Solanum lycopersicum*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Trichoderma* spp., which give rise to an antagonistic effect, which is used as an alternative for the prevention, control and treatment of vascular wilt. This information essentially contributes to understanding the pattern of virulence of *Fol* and helps in the development of molecular markers for the strategies to manage the disease.

### Process of infection and reactions involved

*Fol* is a pathogenic fungus, commonly found in the soil and it causes wilting in over 150 hosts. Its ability of survival helps it overcome harsh conditions, due to its resistance structures, known as chlamydospores, with the ability to live indefinitely, even without the presence of a host; but once they come in contact with it, the vascular infection progresses (Srinivas *et al.*, 2019). The plant-pathogen interaction includes the secretion of proteins, metabolites and specific virulence factors, which can be identified with genomics, metabolomics and proteomics (Manikandan *et al.*, 2018; Padilla-Ramos *et al.*, 2021). These studies have provided new knowledge on the molecular crosstalk produced between *Fol* and its host (González-López *et al.*, 2021).

The life cycle of the *Fusarium* spp. species is divided into the latent, parasitic and saprophytic stages (Villa-Martínez *et al.*, 2014). In the latent

nismos que emplea el hongo para evadir esta respuesta y cómo el antagonista puede modular estos mecanismos en plantas y patógenos, esto como factores a tener en cuenta al momento de diseñar estrategias de control eficientes para esta enfermedad (González *et al.*, 2012).

De acuerdo con lo anterior, el presente artículo tiene como objetivo realizar una revisión acerca de las interacciones génicas y metabólicas entre la planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Trichoderma* spp., que dan lugar a un efecto antagónico, el cual es aprovechado como una alternativa de prevención, control y tratamiento de la marchitez vascular. Esta información contribuye esencialmente a comprender el patrón de virulencia de *Fol* y ayuda al desarrollo de marcadores moleculares para las estrategias del manejo de la enfermedad.

### Proceso de infección y reacciones involucradas

*Fol* es un hongo patógeno que se encuentra comúnmente en el suelo y es causante de la marchitez en más de 150 hospederos. Su capacidad de supervivencia le permite superar condiciones adversas debido a sus estructuras de resistencia conocidas como clamidosporas, con capacidad de vivir indefinidamente incluso sin la presencia de un huésped, pero una vez que entran en contacto con éste la infección vascular progresa (Srinivas *et al.*, 2019). La interacción planta-patógeno, incluye la secreción de proteínas, metabolitos y factores de virulencia específicos, los cuales, pueden ser identificados mediante la genómica, metabolómica y proteómica (Manikandan *et al.*, 2018; Padilla-Ramos *et al.*, 2021). Estos estudios han proporcionado nuevos conocimientos sobre la diafonía molecular que se produce entre *Fol* y su hospedero (González-López *et al.*, 2021).

El ciclo de vida de las especies de *Fusarium* spp. se divide en etapa latente, parasitaria y sapró-

phase, due to the microbiostasis, the growth of the mycelia, chlamydospores and conidia are inhibited, until they come in contact with the exudates, which serve as sources of carbon, nitrogen and organic acids, recognizing specific signals and stimulating their germination. Later, in the parasitic phase, the hyphae of the fungus attach to the roots of the plant, enter them, and once inside, the mycelium moves through the endodermis until it reaches the vascular system of the plant (Cruz *et al.*, 2012) or xylem, the tissue in which the water and nutrients flow, and that is where the mitochondria are produced, which germinate into new hyphae. During this phase, effectors such as enzymes and small secreted cysteine-rich proteins are identified, which make the parasitic lifestyle of *Fol* possible and act by suppressing the defenses of the host or interfering in the recognition by the host. Then, the fungus uses the vascular system of the plant to spread quickly in an upward direction inside the cell apoplast and finally produce virulence factors, causing the collapse of the tissue when the absorption and the translocation of nutrients in the plant stop (Okungbowa and Shittu, 2012; González *et al.*, 2012).

The initial symptoms presented by the infected plants include a pale color in the leaves, a premature loss of leaves, a delayed growth and a dark brown color in the xylem of the plant, a characteristic sign of the plant. The wilting of leaves, the rotting of the root, and finally death, are a clear sign of the disease in its most advanced stage. Likewise, the fungus may spread to the surface and the outside of the plant when its host dies, returning to the soil and sporulating abundantly to continue its pathogenesis in adjacent plants, or remaining in a latent state until it finds a new stimulus (Cardona-Piedrahita and Castaño-Zapata, 2019).

The development of the disease at a molecular level begins once the *Fol* identifies the host, and

fito (Villa-Martínez *et al.*, 2014). En la fase latente, debido a la microbiostasis, se inhibe el crecimiento del micelio, las clamidosporas y los conidios hasta que entran en contacto con exudados, que sirven como fuente de carbono, nitrógeno y ácidos orgánicos, reconociendo señales específicas y estimulando su germinación. Posteriormente, en la fase parasitaria, las hifas del hongo se unen a las raíces de la planta ingresando en ellas y una vez dentro, el micelio avanza por la endodermis hasta alcanzar el sistema vascular de la planta (Cruz *et al.*, 2012) o xilema, tejido donde se da el flujo del agua y nutrientes, y ahí se genera la producción de microconidios que germinan en nuevas hifas. Durante esta fase se identifican efectores como enzimas y pequeñas proteínas ricas en cisteína que posibilitan el estilo de vida parasitario de *Fol* y actúan suprimiendo las defensas del hospedero o interfiriendo con su reconocimiento por parte de este. Luego, el hongo utiliza el sistema vascular de la planta para poder diseminarse rápidamente en dirección ascendente dentro del apoplasto celular y finalmente, producir factores de virulencia, causando de esta manera el colapso del tejido al detenerse la absorción y translocación de nutrientes en la planta (Okungbowa y Shittu, 2012; González *et al.*, 2012).

Los síntomas iniciales que presentan las plantas infectadas incluyen una coloración pálida en las hojas, pérdida prematura de hojas primarias e inferiores, crecimiento retardado y una coloración pardo-oscura en el xilema de la planta, signo característico de la enfermedad. El marchitamiento de las hojas, la pudrición de la raíz y finalmente la muerte, son una clara señal de la enfermedad en su estado más avanzado. Así mismo, el hongo puede diseminarse hacia la superficie y el exterior de la planta cuando su hospedero muere, regresando al suelo y esporulando de manera abundante para continuar con su proceso de patogénesis en plantas adyacentes, o bien permaneciendo en estado latente

that is when two ways of signaling, known as MAPK and HOG, (response of high-osmolarity glycerol), are activated by the genes Fmk1, Mpk1 and Hog1, respectively. Each pathway has a specific role during the infection. Gene Fmk1 has functions related to the virulence and the fusion of hyphae. Mpk1 is related to characteristics of the cell wall such as its integrity and remodeling, and the growth and fusion of vegetative hyphae. In turn, Hog1 is related to the stress and osmoregulation responses (García-Enciso *et al.*, 2017; Sharma and Marques, 2018). Other genes needed for the disease to develop are Fgb1, Fga1, Fga2, Fpd1 y FOW2. The first two codify subunits  $\beta$  and  $\alpha$  of protein G, respectively, controlling the growth, development and virulence of the hyphae, as well as their morphogenesis and conidiation. Fga2 and Fpd1 play a crucial part in pathogenicity (García-Enciso *et al.*, 2017), and FOW2 is important in the initial invasion of the root tissue, in the invasive growth and colonization of plant tissues by this pathogen (Hu *et al.*, 2015).

Aside from the factors mentioned, *Fol* has a series of secreted proteins in the xylem (Six), which are important for the colonization of the vascular tissue and the development of symptoms of wilting. They are codified by avirulence genes (Avr) in the fungus, the expression of which is regulated by the SGE1 transcription factor. The Avr genes are identified by receptor genes of the tomato plant (R genes), also known as immunity genes (I genes) (Gawehns *et al.*, 2015). Likewise, the presence of the Avr and R genes reflects what was established in the hypothesis called “gene for gene”, which emphasizes that for every gene involved in the resistance of the host, there is a corresponding gene in the pathogen with which it interacts, that is, the interaction and compatibility between Avr and R genes will result in the success or failure of the infection in tomato plants (Thrall *et al.*, 2016).

hasta encontrar un nuevo estímulo (Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata, 2019).

El desarrollo de la enfermedad a nivel molecular comienza una vez que *Fol* identifica al hospedero, y allí se activan dos vías de señalización identificadas como MAPK y HOG (respuesta de glicerol de alta osmolaridad) activadas por los genes Fmk1, Mpk1 y Hog1, respectivamente. Cada vía tiene un papel específico durante la infección. El gen Fmk1 tiene funciones relacionadas con la virulencia y fusión de hifas. Mpk1 está relacionado con características de la pared celular como su integridad y remodelación, y el crecimiento y fusión de hifas vegetativas. Y Hog1 está relacionado con las respuestas al estrés y de osmorregulación (García-Enciso *et al.*, 2017; Sharma y Marques, 2018). Otros genes necesarios para el desarrollo de la enfermedad son Fgb1, Fga1, Fga2, Fpd1 y FOW2. Los dos primeros codifican las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de la proteína G respectivamente, logrando controlar el crecimiento, desarrollo y virulencia de las hifas, así como su morfogénesis y conidiación. Fga2 y Fpd1 juegan un papel crucial en la patogenicidad (García-Enciso *et al.*, 2017), y FOW2 es importante en la invasión inicial del tejido de la raíz, en el crecimiento invasivo y colonización de los tejidos vegetales por este patógeno (Hu *et al.*, 2015).

Además de los efectores mencionados, *Fol* cuenta con una serie de proteínas secretadas en el xilema (Six), importantes en la colonización del tejido vascular y el desarrollo de los síntomas de marchitez. Estas están codificadas por genes de avirulencia (Avr) en el hongo, cuya expresión está regulada por el factor de transcripción SGE1. Los genes Avr son identificados por genes receptores de la planta de jitomate (genes R), también conocidos como genes de inmunidad (genes I) (Gawehns *et al.*, 2015). Así mismo, la presencia de genes Avr y R refleja lo establecido en la hipótesis denominada “gen por gen”, la cual hace énfasis en que para cada gen involucrado en la resistencia del huésped existe

Six1, codified by gene *Avr3*, requires the presence of living plant cells and its secretion is carried out immediately after the penetration of the root cortex (García-Enciso *et al.*, 2017). It accumulates in the sap of the xylem, like Six3, Six5 and Six6, and jointly, Six1, Six3 and Six4, along with their corresponding *Avr* genes, activate the resistance of the host, mediated by the *I* genes of the tomato plant. In this way, Six4 (*Avr1*), Six3 (*Avr2*) and Six1 (*Avr3*) are recognized by *I* genes *I-1*, *I-2* e *I-3* of the plant, respectively (Petit-Houdenot and Fudal, 2017; Carmona *et al.*, 2020).

*Fol* is also able to secrete other enzymes that increase its virulence and intervene in its pathogenicity. Polygalacturonases, pectinases, xylanases and proteases are important in the degradation of the plant cell wall, like tomatinase, codified by gene *TOM1*, responsible for inhibiting the plant defense response, allowing the infection to develop (De Sain and Rep, 2015). Regarding toxins, fumonisin, fusaric acid, trichothecenes A and B, enniatins, fusaproliferin and moniliformines are one of the most relevant tones produced by *Fol*, and they have the ability to break the permeability of the cell membrane in the plant and block their ability to control the loss of water and nutrients. They also suppress the absorption of mitochondrial oxygen and are able to conjugate with elements such as Cu, Zn, Co and Fe, forming complexes that make these minerals unavailable for plants (Figure 1) (Li *et al.*, 2013).

### **Immune response of the plant and capacity of resistance**

Biologically, the most superficial defense barrier of the plant is cutin, which protects it from microorganisms and other factors in the

un gen correspondiente en el patógeno con el cual interactúa, es decir, la interacción y compatibilidad entre los genes *Avr* y los genes *R* dará como resultado el éxito o fracaso de la infección en la planta de jitomate (Thrall *et al.*, 2016).

Six1, codificada por el gen *Avr3*, requiere la presencia de células vegetales vivas y su secreción se realiza inmediatamente después de la penetración de la corteza de la raíz (García-Enciso *et al.*, 2017). Ésta se acumula en la savia del xilema al igual que Six3, Six5 y Six6 y de manera conjunta, Six1, Six3 y Six4, junto con sus correspondientes genes *Avr*, activan la resistencia del hospedero, mediada por los genes *I* de la planta de jitomate. De este modo, Six4 (*Avr1*), Six3 (*Avr2*) y Six1 (*Avr3*) son reconocidos por los genes *I* e *I-1*, *I-2* e *I-3* de la planta, respectivamente (Petit-Houdenot y Fudal, 2017; Carmona *et al.*, 2020).

*Fol* también tiene la capacidad de secretar otras enzimas que aumentan su virulencia e intervienen en su patogenicidad. Las poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas son importantes en la degradación de la pared celular vegetal, al igual que la tomatinasa, codificada por el gen *TOM1*, responsable de inhibir la respuesta de defensa vegetal, permitiendo el desarrollo de la infección (De Sain y Rep, 2015). En cuanto a toxinas, la fumonisin, el ácido fusárico, los tricotecenos A y B, enniatinas, fusaproliferina y moniliforminas son unas de las más relevantes producidas por *Fol*, y tienen la capacidad de romper la permeabilidad de la membrana celular en la planta e impedir la habilidad de estas para controlar la pérdida de agua y nutrientes. También, suprimen la absorción de oxígeno mitocondrial y son capaces de conjugarse con elementos como Cu, Zn, Co y Fe formando complejos que hacen que estos minerales no estén disponibles para las plantas (Figura 1) (Li *et al.*, 2013).

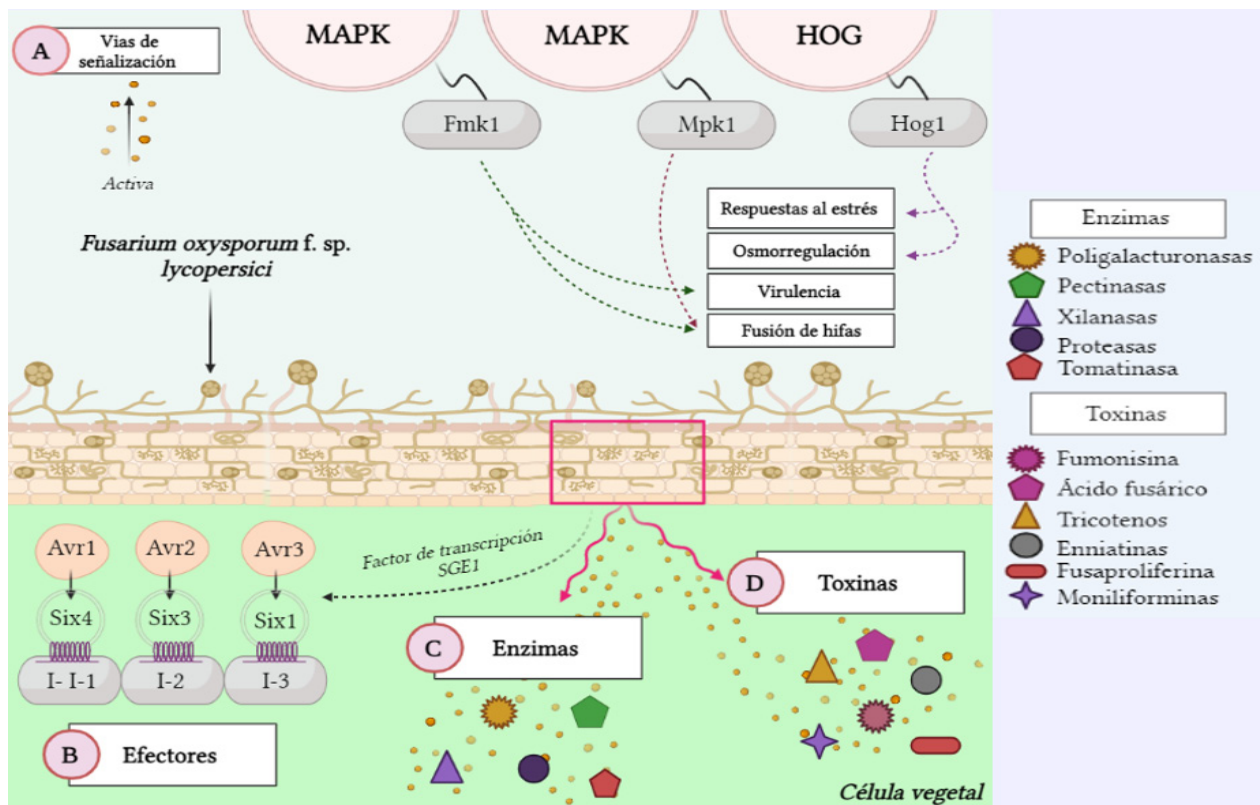


Figure 1. Genomic and proteomic activation and expression of *Fol*. A) Activation of specific signaling pathways, B) Expression of avirulence genes, C-D) Secretion of enzymes and toxins that promote virulence (Source: Authors).

Figura 1. Activación y expresión genómica y proteómica de *Fol*. A) Activación de vías de señalización específicas, B) Expresión de genes de avirulencia, C-D) Secreción de enzimas y toxinas que favorecen la virulencia (Fuente: Autores).

environment; however, when the plant is infected internally by a pathogen such as *Fusarium* spp., the pathogen quickly penetrates the intercellular spaces and, upon being recognized as a foreign agent, callose, lignin and suberin thicken the cell wall so it prevents the mycelium from spreading. Biochemically, toxins are synthesized and a large variety of antimicrobial compounds are released, such as glycosidics, phenolic, sulphurated compounds, unsaturated lactones, and others. Finally, the well-known necrotic aspect of the disease is the product of a hypersensitive response, in which cell death is programmed around the source of infection due to a metabolic and transcriptional change that allows phytoalexins to accumulate in

### Respuesta inmune de la planta y capacidad de resistencia

Biológicamente, la barrera de defensa más superficial de la planta es la cutina, la cual, la protege de microorganismos y demás factores en el ambiente; sin embargo, cuando la planta resulta infectada internamente por un patógeno como *Fusarium* spp., éste pasa rápidamente a través de los espacios intercelulares y al ser reconocido como agente extraño, la calosa, la lignina y la suberina se encargan de engrosar la pared celular para que se dificulte la propagación del micelio. Bioquímicamente, se sintetizan toxinas y se produce una gran variedad de compuestos antimicrobianos como los glicosídicos,

the stem and achieves a later acquired systemic resistance in case the same or another infection agent with a similar pathogenesis presents itself (De Miguel-Rojas, 2014).

To face the effects of *Fol*, the tomato plant carries out two basic responses. In the first place, the detection and identification of many, pathogenic and non-pathogenic microorganisms become possible and, in addition, at a cellular level, calcium mobilizes towards cytosol to produce chitinase proteins, reactive oxygen species (ROS) are generated and immunity genes (R genes) are activated, thanks to Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP). Secondly, effector-triggered immunity takes place, which responds to the presence of pathogens and virulence factors, developing diverse mechanisms, such as the production of tyloses and the retention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which act as barriers to avoid infections from progressing (García-Enciso *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2015). This second type of immunity, also known as the acquired systemic resistance, is mediated by the hormonal signaling of salicylic acid (SA) (Aamir *et al.*, 2018).

As a part of the PAMPs activated in the disease by wilting, molecules such as membrane-related chitin, glucans (particularly  $\beta$ -1,6-glucan) and some glycoproteins, codified by gene *Fem1* are considered. Each one of these elements can be recognized by the defense system of the plant, since it has pattern recognition receptors (PRR) (Figure 2). The chitin synthesis is codified by the gene *chsV*, and its expression depends on the *Fmk1*-MAPK signaling pathway, its union to receptors is direct and it can allow the induction of defense genes against pathogenic fungi. On the other hand, the presence of glucans in tomato has not been widely studied, but it is known to be useful to detect fragments of the pathogen that may be causing harm (García-Enciso *et al.*, 2017).

fenólicos, azufrados, lactonas insaturadas, entre otros. Finalmente, el reconocido aspecto necrótico de la enfermedad es producto de una respuesta hipersensible, en la cual se lleva a cabo una muerte celular programada en torno al foco de infección debido a un cambio metabólico y transcripcional que permite la acumulación de fitoalexinas en el tallo y logra una posterior resistencia sistémica adquirida en caso de volverse a presentar el mismo agente infeccioso u otro con patogénesis similar (De Miguel-Rojas, 2014).

Para hacer frente a la afectación causada por *Fol*, la planta de jitomate efectúa dos respuestas básicas. En primer lugar, se hace posible la detección e identificación de muchos microorganismos tanto patógenos como no patógenos, además, a nivel celular se moviliza calcio hacia el citosol para producir proteínas quinasas, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y se activan genes de inmunidad (genes R) gracias a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En segundo lugar, se presenta la inmunidad activada por efectores, que responde a la presencia de patógenos y factores de virulencia, desarrollando diversos mecanismos tales como la producción de tilosas y la retención de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que funcionan como barreras para evitar que las infecciones progresen (García-Enciso *et al.*, 2017; Andrade-Hoyos *et al.*, 2015). Este segundo tipo de inmunidad, también conocido como resistencia sistémica adquirida, está mediado por la señalización hormonal del ácido salicílico (SA) (Aamir *et al.*, 2018).

Como parte de los PAMP activados en la enfermedad por marchitez se consideran moléculas como la quitina asociada a la membrana, los glucanos (especialmente  $\beta$ -1,6-glucano) y algunas glicoproteínas, codificadas por el gen *Fem1*. Cada uno de estos elementos puede ser reconocido por el sistema defensivo de la planta, ya que tiene receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Figura

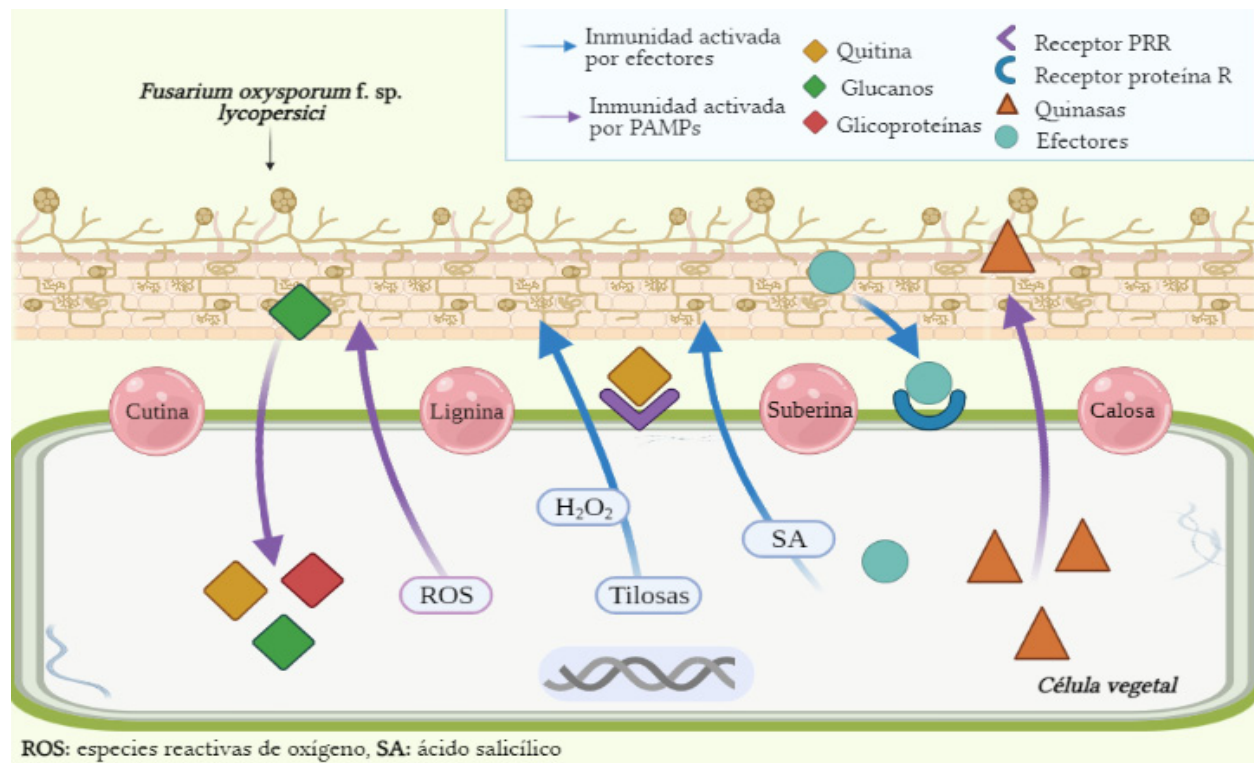


Figure 2. Genic and metabolic interaction between the tomato plant and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Source: Authors).  
 Figura 2. Interacción génica y metabólica entre la planta de jitomate y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fuente: Autores).

Regarding the resistance genetics of the host, the I genes, located in chromosomes 11 and 7 of the plant, are essential, depending on the actions of the different races of *Fol*; thus, the I and I-1 genes provide race 1 with resistance, gene I-2 controls resistance against races 1 and 2 and gene I-3 controls resistance against race 3 of *Fol*. In tomato, the partial resistance to *Fol* is also mediated by the *Frl* gene, located in the long arm of chromosome 9 (Gonzalez-Cendales *et al.*, 2015; Pérez-Almeida *et al.*, 2016).

On the other hand, the capacity of transcription factors has also been investigated, as in the case of WRKY proteins, which, in tomato, make up a total of 83 genes. These function as positive or

2). La síntesis de quitina es codificada por el gen *chsV*, su expresión depende de la vía de señalización *Fmk1*-MAPK, su unión a los receptores es directa y puede permitir la inducción de genes de defensa contra hongos patógenos. Por otro lado, la presencia de glucanos no ha sido muy estudiada en el jitomate, pero se sabe que puede ser muy útil para detectar fragmentos del patógeno que esté causando daño (García-Enciso *et al.*, 2017).

Con respecto a la genética de resistencia del huésped, los genes I, ubicados en los cromosomas 11 y 7 de la planta, son esenciales de acuerdo con la acción de las diferentes razas de *Fol*; así, los genes I e I-1 otorgan resistencia a la raza 1, el gen I-2 controla la resistencia contra las razas 1 y 2 y el gen I-3



negative regulators (Bai *et al.*, 2018) and recognize a non-coding DNA sequence known as W-box (TTGACC/T) which regulates expression directly or indirectly and activates or inactivates other genes, being able to control biological processes such as plant growth and their response to biotic and abiotic stress (Aamir *et al.*, 2019; Mohanta *et al.*, 2016).

### **Relevant aspects in the *Trichoderma* spp. - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* interaction**

Fungi of the genus *Trichoderma* spp. are distributed ubiquitously around the world and include different species with the ability to colonize the roots of a wide variety of plants, as well as to antagonize and eliminate other fungi (Domínguez *et al.*, 2016). These antagonistic properties are based on action mechanisms that control the development of phytopathogens. Particularly, competition for space and nutrients, mycoparasitism, antibiosis and the production of secondary metabolites, enzymes, volatile and non-volatile compounds, and others (Hernández-Melchor *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2013).

During the infection process, *Trichoderma* spp. activates these mechanisms in order to regulate the development of *Fol*. The competition for nutrients and space is a very important antagonistic mechanism. This takes place only when resources such as soil nutrients and space are limited (Sood *et al.*, 2020). *Trichoderma* spp. produces secondary metabolites able to inhibit or reduce growth and other activities in *Fol*, giving it ecological advantages over its competitors, since it uses the resources available in the soil for its growth, leaving the phytopathogen with insufficient nutrients to grow. The competition for nitrogen, carbon and iron has been proven to be a mechanism related to biological control or the suppression of wilting

controla la resistencia contra la raza 3 de *Fol*. En el jitomate, la resistencia parcial a *Fol* también está mediada por el gen *Frl*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 9 (Gonzalez-Cendales *et al.*, 2015; Pérez-Almeida *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha investigado la capacidad de factores de transcripción como las proteínas WRKY, que en el jitomate comprenden un total de 83 genes. Estos funcionan como reguladores positivos o negativos (Bai *et al.*, 2018) y reconocen una secuencia de ADN no codificante conocida como W-box (TTGACC/T) que regula la expresión de manera directa o indirecta y activa o inactiva otros genes, pudiendo controlar procesos biológicos como el crecimiento de las plantas y su respuesta al estrés biótico y abiótico (Aamir *et al.*, 2019; Mohanta *et al.*, 2016).

### **Aspectos relevantes en la interacción *Trichoderma* spp. - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Los hongos del género *Trichoderma* spp. están distribuidos de forma ubicua en todo el mundo e incluyen diferentes especies con la capacidad de colonizar las raíces de una amplia gama de plantas y, además, antagonizar y eliminar otros hongos (Domínguez *et al.*, 2016). Dichas propiedades antagonísticas se basan en la activación de mecanismos de acción que controlan el desarrollo de fitopatógenos. Entre estos, destacan la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis y la producción de metabolitos secundarios, enzimas, compuestos volátiles y no volátiles, entre otros (Hernández-Melchor *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2013).

Durante el proceso de infección, *Trichoderma* spp. activa estos mecanismos con el objetivo de regular el desarrollo de *Fol*. La competencia por nutrientes y espacio constituye un mecanismo antagonístico muy importante. Este ocurre solo cuando

by *Fusarium* spp. (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2020). The low concentrations of these nutrients lead to a reduced germination of conidia, a slower growth of the germinative tube of *Fol* and a reduced number of infection sites, making it inefficient to produce diseases (Vos *et al.*, 2015; Nusaibah and Musa, 2019).

On the other hand, mycoparasitism is a direct biological control mechanism in which *Trichoderma* spp. acts by detecting and parasitizing phytopathogens (Nusaibah and Musa, 2019). In this mechanism, *Trichoderma* spp. grows chemotropically towards *Fol* and sticks to its hyphae through carbohydrates, which attach to the lectins of the pathogen. This adhesion takes place alongside the formation of structures known as appressoria, which wrap around the hyphae of the pathogen (Sharma and Sharma, 2020). Once it recognizes and sticks to it, the *Trichoderma* spp. mycelium wraps around the mycelium of the phytopathogen and secretes cell wall degrading enzymes (CWDE), such as chitinases, glucanases ( $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -1,6-glucanase), cellulases, laccases and proteases (Silva *et al.*, 2019). Microbial strains that synthesize such enzymes can lead to the formation of exoelicitors (inducers of resistance of the cell wall) and endoelicitors (inducers of resistance of the cell wall of the plant) (Jaroszuk-Ścisel *et al.*, 2019). In addition, heterotrimeric G proteins are crucial for intracellular signalling and they participate in the perception of signals from the host, thus activating the mycoparasitic attack in *Trichoderma* spp. (Alfiky and Weisskopf, 2021).

Antibiosis is a strategy used by *Trichoderma* spp. for its defense and to inhibit the growth of phytopathogens. This fungus can secrete antibiotics such as terpenes, trichodermine, trichozianine, gliovirine, gliotoxin, viridine, pyrones and peptaibols (Khan *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2012). Other metabolites include tricholine,

los recursos como los nutrientes del suelo y el espacio son limitados (Sood *et al.*, 2020). *Trichoderma* spp. produce metabolitos secundarios capaces de inhibir o disminuir el crecimiento y otras actividades de *Fol*, lo que le confiere ventajas ecológicas sobre sus competidores ya que utiliza los recursos disponibles en el suelo para su crecimiento, dejando al fitopatógeno con nutrientes insuficientes para su desarrollo. Se ha demostrado que la competencia por el nitrógeno, el carbono y el hierro es un mecanismo asociado con el control biológico o la supresión del marchitamiento por *Fusarium* spp. (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2020). Las bajas concentraciones de estos nutrientes conducen a una germinación reducida de los conidios, un crecimiento más lento del tubo germinativo de *Fol* y un número reducido de sitios de infección, lo que lo vuelve ineficaz para causar enfermedad (Vos *et al.*, 2015; Nusaibah y Musa, 2019).

Por otro lado, el micoparasitismo es un mecanismo directo de control biológico en el que *Trichoderma* spp. actúa detectando y parasitando fitopatógenos (Nusaibah y Musa, 2019). En este mecanismo, *Trichoderma* spp. crece quimiotrópicamente hacia *Fol* y se adhiere a sus hifas a través de carbohidratos, los cuales, se unen a las lectinas del patógeno. Esta adhesión se acompaña de la formación de estructuras conocidas como apresorios, que se enrollan alrededor de las hifas del patógeno (Sharma y Sharma, 2020). Una vez lo reconoce y se adhiere, el micelio de *Trichoderma* spp. se enrolla en el micelio del fitopatógeno, acompañado de la segregación de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular (CWDE), como lo son las quitinasas, glucanasas ( $\beta$ -1,3-glucanasa,  $\beta$ -1,6-glucanasa), celulasas, lacasas y proteasas (Silva *et al.*, 2019). Las cepas microbianas que sintetizan dichas enzimas pueden provocar la formación de exoelicitores (inductores de resistencia de la propia pared celular) y endoelicitores (inductores de resistencia de la

harcyanic acid, heptelidic acid, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, terpenoids, polyketides and sesquiterpenes, which penetrate the mycelium of the pathogen and act synergically in the cell wall degradation, digesting its intracellular content (Sharma and Sharma, 2020; Wu *et al.*, 2017; Matarese *et al.*, 2012; Ojha y Chatterjee, 2011). The secondary metabolites and antibiotics are the most important chemical factors produced by *Trichoderma* spp. to eliminate phytopathogenic fungi. It is therefore important to point out that, the more metabolites are produced, the more antagonistic action there will be. This turns *Trichoderma* spp. in the most widely used antagonist as a biological control agent (BCA) (Sonkar, 2019).

### **Role of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of wilting**

Some species of *Trichoderma* spp. interact in the benefit of the tomato plant (*Solanum lycopersicum*), favoring its development and activating its defense system against diverse phytopathogens. Each interaction is mediated by metabolites and genes expressed differentially and it is possible to deduce that the proteins codified by them, which are also known as effectors, help establish these relations (Ramirez-Valdespino *et al.*, 2019).

The effector molecules have been studied in detail, since they play an important part in harmful interactions and in symbiotic interactions. As a part of an action of mechanism, *Trichoderma* spp. expresses effectors involved in the interaction with plants, inducing their defense system and promoting their growth (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). One of the most abundant group of effectors in this fungus correspond to small secreted cysteine-rich proteins (SSCP), which group into different protein families, such as: a) cerato-platanins, which are able to induce defense responses in the plant; b)

pared celular de la planta) (Jaroszuk-Ścisł *et al.*, 2019). También, las proteínas G heterotriméricas son indispensables para la señalización intracelular y participan en la percepción de las señales del huésped, activando así el ataque micoparásito en *Trichoderma* spp. (Alfiky y Weisskopf, 2021).

La antibiosis es una estrategia utilizada por *Trichoderma* spp. para su defensa y para inhibir el crecimiento de fitopatógenos. Este hongo puede segregar antibióticos como terpenos, trichodermina, trichozianina, gliovirina, gliotoxina, viridina, pironas y peptaiboles (Khan *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2012). Otros metabolitos incluyen tricolina, ácido harcianico, ácido heptelídico, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, terpenoides, policétidos y sesquiterpenos, los cuales, penetran en el micelio del patógeno y actúan de manera sinérgica en la degradación de la pared, digiriendo su contenido intracelular (Sharma y Sharma, 2020; Wu *et al.*, 2017; Matarese *et al.*, 2012; Ojha y Chatterjee, 2011). Los metabolitos secundarios y los antibióticos son los factores químicos más importantes que produce *Trichoderma* spp. para eliminar los hongos fitopatógenos. Por lo tanto, es importante señalar que, entre mayor producción de metabolitos, existirá una mayor acción antagonista. Esto convierte a *Trichoderma* spp. en el antagonista más comúnmente empleado como agente de control biológico (BCA) (Sonkar, 2019).

### **Papel de *Trichoderma* spp. en el biocontrol de la marchitez**

Algunas especies de *Trichoderma* spp. interactúan benéficamente con la planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*), favoreciendo su desarrollo y activando su sistema de defensa contra diversos fitopatógenos. Cada interacción está mediada por metabolitos y genes expresados diferencialmente y se puede deducir que las proteínas codificadas por estos, también llamadas efectores permiten

thioredoxin proteins, identified as possible effectors during mycoparasitic interactions; c) hydrophobins, which mediate the interaction between the fungus and hydrophobic surfaces, promoting the growth and creation of defenses in plants; d) glycoside-hydrolases, which participate in the induction of genes involved in the defense and unleash the biosynthesis of ethylene and the hypersensitive response; and e) proteins with CFEM (*Commonly Found in Extracellular Membranes*) domains, described as cell receptors and signal transducers in host-pathogen interaction signals (Figure 3)

establecer estas relaciones (Ramirez-Valdespino *et al.*, 2019).

Las moléculas efectoras se han estudiado detalladamente debido a que juegan un papel importante en interacciones dañinas y en interacciones simbióticas. Como parte de su mecanismo de acción, *Trichoderma* spp. expresa efectores involucrados en la interacción con las plantas, induciendo su sistema de defensa y promoviendo el crecimiento de estas (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). Uno de los grupos más abundantes de efectores en este hongo corresponden a pequeñas proteínas ricas en cisteína

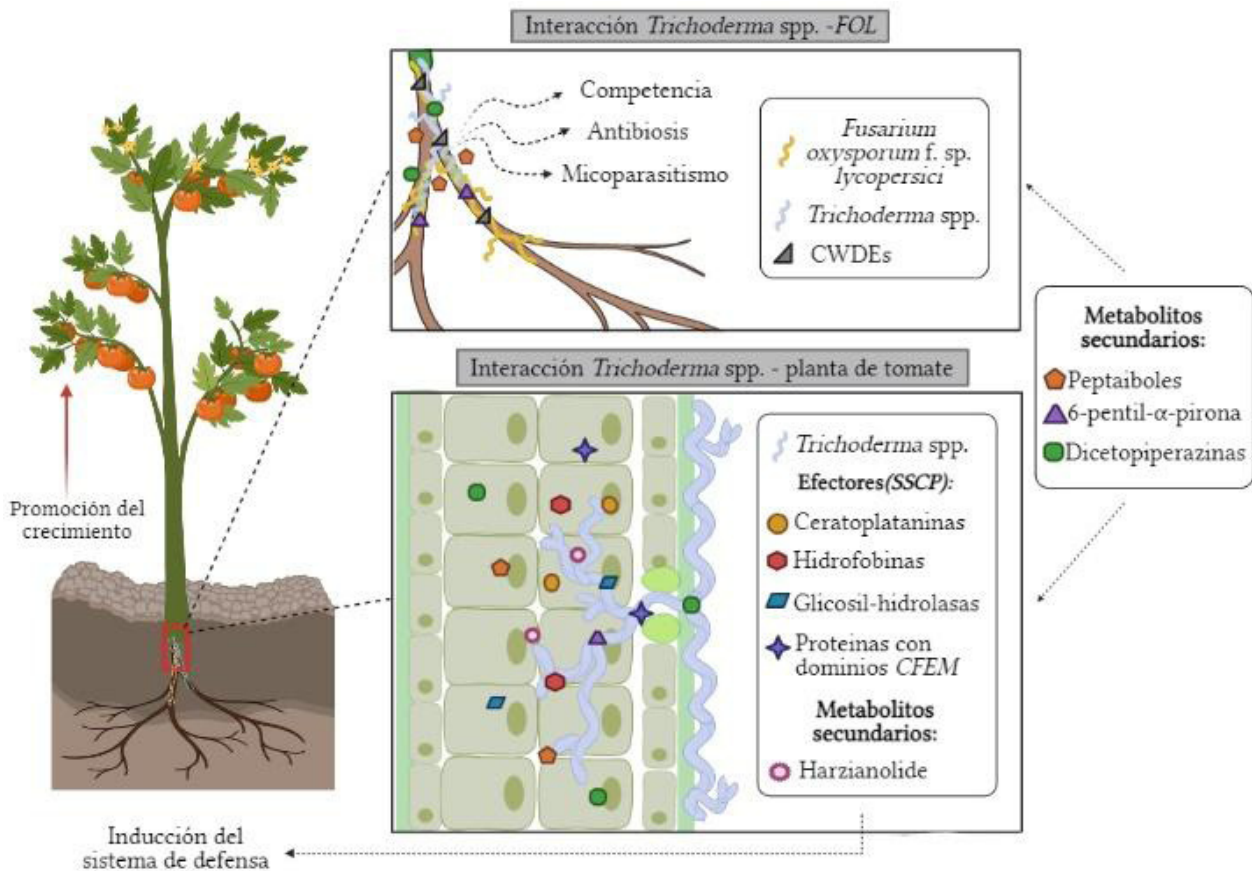


Figure 3. Action of *Trichoderma* spp. as a biocontroller of wilting (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) in the tomato crop (Source: Authors).

Figura 3. Acción de *Trichoderma* spp. como biocontrolador de la marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) en el cultivo de jitomate (Fuente: Autores).

(Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Kubicek *et al.*, 2019; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017).

Nevertheless, the genetic biocontrol mechanism induced by *Trichoderma* spp. is mediated by the transcriptional regulation of genes inducible by stress and by the activation of an adaptive systemic response, which is modulated through an immediate expression of the WRKY genes in the plant. This response consists of a complex cascade that may involve phytohormones or auxins, abscisic acid (ABA), cytokinins (CK) and brassinosteroids to for signaling or cross-communication pathways, such as the one induced by jasmonic acid and ethylene (JA/ET) or the one dependent on salicylic acid (SA). Thus, transcription factor WRKY acts as a convergence between the SA (resistance activated by the PAMPs) and JA signaling pathways (resistance activated by WRKY proteins contained in both *Trichoderma* spp. and the plant) (Aamir *et al.*, 2019). All these processes jointly lead to a facultative symbiosis between the pathogen's host plant and *Trichoderma* spp., where these reciprocal advantages take place (Manganiello *et al.*, 2018).

Both the processes that make the infection of tomato possible and those which activate the response to the attack of the pathogen and those which unleash the regulating cascade of the antagonist may display a broad and complex molecular activity, and since all interactions carried out require a series of simultaneous stimuli and reactions, it is complicated to understand the relationship in an isolated manner; therefore, the success of the interaction must not depend only on the molecules carrying out each function. The physiological state of the three participants, as well as their threshold of perception of the molecular signals exchanged are also important factors. This regulation does not depend only on the genic background of the fungus; the signals generated by the plant and by the antagonist are also important (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019).

(SSCP), que se agrupan en diferentes familias de proteínas como lo son: a) las ceratoplataninas, las cuales tienen la capacidad de inducir respuestas de defensa en la planta; b) proteínas de tiorredoxina, identificadas como posibles efectores durante interacciones micoparasitarias; c) hidrofobinas, que median la interacción entre el hongo y superficies hidrofóbicas, favoreciendo así el crecimiento y la creación de defensas en la planta; d) glicosil-hidrolasas, que participan en la inducción de genes implicados en la defensa y desencadenan la biosíntesis de etileno y la respuesta hipersensible; y e) proteínas con dominios CFEM (*Commonly Found in Extracellular Membranes*), descritas como receptores celulares y transductores de señales en interacciones hospedero-patógeno (Figura 3) (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Kubicek *et al.*, 2019; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017).

Ahora bien, el mecanismo genético de biocontrol inducido por *Trichoderma* spp. está mediado por la regulación transcripcional de genes inducibles por estrés y por la activación de una respuesta sistémica adaptativa, la cual está modulada a través de una expresión inmediata de los genes WRKY de la planta. Esta respuesta consta de una cascada compleja que puede involucrar fitohormonas o puede incorporar auxinas, ácido abscísico (ABA), citoquininas (CK) y brasinoesteroides para formar vías de señalización o comunicación cruzada como la inducida por ácido jasmónico y etileno (JA/ET) o la dependiente de ácido salicílico (SA). Así, el factor de transcripción WRKY sirve de convergencia entre las vías de señalización SA (resistencia activada por los PAMP) y JA (resistencia activada por proteínas WRKY que contiene tanto *Trichoderma* spp. como la planta) (Aamir *et al.*, 2019). Todos estos procesos en conjunto llevan a una simbiosis facultativa entre la planta hospedera del patógeno y *Trichoderma* spp., donde se establecen ventajas recíprocas (Manganiello *et al.*, 2018).

## CONCLUSION

The vascular wilt disease in tomato plants, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), is becoming increasingly relevant due to its important losses in production, which lead to a negative economic impact. To counteract this problem, the implementation of diverse microorganisms is becoming increasingly frequent and studied, including *Trichoderma* spp., which can face this type of effects in agriculture, and particularly in commercially important crops such as tomato, and its beneficial potential for interaction with plant species and antagonistic interaction with pathogenic microorganisms have been used as a feasible option to improve its ability of resistance and ideal growth and development.

It is crucial to highlight the importance of genomics, metabolomics, proteomics and transcriptomics, among other molecular tools, which currently help unveil implied pathways, both in pathogenesis and in an immune response in plants and in the production of metabolites in antagonistic organisms, making it easier to understand the plant-pathogen-biocontroller relations more easily, and in the long term, to contemplate useful options to inhibit the effect of phytopathogens. From this analysis, and as a possible strategy for a better use of the interactions between these microorganisms, investigations focused on genetic improvement are suggested, as well as the development of molecular markers from biolistics and other current systems for gene transfer and sequencing such as those involved in the symbiosis between *Trichoderma* spp. and the tomato plant, facilitating the production of crops that are more resistant, sustainable, profitable and less harmful to both the environment and consumers, due to the reduced habitual use of agricultural chemicals.

Tanto los procesos que hacen posible la infección en el jitomate como los que activan la respuesta al ataque del patógeno y los que desencadenan la cascada reguladora del antagonista pueden dar a conocer una actividad molecular amplia y compleja, y debido a que todas las interacciones llevadas a cabo requieren de una serie de estímulos y reacciones simultáneas, resulta complicado comprender esta relación de forma aislada; por lo tanto, el éxito de la interacción no debe depender únicamente de que las moléculas desempeñen cada una de las funciones. El estado fisiológico de los tres participantes, así como su umbral de percepción hacia las señales moleculares intercambiadas también son factores importantes. Esta regulación no depende únicamente del trasfondo genético del hongo, las señales generadas por la planta y por el antagonista también son importantes (Ramirez-Valdespino *et al.*, 2019).

## CONCLUSIÓN

La enfermedad de marchitez vascular en plantas de jitomate, ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), cada vez cobra mayor relevancia debido a que genera pérdidas importantes a nivel de producción y, por tanto, ocasiona un impacto económico negativo. Para contrarrestar esta problemática, actualmente es más frecuente y estudiada la implementación de diversos microorganismos, entre estos *Trichoderma* spp., que puedan hacer frente a este tipo de afectaciones en la agricultura y particularmente en cultivos de importancia comercial como es el caso del jitomate, y se ha aprovechado su potencial benéfico de interacción con especies vegetales y antagónico con microorganismos patógenos, como una opción viable de control biológico en pro de mejorar su capacidad de resistencia y un crecimiento y desarrollo idóneos.

## LITERATURE CITED

- Aamir M, Singh V, Dubey M, Kashyap S, Zehra A, Upadhyay R and Singh S. 2018. Structural and functional dissection of differentially expressed tomato WRKY transcripts in host defense response against the vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). PLoS One 13(4): 1-43. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193922>
- Aamir M, Kashyap S, Zehra A, Dubey M, Singh V, Ansari W, Upadhyay R and Singh S. 2019. *Trichoderma erinaceum* bio-priming modulates the WRKYs defense programming in tomato against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) challenged condition. Frontiers in Plant Science 10(911): 1-21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00911>
- 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>
- Andrade-Hoyos P, Molina E, De León C, Espíndola M, Alvarado D y López A. 2015. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *Phytophthora cinnamomi* Rands. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(2): 347-360. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342015000200010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000200010)
- Bai Y, Sunarti S, Kissoudis C, Visser R and Van der Linden C. 2018. The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. Frontiers in Plant Science 9(801): 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00801>
- Burbano E and Vallejo F. 2017. Production of “chonto” tomato lines, *Solanum lycopersicum* Mill., with expression of the sp gene responsible of determinate growth. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 11(1): 63-71. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5786>
- Cardona-Piedrahita L y Castaño-Zapata J. 2019. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causante del marchitamiento vascular del tomate. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 43(167): 227-233. <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Carmona S, Burbano-David D, Gómez M, Lopez W, Ceballos N, Castaño-Zapata J, Simbaqueba J and Soto-Suárez M. 2020. Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the andean region of Colombia. Pathogens 9(70): 1-23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010070>
- Córdova-Albores L, Zelaya-Molina L, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruiz V, Cortés-Martínez N, Parra-Cota F, Burgos-Canul Y, Chávez-Díaz I, Fajardo-Franco M and Santos-Villalobos S. 2021. Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 147-184. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2009-3>
- Cruz M, Hoyos L y Melgarejo L. 2012. Respuesta fisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis*) frente al ataque por *Fusarium* spp. Universidad Nacional de Colombia 5(1): 91-112. [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11145/07\\_Cap05.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11145/07_Cap05.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Resulta esencial resaltar la importancia de la genómica, metabolómica, proteómica y transcrip-tómica, entre otras herramientas moleculares, que actualmente permiten develar rutas implicadas tanto en la patogénesis como en la generación de una respuesta inmune en plantas y en la producción de metabolitos en organismos antagonistas, lo que hace posible comprender de manera más específica las relaciones planta-patógeno-biocontrolador y a largo plazo contemplar opciones útiles para inhibir el efecto de fitopatógenos. A partir de este análisis y como posible estrategia para un mayor aprovechamiento de las interacciones entre estos microorganismos, se sugiere la puesta en marcha de investigaciones mayormente enfocadas hacia el mejoramiento genético y el desarrollo de marcadores moleculares a partir de la biobalística y otros sistemas actuales para la transferencia y secuenciación de genes como los involucrados en la simbiosis entre *Trichoderma* spp. y la planta de jitomate, facilitando la producción de cultivos más resistentes, sostenibles, rentables, y menos perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud de los consumidores, al disminuir el uso habitual de químicos agrícolas.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Cubillos J, Páez A y Mejía L. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo “secadera” en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 64(1): 5821-5830. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922364008>
- De Sain M and Rep M. 2015. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. International Journal of Molecular Sciences 16(10): 23970-23993. <https://doi.org/10.3390/ijms161023970>
- Domínguez S, Rubio M, Cardoza R, Gutiérrez S, Nicolás C, Bettiol W, Hermosa R and Monte E. 2016. Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase amdS gene. Frontiers

- in Microbiology 7(1182): 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01182>
- Eraso C, Acosta J, Salazar C y Betancourth C. 2014. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. Revista Ciencia & Tecnología Agropecuaria 15(2): 237-249. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num2\\_art:363](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:363)
- Florido M y Álvarez M. 2015. Aspectos relacionados con el estrés de calor en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Revista Cultivos Tropicales 36(1): 77-95. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362015000500008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000500008)
- García-Enciso E, Benavidez-Mendoza A, Flores-López M, Robledo-Olivo A, Juárez-Maldonado A and González-Morales S. 2017. A molecular vision of the interaction of tomato plants and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IntechOpen 6(1): 80-99. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72127>
- Gawehns F, Ma L, Bruning O, Houterman P, Boeren S, Cornelissen B, Rep M and Takken F. 2015. The effector repertoire of *Fusarium oxysporum* determines the tomato xylem proteome composition following infection. Frontiers in Plant Science 6(967): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00967>
- Gonzalez-Cendales Y, Catanzarit A, Baker B, Mcgrath D and Jones DA. 2015. Identification of 17 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. Molecular Plant Pathology 17(3): 448-463. <https://doi.org/10.1111/mpp.12294>
- González I, Arias Y y Peteira B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. Revista Protección Vegetal 27(1): 1-7. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v27n1/rpv01112.pdf>
- González-López M, Jijón-Moreno S, Dautt-Castro M, Ovando-Vásquez C, Ziv T, Horwitz B and Casas-Flores S. 2021. Secretome analysis of *Arabidopsis*-*Trichoderma atroviride* interaction unveils new roles for the plant glutamate: glyoxylate aminotransferase GGAT1 in plant growth induced by the fungus and resistance against *Botrytis cinerea*. International Journal of Molecular Sciences 22(13): 6804. <https://doi.org/10.3390/ijms22136804>
- Guzmán-Guzmán P, Alemán-Duarte M, Delaye L, Herrera-Estrella A and Olmedo-Monfil V. 2017. Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. BMC Genomics 18(16): 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0481-y>
- Henao-Henao E, Hernández-Medina C, Salazar-González C, Velasco-Belalcázar M and Gómez-López E. 2018. Molecular identification of *Fusarium* isolates associated with passion fruit in five locations from Valle del Cauca, Colombia. Mesoamerican Journal of Agronomy 29(1): 53-61. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.27114>
- Hernández-Melchor D, Ferrera-Cerrato R y Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 35(1): 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Herrera-Téllez V, Cruz-Olmedo A, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M, Arce-Cervantes O, Hernández-León S and Saucedo-García M. 2019. The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. International Journal of Molecular Sciences 20(8): 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms20082007>
- Hu Z, Parekh U, Maruta N, Trusov Y and Botella J. 2015. Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by host-delivered RNA interference enhances disease resistance. Frontiers in Chemistry 3(1): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00001>
- Jaroszuk-Ściseł J, Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, Tyśkiewicz K, Pawlik A and Janusz G. 2019. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTKZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. International Journal of Molecular Sciences 20(19): 4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>
- Khan R, Najeeb S, Hussain S, Xie B and Li Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. Microorganisms 8(6): 817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Kubicek C, Steindorf A, Chenthamara K, Manganiello G, Henrissat B, Zhang J, Cai F, Kopchinskiy A, Kubicek E, Kuo A, Baroncelli R, Sarrocco S, Ferreira E, Vannacci G, Shen Q, Grigoriev I and Druzhinina I. 2019. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. BMC Genomics 20(485): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Li C, Zuo C, Deng G, Kuang R, Yang Q, Hu C, Sheng O, Zhang S, Ma L, Wei Y, Yang J, Liu S, Biswas M, Viljoen A and Yi G. 2013. Contamination of bananas with bauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. PLoS One 8(7): 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070226>
- Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, Seidl-Seiboth V and Vanacci G. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. Microbiology Society Journal 158(1): 99-101. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052639-0>
- Manikandan R, Harish S, Karthikeyan G and Raguchander T. 2018. Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. Frontiers in Microbiology 9(420): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>
- Manganiello G, Sacco A, Ercolano MR, Vinale F, Lanzuise S, Pascale A, Napolitano M, Lombardi N, Lorito M and Woo S. 2018. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. Frontiers in Microbiology 9(1966): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966>
- Martínez B, Infante D y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal 28(1): 1-11. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001)



- Miranda D, Fischer G, Barrientos J, Carranza C, Rodríguez M and Lancho J. 2009. Characterization of productive systems of tomato (*Solanum lycopersicum*) in producing zones of Colombia. *Acta Horticulturae* 821(821): 35-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.821.2>
- Mohanta T, Park Y and Bae H. 2016. Novel genomic and evolutionary insight of WRKY transcription factors in plant lineage. *Scientific Reports* 6(37309): 1-19. <https://doi.org/10.1038/srep37309>
- Mukherjee P, Horwitz B and Kenerley C. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology Society Journal* 158(1): 35-45. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>
- Nusaibah S and Musa H. 2019. A review report on the mechanism of *Trichoderma* spp. as biological control agent of the basal stem rot (BSR) disease of *Elaeis guineensis*. *IntechOpen* 6(1): 1-12. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84469>
- Ojha S and Chatterjee N. 2011. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. in biocontrol of fusarial wilt of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44(8): 771-782. <https://doi.org/10.1080/03235400903187444>
- Okungbowa F and Shittu H. 2012. *Fusarium* wilts: an overview. *Environmental Research Journal* 6(2): 83-102. [https://www.researchgate.net/profile/Hakeem-Shittu/publication/292243135\\_Fusarium\\_Wilts\\_An\\_Overview/links/56b252c908ae795dd5c7b24f/Fusarium-Wilts-An-Overview.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hakeem-Shittu/publication/292243135_Fusarium_Wilts_An_Overview/links/56b252c908ae795dd5c7b24f/Fusarium-Wilts-An-Overview.pdf)
- Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velázquez-Valle R and Reveles-Torres L. 2021. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 95-114. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1808-6>
- Pérez-Almeida I, Morales-Astudillo R, Medina-Litardo R, Salcedo-Rosales G, Dascon A y Solano-Castillo T. 2016. Evaluación molecular de genotipos de tomate por su resistencia a *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum* con fines de mejoramiento. *Revista Bioagro* 28(2): 107-116. <http://www.ucla.edu/v/bioagro/Rev28%282%295.5%20ms%201540.pdf>
- Petit-Houdenet Y and Fudal I. 2017. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Frontiers in Plant Science* 8(1072): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
- Poveda J, Abril-Urías P and Escobar C. 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. *Frontiers in Microbiology* 11(992): 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Ramírez-Valdespino C, Casas-Flores S and Olmedo-Monfil V. 2019. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers In Microbiology* 10(1030): 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
- Rodríguez-Cabello J, Pérez-González A, Ortega-García L y Arteaga-Barrueta M. 2020. Estudio hidrosostenible en el cultivo del tomate, su efecto en el rendimiento y calidad del fruto. *Cultivos Tropicales* 41(2): 1-15. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362020000200006&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362020000200006&lng=es&nrm=iso)
- De Miguel-Rojas C. 2014. Papel de los reguladores moleculares Fbp1 y Bmh2 en la virulencia de *Fusarium oxysporum*. Departamento de genética de la Universidad de Córdoba. <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/12019/2014000000949.pdf?sequence=1>
- Ronnie-Gakegne E y Martínez-Coca B. 2018. Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. *Revista de Protección Vegetal* 33(2): 1-9. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522018000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es#B7](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es#B7)
- Sánchez-Espinosa A, Villarruel-Ordaz J and Maldonado-Bonilla L. 2020. The cause and potential solution to the *Fusarium* wilt disease in banana plants. *Terra Latinoamericana* 38(2): 435-442. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.617>
- Sharma I and Sharma A. 2020. *Trichoderma-Fusarium* interactions: A biocontrol strategy to manage wilt. Pp: 167-185. In: Sharma A and Sharma P (eds.). *Trichoderma: Host pathogen interactions and applications*. USA. 331p
- Sharma L and Marques G. 2018. *Fusarium*, an entomopathogen-a myth or reality? *Pathogens* 7(4): 1-15. <https://doi.org/10.3390/pathogens7040093>
- Silva R, Neves V, Stecca A, Vieira E, Ferreira E and Ulhoa C. 2019. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology* 123(8): 565-583. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>
- Sonkar P. 2019. Determination of interaction between *Trichoderma asperellum* and *Fusarium oxysporum* sp. by digital light microscopy and confocal microscopy. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 11(1): 1-4. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000407>
- Sood M, Kapoor D, Kumar D, Sheteiwy M, Ramakrishnan M, Landi M, Araniti, F and Sharma A. 2020. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitasking biocontrol agent. *Plants* 9(6): 1-25. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Srinivas C, Nirmala D, Narasimha K, Dhananjaya C, Lakshmeesha T, Singh B, Kumar N, Niranjana S, Hashem A, Alqarawi A, Tabassum B, Fathy E, Nayaka C and Srivastava R. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: biology to diversity-a review. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1315-1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Thrall P, Barrett L, Doods P and Burdon J. 2016. Epidemiological and evolutionary outcomes in gene-for-gene and matching allele models. *Frontiers in Plant Science* 6(1084): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01084>
- Vargas-Hoyos H y Gilchrist-Ramelli E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología* 42(1): 9-16. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802015000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802015000200003&script=sci_arttext)
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra J y Martínez-Escudero E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* 64(2): 194-205. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Vos C, De Cremer K, Cammue B and De Coninck B. 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology* 16(4): 400-412. <https://doi.org/10.1111/mpp.12189>

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): 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179957>

# Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*)

## Fungicidas y *Bacillus subtilis* contra hongos aislados en semilla comercial de pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*)

Alicia Zárate-Ramos, Adrián Raymundo Quero-Carrillo, Leonor Miranda-Jiménez, Cristian Nava-Díaz, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México. CP 56230; Leticia Robles-Yerena\*, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria- SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, México. CP 55740.  
\*Corresponding author: leticia.robles.i@senasica.gob.mx

Received: April 22, 2021.

Accepted: October 08, 2021.

Zárate-Ramos A, Quero-Carrillo AR, Miranda-Jiménez L, Nava-Díaz C and Robles-Yerena L. 2022. Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*). Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 103-115.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-4>

First DOI publication: December 06, 2021.

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** Banderita (*Bouteloua curtipendula*), produces abundant and appetizing forage for cattle under extreme arid conditions. The demand for its seed in Mexico is a direct function of the potential for the establishment of pastures and therefore, the sanitary quality of this is fundamental. Phytopathogenic fungi affect the seed and establishment of prairies. The objective was to evaluate *in vitro* the effect of six agrochemicals and one biological against fungi associated with

**Resumen.** Banderita (*Bouteloua curtipendula*), produce forraje abundante y apetente para el ganado bajo condiciones áridas extremas. La demanda de su semilla en México está en función directa del potencial de establecimiento de praderas y por ello, la calidad sanitaria de esta es fundamental. Hongos fitopatógenos afectan la semilla y establecimiento de praderas. El objetivo fue evaluar *in vitro* el efecto de seis agroquímicos y un biológico contra hongos asociados a semilla de Banderita, para reducir pérdidas causadas por estos. Se realizaron tratamientos en medio de cultivo PDA combinado con Captan, Tiofanato-metil, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol y *Bacillus subtilis* a concentraciones según el caso de 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L<sup>-1</sup>, contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*. Se midió el diámetro bidireccional de colonias cada 48 h. La concentración efectiva de 50% se estimó mediante un modelo de regresión no lineal; en relación al porcentaje de inhibición

Banderita seed, to reduce losses caused by these. Treatments were carried out in PDA culture medium combined with Captan, Thiophanate-methyl, Mancozeb, Benomil, Prochloraz, Thiabendazole and *Bacillus subtilis* at concentrations according to the case of 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1.5, 10, 100, 150, 200, 250 and 300 mg L<sup>-1</sup>, against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum*. The bi-directional colony diameter was measured every 48 h. The effective concentration of 50% was estimated by a non-linear regression model; in relation to the percentage of inhibition of mycelial growth. *Bacillus subtilis* presented higher mycelial inhibition 97% ( $P < 0.05$ ), followed by Thiophanate-methyl (96%), Prochloraz (94%), Captan (93%) and Mancozeb (92%). Benomyl and Thiabendazole showed low inhibition of fungi with 46 and 37%. *B. subtilis* and Thiophanate-methyl are the products with the greatest possibility of controlling pathogens associated with *Banderita* grass seeds.

**Key words:** biological control, chemical control, *Bacillus subtilis*, CE<sub>50</sub>.

The arid and semiarid areas of Mexico account for over 50% of the country's area and they are divided into scrublands (85%) and grasslands (15%), as opposed to 150 years ago (PMARP, 2012). Due to this, Sánchez *et al.* (2018) point out the importance of the native grasses to recover the older condition and functionality of grass without altering the vulnerable arid ecosystem. To establish rainfed prairies using seeds (*sensu lato*), there are recommendations such as using complete propagules (glumes, grasses, palea, awns and modified twigs) or caryopses, which will have a larger embryo, more endosperm, seedling weight and vigor, the larger it is (Quero *et al.*, 2016; Quero

de crecimiento micelial. *Bacillus subtilis* presentó mayor inhibición micelial 97% ( $P < 0.05$ ), seguido de Tiofanato-metil (96%), Procloraz (94%), Captan (93%) y Mancozeb (92%). Benomilo y Tiabendazol mostraron baja inhibición de los hongos con 46 y 37%. *B. subtilis* y Tiofanato-metil son los productos con mayor posibilidad de controlar patógenos asociados a semillas de pasto Banderita.

**Palabras clave:** Control biológico, control químico, *Bacillus subtilis*, CE<sub>50</sub>.

Las zonas áridas y semiáridas en México representan más de 50% de territorio y se dividen en matorrales (85%) y pastizales (15%), situación contraria hace 150 años (PMARP, 2012). Por ello, Sánchez *et al.* (2018), indican la importancia de las gramíneas nativas para recuperar la antigua condición y funcionalidad del pastizal sin alterar el ecosistema árido vulnerable. Para establecer praderas de temporal utilizando semilla (*sensu lato*), existen recomendaciones como usar propágulos completos (glumas, lemas, paleas, aristas y ramillas modificadas) o cariósides; la cual, entre más grande, tendrá embrión grande, mayor endospermo, peso y vigor de plántula (Quero *et al.*, 2016; Quero *et al.*, 2017). Sin embargo, un problema que se puede tener son los hongos patógenos asociados a semilla de especies forrajeras de importancia que pueden resultar en enfermedades en el ganado (Pirelli *et al.*, 2016), por lo que una semilla infectada y/o contaminada puede introducir un patógeno en un lote/región/país (Sandoval *et al.*, 2012). Los tratamientos de semilla son una herramienta efectiva para combatir los impactos negativos de enfermedades, ayudan a los agricultores a producir cultivos de mejor calidad (FAO y AfricaSeeds, 2019). Los tratamientos erradicantes son más especializados que los preventivos y están diseñados para eliminar

*et al.*, 2017). However, one possible problem one may come across is the pathogenic fungi related to the seeds of important forage species that may result in cattle diseases (Pirelli *et al.*, 2016), therefore one infected and/or contaminated seed may introduce a pathogen in a plot/region/country (Sandoval *et al.*, 2012). Seed treatments are an efficient tool against the negative impacts of diseases, and they help farmers produce higher-quality crops (FAO and AfricaSeeds, 2019). Eradicating treatments are more specialized than preventive ones, and they are designed to eliminate a specific pathogen by physical or chemical means, and can be effective against states of profound infection, since they can penetrate seed tissue and kill pathogens without causing phytotoxicity. The biological control of seed-transmitted pathogens is performed via three mechanisms: resistance induction, competition or elimination of the pathogen and the production of antibiotics, and they are based on the antagonism that microorganisms may have with each other (Maude, 1985). In the market there are contact agrochemicals, which persist on the plant's exterior (foliar application) and stop the fungi from germinating and penetrating the crop's cells, a few of which include include Captan, Zineb, Maneb, Mancozeb, Thiram, Folpet, Quintozane and Clorotalonil (Chirinos *et al.*, 2020). Another group, the systemic agrochemicals, are absorbed via the foliage, stems and roots and where the vascular system helps spread the active compounds throughout the plant (Arriagada, 2000). The use of agrochemicals entails the knowledge of its mechanism of action to avoid the risk of resistance, therefore knowledge on the sensitivity of the pathogen to the fungicide is vital for the adequate sanitary control of the seed (Sandoval *et al.*, 2012). The most widely used method to determine sensitivity is to integrate a pesticide

un patógeno específico por medios físicos o químicos, estos pueden ser efectivos contra estados de infección profundos, ya que pueden penetrar el tejido de las semillas y matar patógenos sin causar fitotoxicidad. El control biológico de patógenos transmitidos por semillas se realiza a través de tres mecanismos, la inducción de resistencia, la competencia o eliminación del patógeno y la producción de antibióticos y están basados en el antagonismo que los microorganismos puedan presentar entre sí (Maude, 1985). Dentro de los agroquímicos, existe en el mercado los de contacto que persiste en el exterior de la planta (aplicación foliar), que evitan que las esporas de los hongos germinen y penetren en las células del cultivo, por mencionar algunos de ellos: Captan, Zineb, Maneb, Mancozeb, Tiram, Folpet, Quintozano y Clorotalonil (Chirinos *et al.*, 2020). Otro grupo de agroquímicos, son los sistémicos, que se absorben a través del follaje, tallos y raíces y donde el sistema vascular ayuda a dispersar los compuestos activos por toda la planta (Arriagada, 2000). El uso de los agroquímicos, conlleva a conocer su modo de acción para evitar riesgo de resistencia, por ello, conocer la sensibilidad del patógeno al fungicida es vital para el buen control sanitario de la semilla (Sandoval *et al.*, 2012). El método más utilizado para determinar sensibilidad, es integrar al medio de cultivo algún producto plaguicida bajo niveles controlados y condiciones de laboratorio (Dhingra y Sinclair, 1995). En México, la necesidad de recursos genéticos forrajeros que garanticen establecimiento, calidad, alta persistencia y adaptación a condiciones regionales hace necesarios estudios sobre sanidad de semilla (Quero *et al.*, 2007) y, además, conocer la sensibilidad de los agroquímicos para integrar el manejo en la sanidad de la semilla. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar el efecto *in vitro* de seis fungicidas y un biológico (*Bacillus subtilis*)

product, under controlled levels and laboratory conditions, into the culture medium (Dhingra and Sinclair, 1995). In Mexico, the need for forage genetic resources that guarantee the establishment, quality, high persistence and adaptation to regional conditions makes studies on seed health crucial (Quero *et al.*, 2007), as well as to know the sensitivity of agrochemicals in order to integrate the management of seed health. Therefore, the aim of this investigation was to determine the *in vitro* effect of six fungicides and one biological one (*Bacillus subtilis*) against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum*.

*A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum* cultures were used, isolated from commercial *B. curtipendula* seeds, harvested in 2017 (Quero *et al.*, 2020). The cultures were planted in a PDA (potato-dextrose-agar) medium for eight days, at  $28 \pm 2$  °C. Commercial fungicides were evaluated: contact (Captan and Mancozeb), systemic (Benomyl, Prochloraz, Thiabendazole and Thiophanate-methyl) and a *B. subtilis* based biological product. Final concentrations were calculated based on the active ingredient and the volume of PDA medium to be prepared (Table 1). The effect of the product was determined with the aggregation of the fungicide

contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*.

Se emplearon colonias de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*, aisladas de semilla comercial de *B. curtipendula* cosechada en 2017 (Quero *et al.*, 2020). Las colonias se sembraron en medio PDA (papa-dextrosa-agar) durante ocho días, a  $28 \pm 2$  °C. Se evaluaron fungicidas comerciales: de contacto (Captan y Mancozeb), sistémicos (Benomilo, Prochloraz, Tiabendazol y Tiofanato-metil) y un producto biológico a base de *B. subtilis*. Las concentraciones finales se calcularon con base al ingrediente activo y volumen a preparar de medio PDA (Cuadro 1). El efecto del producto se determinó por agregación del fungicida al medio de cultivo PDA (Dhingra y Sinclair, 1995) a diferente concentración: 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 y 300 mg L<sup>-1</sup>. Se sembró un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro en el centro de cajas Petri, con tres repeticiones por concentración. Los discos se obtuvieron de colonias puras de seis días de crecimiento en PDA, incubadas en oscuridad a  $25 \pm 2$  °C. Se midió el diámetro bidireccional de colonias cada 48 h, hasta que el testigo llenó la caja y, por promedio, se calculó el crecimiento micelial:

**Table 1. Fungicides, active ingredients and concentrations used against isolated fungi (*A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum*) in commercial *Bouteloua curtipendula* seeds.**

**Cuadro 1. Fungicidas, ingrediente activo y concentración utilizada contra hongos aislados (*A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*) en semilla comercial de *Bouteloua curtipendula*.**

| Fungicida      | Ingrediente Activo       | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |
|----------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Captan 50 WP®  | Captan                   | 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100, 200        |
| Manzate 200®   | Mancozeb                 | 1, 150, 250, 300                    |
| Promyl 50 PH®  | Benomilo                 | 1, 5, 10, 100                       |
| Sportak® 45 CE | Prochloraz               | 0.001, 0.01, 0.1, 1                 |
| Tecto 60®      | Tiabendazol              | 0.1, 0.5, 1, 5                      |
| Prontius®      | Tiofanato-metil          | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10      |
| Serenade Soil® | <i>Bacillus subtilis</i> | 0.005, 0.01, 0.05, 1                |

to the PDA culture medium (Dhingra and Sinclair, 1995) at different concentrations: 0 (control), 0.005, 0.001, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 100, 150, 200, 250 and 300 mg L<sup>-1</sup>. A mycelium disk, 0.5 cm in diameter, was planted in the center of Petri dishes, with three repetitions per concentration. The disks were obtained from pure cultures with a growth of six days in PDA and incubated in the dark at 25 ± 2 °C. The bidirectional diameter of cultures was measured every 48 h, until the control filled the dish, and with the average, the mycelial growth was calculated:

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

where: *IM*, inhibition of mycelial growth (%); *CML*, Mycelial growth; *CMI*, Influenced mycelial growth (Patiño and Rodríguez, 2001).

A completely random design was used and, using the data on inhibition percentages, a simple analysis of variance was carried out for each pathogen. Since the normal distribution of data was not carried out, these were transformed by the arcsine (Gabriel *et al.*, 2021) and the comparison of averages using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) using the statistics program R. The effective concentration (CE<sub>50</sub>) was obtained by transforming each concentration [ $\log(x)$ ] and relating it with the percentage of inhibition.

In most treatments, the mycelial growth of the pathogens was reduced in comparison with the control. Both the sensitivity of *A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum* to the different concentrations of the fungicides evaluated, and the calculation of the highest effective concentration that inhibits 50% of the mycelial growth of the fungus (CE<sub>50</sub>) (Table 2), were determined eight days after planting.

**Effect on the mycelial growth of *Alternaria alternata*.** Thiabendazole and Benomyl in different

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

dónde: *IM*, inhibición crecimiento micelial (%); *CML*, Crecimiento micelial; *CMI*, Crecimiento micelial influenciado (Patiño y Rodríguez, 2001).

Se utilizó un diseño completamente al azar y, con los datos de porcentaje de inhibición, se realizó un análisis de varianza simple, por patógeno. Al no cumplirse la distribución normal de datos, estos se transformaron mediante arcoseno  $y = \text{asin} \sqrt{\frac{y}{100}}$  (Gabriel *et al.*, 2021) y la comparación de medias con Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el programa estadístico R. La concentración efectiva (CE<sub>50</sub>) se obtuvo al transformar cada concentración [ $\log(x)$ ] y relacionarla con el porcentaje de inhibición.-

En la mayoría de los tratamientos se obtuvo una reducción de crecimiento micelial de los patógenos con respecto al control. Tanto la sensibilidad de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*, a las diferentes concentraciones de los fungicidas evaluados, como el cálculo de la mayor concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial del hongo (CE<sub>50</sub>) (Cuadro 2), fueron determinadas a ocho días después de la siembra.

**Efecto sobre el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*.** Tiabendazol y Benomilo en diferentes concentraciones no fueron eficientes para inhibir el hongo; lo anterior, debido a que se observó un máximo de 7.2 y 10.8% de inhibición con dosis más altas 5 y 100 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 2). Estos datos coinciden con Herrera *et al.* (2011) y Cristóbal *et al.* (2013), quienes indicaron que, con dosis de 500 y 450 mg L<sup>-1</sup> de Benomilo, se inhibe 35.6 y 45% del crecimiento de *Alternaria* spp., concentraciones mayores a las evaluadas en este experimento. En el caso de Captan se observó inhibición de 83.3% a 200 mg L<sup>-1</sup>, superior a lo que reportaron Parveen *et al.* (2013)

**Table 2. Mycelial growth inhibition in *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum* with different concentrations of fungicides and *Bacillus subtilis*.**

**Cuadro 2. Inhibición de crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* con diferentes concentraciones de fungicidas y *Bacillus subtilis*.**

| Fungicida                 | Concentración<br>mg L <sup>-1</sup> | % de Inhibición del crecimiento micelial |                                 |                                |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                           |                                     | <i>Alternaria<br/>alternata</i>          | <i>Bipolaris<br/>cynodontis</i> | <i>Fusarium<br/>incarnatum</i> |
| <b>Captan</b>             | 0.1                                 | 0.0                                      | 0.0                             | 2.3                            |
|                           | 0.5                                 | 0.0                                      | 0.4                             | 6.4                            |
|                           | 1                                   | 3.6                                      | 7.2                             | 8.6                            |
|                           | 5                                   | 7.4                                      | 17.6                            | 10.0                           |
|                           | 10                                  | 8.0                                      | 19.7                            | 51.5                           |
|                           | 100                                 | 77.0                                     | 100                             | 89.5                           |
|                           | 200                                 | 83.3                                     | 100                             | 97.8                           |
| <b>Mancozeb</b>           | 1                                   | 14.3                                     | 7.9                             | 1.7                            |
|                           | 150                                 | 84.5                                     | 100                             | 84.3                           |
|                           | 250                                 | 84.5                                     | 100                             | 91.7                           |
|                           | 300                                 | 85.0                                     | 100                             | 93.0                           |
| <b>Benomilo</b>           | 1                                   | 2.2                                      | 21.5                            | 5.0                            |
|                           | 5                                   | 5.5                                      | 19.5                            | 25.0                           |
|                           | 10                                  | 7.7                                      | 18.4                            | 46.3                           |
|                           | 100                                 | 10.8                                     | 27.7                            | 100                            |
| <b>Procloraz</b>          | 0.001                               | 6.6                                      | 24.7                            | 22.5                           |
|                           | 0.01                                | 37.6                                     | 41.5                            | 67.9                           |
|                           | 0.1                                 | 56.3                                     | 80.0                            | 78.4                           |
|                           | 1                                   | 84.1                                     | 100                             | 100                            |
| <b>Tiabendazol</b>        | 0.1                                 | 0.0                                      | 0.0                             | 0.0                            |
|                           | 0.5                                 | 0.0                                      | 0.0                             | 1.4                            |
|                           | 1                                   | 1.5                                      | 1.2                             | 53.1                           |
|                           | 5                                   | 7.2                                      | 4.5                             | 100                            |
| <b>Tiofanato-metil</b>    | 0.01                                | 0.0                                      | 0.0                             | 9.9                            |
|                           | 0.05                                | 0.0                                      | 4.2                             | 15.1                           |
|                           | 0.1                                 | 0.0                                      | 7.9                             | 29.8                           |
|                           | 0.5                                 | 40.2                                     | -                               | 50.2                           |
|                           | 1                                   | 52.5                                     | 76.1                            | 62.5                           |
|                           | 5                                   | 57.5                                     | -                               | 65.0                           |
|                           | 10                                  | 100                                      | 100                             | 88.5                           |
| <b><i>B. subtilis</i></b> | 0.005                               | 90.2                                     | 94.7                            | 96.9                           |
|                           | 0.01                                | 92.0                                     | 100                             | 100                            |
|                           | 0.05                                | 93.0                                     | 100                             | 100                            |
|                           | 1                                   | 93.0                                     | 100                             | 100                            |

concentrations were not efficient in inhibiting the fungus, since a maximum inhibition of 7.2 and 10.8% were observed with higher doses and 5 and 100 mg L<sup>-1</sup>, respectively (Table 2). These data coincide with Herrera *et al.* (2011) and Cristóbal

con 36% de inhibición de *A. alternata* a la misma concentración. Mancozeb mostró datos similares a Captan con 85% de inhibición, pero a dosis superior (Cuadro 2). Malandrakis *et al.* (2015) indicaron datos similares para *A. alternata*. Procloraz



*et al.* (2013), who indicated that, with doses of 500 and 450 mg L<sup>-1</sup> of Benomyl, 35.6 and 45% of the growth of *Alternaria* spp. is inhibited; these concentrations are higher than those evaluated in this experiment. In the case of Captan, an inhibition of 83.3% was observed at 200 mg L<sup>-1</sup>, higher than what was reported by Parveen *et al.* (2013) with an inhibition of 36% of *A. alternata* at the same concentration. Mancozeb displayed similar data to Captan with an 85% inhibition, but at a higher dose (Table 2). Malandrakis *et al.* (2015) indicated similar data for *A. alternata*. Prochloraz displayed a similar inhibition rate to Mancozeb and Captan, with 84.1%, but at a lower dose (1 mg L<sup>-1</sup>), and therefore this product may be feasible for the control of this fungus. Iacomí *et al.* (2004) report an inhibition of 100% for *A. alternata* in radish plants, higher than the data reported for this work. Only Thiophanate-methyl (10 mg L<sup>-1</sup>) produced an inhibition of 100% at the highest dose. *B. subtilis*, starting at 0.05 and 1 mg L<sup>-1</sup>, produced an inhibition of 93%, similar to reports by Ñacato *et al.* (2018), who determined *B. subtilis* to be highly efficient for the biological control against *Alternaria* spp. (Table 2).

**Effect on the mycelial growth of *Bipolaris cynodontis*.** Thiabendazole (5 mg L<sup>-1</sup>) and Benomyl (100 mg L<sup>-1</sup>) displayed the lowest efficiency in the inhibition of the mycelial growth of *B. cynodontis*, with inhibitions of 4.5 and 27.7%. Alburqueque and Gusqui (2018) reported an inhibition of 10.3% on *Phytophthora infestans*; 37%, for *Botrytis cinerea* and 100% for *Rhizoctonia solani*, at 200 mL L<sup>-1</sup> of Thiabendazole, with a higher dose in comparison with this investigation.

Captan, Mancozeb, Prochloraz and Thiophanate-methyl inhibited the fungus by 100% at high concentrations, which was lower than reports by Imran *et al.* (2013), who registered an inhibition of

presentó inhibición similar a Mancozeb y Captan, con 84.1%, pero, a dosis inferior (1 mg L<sup>-1</sup>); por tanto, este producto podría ser viable para el control de este hongo. Iacomí *et al.* (2004) reportan inhibición del 100% para *A. alternata* en rábano, superior a los datos reportados en este trabajo. Solo Tiofanato-metil (10 mg L<sup>-1</sup>) inhibió 100% a la dosis más alta evaluada. Para *B. subtilis*, a partir de 0.05 y 1 mg L<sup>-1</sup> inhibió el 93%, similar a lo reportado por Ñacato *et al.* (2018), quienes determinaron a *B. subtilis* como altamente eficiente para el control biológico contra *Alternaria* spp. (Cuadro 2).

**Efecto sobre el crecimiento micelial de *Bipolaris cynodontis*.** Tiabendazol (5 mg L<sup>-1</sup>) y Benomilo (100 mg L<sup>-1</sup>), fueron los de menor eficiencia para inhibir el crecimiento micelial de *B. cynodontis* con 4.5 y 27.7% de inhibición. Alburqueque y Gusqui (2018), reportaron 10.3% de inhibición de *Phytophthora infestans*; 37%, para *Botrytis cinerea* y 100%, para *Rhizoctonia solani*, a 200 mL L<sup>-1</sup> de Tiabendazol, con dosis superior comparado con esta investigación.

Captan, Mancozeb, Prochloraz y Tiofanato-metil inhibieron 100% del hongo a altas concentraciones evaluadas, datos inferiores a lo reportado por Imran *et al.* (2013), donde registraron el 53% de inhibición de *B. oryzae* a 50 mg L<sup>-1</sup>. Arce *et al.* (2019), puntualizaron que los porcentajes de inhibición de *Bipolaris* spp. con Benomil, Mancozeb y Tiofanato-metil fueron bajos, en comparación a los valores observados en la presente investigación (Cuadro 2). Rondón *et al.* (2006) reportan datos similares de inhibición (100%) en *Colletotrichum gloeosporioides* con Prochloraz y a partir de 100 mg L<sup>-1</sup>.

Para el caso particular del producto biológico *B. subtilis*, este fue más eficiente que los fungicidas químicos a las concentraciones evaluadas, con porcentaje de inhibición micelial de 94.7 a 100%. Datos similares a aquellos reportados por Rivero

53% of *B. oryzae* at 50 mg L<sup>-1</sup>. Arce *et al.* (2019) pointed out that the percentages of inhibition of *Bipolaris* spp. with Benomyl, Mancozeb and Thiophanate-methyl were low in comparison with the values observed in this investigation (Table 2). Rondón *et al.* (2006) report similar data for inhibition (100%) in *Colletotrichum gloeosporioides* with Prochloraz and starting at 100 mg L<sup>-1</sup>.

For the particular case of the biological product *B. subtilis*, this was more efficient than the chemical fungicides at the concentrations evaluated, with a percentage of mycelial inhibition between 94.7 and 100%. The data are similar to those reported by Rivero *et al.* (2008). For *B. subtilis*, a CE<sub>50</sub> of 0.00023 mg L<sup>-1</sup> is reported. This concentration is lower than the rest of the fungicides evaluated (Table 3).

**Effect on the mycelial growth of *Fusarium incarnatum*.** Thiophanate-methyl displayed a lower efficiency of mycelial inhibition for the fungus in the highest dose, with 88.5%. The rest of the fungicides displayed an efficiency of mycelial inhibition between 93 and 100% in the highest doses evaluated. These data show the susceptibility of the fungus to the fungicides evaluated. Regarding CE<sub>50</sub>, Mancozeb requires high doses (300 mg L<sup>-1</sup>)

*et al.* (2008). Para *B. subtilis* se reporta un CE<sub>50</sub> de 0.00023 mg L<sup>-1</sup>, concentración inferior al resto fungicidas evaluados (Cuadro 3).

**Efecto sobre el crecimiento micelial de *Fusarium incarnatum*.** El Tiofanato-metil presentó menor eficiencia de inhibición micelial para el hongo en la dosis más alta evaluada, con 88.5% de inhibición. El resto de los fungicidas presentaron eficiencia de inhibición micelial que osciló de 93 a 100%, en las dosis más elevadas evaluadas. Estos datos evidencian la susceptibilidad del hongo a los fungicidas evaluados. Respecto a CE<sub>50</sub>, Mancozeb requiere altas dosis (300 mg L<sup>-1</sup>) para inhibir 50% de hongo, por lo que su eficiencia fue baja. Por otra parte, *B. subtilis* (CE<sub>50</sub> a 0.00014 mg L<sup>-1</sup>) fue eficiente en todas las dosis evaluadas, con inhibición que osciló de 97 a 100%, mostrando que, a partir de 0.01 mg L<sup>-1</sup> inhibió el 100% a *F. incarnatum*. Romero *et al.* (2015), obtuvieron datos similares con *B. subtilis* a dosis de 0.01 mg L<sup>-1</sup> contra *F. solani*, aislado de chayote; por otro lado, Song *et al.* (2014) observaron que a concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC de *B. subtilis*, se alcanzó un control de 70% contra *F. incarnatum*, aislado de raíz de Ginseng (*Panax ginseng*).

**Table 3. Doses of the fungicides that inhibit 50% of the mycelial growth in fungi isolated from commercial *Bouteloua curtipendula* seeds.**

**Cuadro 3. Dosis de los fungicidas que inhiben 50% del crecimiento micelial en hongos aislados de semilla comercial de *Bouteloua curtipendula*.**

| Producto           | CE <sub>50</sub> mg L <sup>-1</sup> |                             |                            |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                    | <i>Alternaria alternata</i>         | <i>Bipolaris cynodontis</i> | <i>Fusarium incarnatum</i> |
| Captan             | 61.90                               | 37.44                       | 16.48                      |
| Mancozeb           | 4.40                                | 9.50                        | 36.00                      |
| Benomilo           | >100                                | >100                        | 14.50                      |
| Prochloraz         | 0.014                               | 0.018                       | 0.004                      |
| Tiabendazol        | >5.00                               | >5.00                       | 2.66                       |
| Tiofanato-metil    | 0.77                                | 0.49                        | 0.28                       |
| <i>B. subtilis</i> | 0.00015                             | 0.00023                     | 0.00014                    |

to inhibit 50% of the fungus, therefore its efficiency was low. On the other hand, *B. subtilis* ( $CE_{50}$  at  $0.00014 \text{ mg L}^{-1}$ ) was efficient in all doses evaluated, with inhibitions ranging from 97 to 100%, showing that, starting at  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ , it inhibited *F. incarnatum* by 100%. Romero *et al.* (2015) obtained similar data with *B. subtilis* at doses of  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  against *F. solani* isolated from chayote. On the other hand, Song *et al.* (2014) observed that at a concentration of  $1 \times 10^6$  UFC of *B. subtilis*, a control of 70% was reached against *F. incarnatum*, isolated from ginseng (*Panax ginseng*) roots.

Captan inhibited an average of 93% of the mycelial growth of the three fungi (Table 3), due to its multisite action that interferes with the cell respiration mechanism, making mycelial development difficult and translocating to different tissues to seeds or soil from the treatment (Peláez *et al.*, 2016). Mancozeb presented an efficiency of 93%. Its mechanism of action is based on the modification and inactivation of proteins sensitive to redox, such as those for transcription, translation, and DNA oxidative stress, as well as other metabolic processes that result in cytotoxicity and with a multisite action that generates no resistance in the pathogen (Roede and Miller, 2014). Benomyl was only effective for *F. incarnatum*, which, like Thiabendazole, was effective only for *Fusarium*; this was also observed with Benomyl, since they belong to the same chemical group and have similar mechanisms of action (Peláez *et al.*, 2016). Sandoval *et al.* (2011) mentioned that *Fusarium* is sensitive to Benomyl. However, it is likely to be mutagenic and may increase the resistance of pathogens to its effect. On the other hand, Prochloraz displayed an effectiveness of 94%. This fungicide belongs to the chemical group of the Imidazoles, with a preventive, interlaminar, systemic, and curative action that inhibits the biosynthesis of ergosterol in the fungal cell membrane, which also relates to cell

Captan inhibió en promedio, 93% del crecimiento micelial de los tres hongos (Cuadro 3); lo anterior, debido a su modo de acción multisitio que interfiere con el mecanismo de respiración celular, dificultando el desarrollo micelial y translocándose hacia diversos tejidos a partir del tratamiento a semillas o suelo (Peláez *et al.*, 2016). Mancozeb presentó efectividad de 93%, su mecanismo de acción se basa en la modificación e inactivación de proteínas sensibles a redox como aquellas para transcripción, traducción y estrés oxidativo del ADN, además de otros procesos metabólicos que resultan en citotoxicidad; además, a través de un modo de acción de multisitio que no genera resistencia en el patógeno (Roede y Miller, 2014). Benomilo solo fue efectivo para *F. incarnatum*; al igual que Thiabendazol, resultó efectivo solo para *Fusarium*; lo anterior se observó también con Benomilo, dado que pertenecen al mismo grupo químico y poseen similitud de acción (Peláez *et al.*, 2016). Sandoval *et al.* (2011) mencionaron que *Fusarium* es sensible a Benomilo; sin embargo, es probable que sea mutagénico y puede incrementar el grado de resistencia de patógenos ante su efecto. Por otro lado, Prochloraz presentó efectividad de 94%, este fungicida pertenece al grupo químico de Imidazoles, con acción preventiva, translaminar, sistémica y curativa que inhibe la biosíntesis de ergosterol en la membrana celular fúngica, mismo que se relaciona con el crecimiento y división celular (Tapia, 2005). Tiofanato-metil presentó alta efectividad de inhibición (96%) de crecimiento de las tres especies de hongos investigadas, este es un fungicida sistémico (con movimiento en la planta a través de xilema), de tipo preventivo; el cual, causa anomalías en la germinación de esporas, interfiere en la mitosis y la síntesis del ADN de las células fúngicas (Alburquerque y Gusqui, 2018). Es reconocido que el tratamiento a semillas controla patógenos de raíz como *Rhizoctonia* y *Fusarium* spp.; sin embargo,

growth and division (Tapia, 2005). Thiophanate-methyl displayed a high effectiveness in the inhibition (96%) of growth in the three species of fungi investigated. This is a systemic fungicide (with movement in the plant through the xylem), of the preventive type, which causes abnormalities in the germination of spores, interferes in mitosis and the DNA synthesis of fungal cells (Alburqueque and Gusqui, 2018). The treatment on seeds is known to control root pathogens, such as *Rhizoctonia* and *Fusarium* spp., although the best inhibitor was the biological inhibitor *B. subtilis*, since the minimum concentration evaluated ( $0.005 \text{ mg L}^{-1}$ ) inhibited 97% of the mycelial growth of the three fungal species of phytopathogenic fungi isolated earlier and defined as dominant in commercial *B. curtipendula* seeds. *B. subtilis* has been identified as a producer of a wide range of bioactive compounds that potentially inhibit the growth of phytopathogenic fungi (Bottero *et al.*, 2017), which have several action mechanisms, altering cell processes such as the intracellular calcium homeostasis, energetic metabolism, and the processing of RNA (Villareal *et al.*, 2018).

The evaluated concentrations are represented by their logarithmic analog, resulting in the sigmoidal line in which *B. subtilis* establishes a clear antagonistic response and has a high resistance to handling and easy acquisition in the market, making it a valuable tool to optimize the establishment of prairies of this species, thus improving the seed's health safety.

The results show the effectiveness of the fungicides evaluated for the control of the three fungi, with the exception of Benomyl and Thiabendazole. Combining contact + systemic fungicides is a common practice that supplements the treatment, ensuring the protection of the seed and its germination by suppressing the action of phytopathogenic fungi (Arriagada, 2000).

el mejor inhibidor fue el biológico *B. subtilis*; lo anterior, dado que a la concentración mínima evaluada ( $0.005 \text{ mg L}^{-1}$ ) inhibió 97% del crecimiento micelial de las tres especies de hongos fitopatógenos aislados previamente y definidos como dominantes en semilla comercial de *B. curtipendula*. Se ha identificado a *B. subtilis* como productor de una amplia gama de compuestos bioactivos potencialmente inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos (Bottero *et al.*, 2017); los cuales, tienen múltiples mecanismos de acción, alterando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento de ARN (Villareal *et al.*, 2018).

Las concentraciones evaluadas están representadas por su análogo logarítmico, dando como resultado la línea sigmoidea donde *B. subtilis* establece una marcada respuesta antagonista, la cual, además, posee elevada resistencia al manejo y de fácil adquisición en el mercado, por lo que es una herramienta valiosa para optimizar el establecimiento de praderas de esta especie, mejorando así la sanidad de la semilla.

Los resultados muestran la efectividad de los fungicidas evaluados para el control de los tres hongos; con excepción de Benomilo y Tiabendazol. La combinación de fungicidas contacto + sistémico es una práctica común que complementan el tratamiento, asegurando la protección de la semilla y su germinación suprimiendo la acción de hongos patógenos (Arriagada, 2000).

Los fungicidas de contacto Captan y Mancozeb y los sistémicos Procloraz y Tiofanato-metil dieron resultados variables para el control de *A. alternata*, *B. cynodontis* y *F. incarnatum*. Los fungicidas sistémicos inhibieron el crecimiento micelial a bajas concentraciones; lo anterior, en comparación con aquellas alcanzadas por Captan y Mancozeb. No es recomendable el uso de Benomilo y Tiabendazol debido a la baja inhibición presentada. *Bacillus*

The contact fungicides Captan and Mancozeb and systemic fungicides Prochloraz and Thiophanate-methyl gave variable results for the control of *A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. incarnatum*. The systemic fungicides inhibited the mycelial growth at low concentrations in comparison with those reached by Captan and Mancozeb. The use of Benomyl and Thiabendazole is not recommendable due to the low inhibition displayed. *Bacillus subtilis* displayed the highest mycelial growth, starting at 90% for the lowest concentration evaluated (0.005 mg L<sup>-1</sup>), therefore representing an important alternative for the improvement of the sanitary quality of the *Bouteloua curtipendula* seogens, due to its low cost and availability in the market.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the Línea de Generación y Aplicación de Conocimiento: Innovación Tecnológica y Calidad Alimentaria en Ganadería of the Colegio de Postgraduados. To CONACyT, for the Master of Science scholarship granted to the main author.

#### LITERATURE CITED

- Alburquerque AD and Gusqui MR. 2018. Effectiveness of chemical fungicides for *in vitro* control of different phytopathogens in controlled conditions. *Arnaldoa* 25(2): 489-498. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v25n2/a09v25n2.pdf>
- Arce AC, Varela BI y Torres PS. 2019. Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana* 30(2): 381-393. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.32653>
- Arriagada V. 2000. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 228p. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/13128>
- Bottero JY, Rose J, De Garidel C, Masion A, Deutsch T, Brochard G and Lanone S. 2017. Serenade: Safer and ecodesign research and education applied to nanomaterial development, the new generation of materials safer by design. *Environmental Science: Nano*, 4(3): 526-538. <https://doi.org/10.1039/C6EN00282J>
- Chirinos DT, Castro R, Cun J, Castro J, Peñarrieta S, Solis L y Geraud F. 2020. Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 21(1): e1276. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num1\\_art:1276](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276)
- Cristóbal AJ, Navarrete MZ, Herrera PE, Mis MM, Tun SM y Ruiz SE. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genética y evaluación de fungicidas para su control. *Revista Protección Vegetal* 28(2): 138-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf>
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 132-163p. [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2200210](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2200210)
- FAO y AfricaSeeds. 2019. Materiales para capacitación en semillas - Módulo 3: Control de calidad y certificación de semillas. Roma. 128 p. <http://www.fao.org/3/ca1492es/CA1492ES.pdf>
- Flores JDY, Villegas AY, Castro RR, Carrillo RJC, Castañeda HE y Gómez VA. 2019. Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos en el rendimiento de avena forrajera. *Agroproductividad* 12(8): 23-27. <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1446>
- Gabriel OJ, Valverde LA, Indacochea GB, Castro PC, Vera TM, Aleivar CJ y Vera VR. 2021. Diseños Experimentales: Teoría y Práctica para Experimentos Agropecuarios. Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Ecuador. 146 p. <http://142.93.18.15:8080/jspui/handle/123456789/116>
- Herrera PE, Bacab PIM, Alejo JC, Tun SJM y Ruiz SE. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad* 15(4):231-236. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>

#### AGRADECIMIENTOS

A la Línea de Generación y Aplicación de Conocimiento: Innovación Tecnológica y Calidad Alimentaria en Ganadería del Colegio de Postgraduados. A CONACyT, por la beca de Maestría en Ciencias otorgada a la primera autora.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Iacomini VB, Avenot H, Bataillé SN, Laurent E and Simoneau P. 2004. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection* 23(6): 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.003>
- Imran AHM, Hussein N, Ali S, Ahmed KJ, Saleem K and Babar MM. 2013. Behavior of *Bipolaris oryzae* at different temperatures, culture media, fungicides and rice germplasm for resistance. *Pakistan J of Phytopathology* 25(1): 8-90. [https://www.researchgate.net/publication/270452094\\_Behaviour\\_of\\_Bipolaris\\_oryzae\\_at\\_different\\_temperatures\\_culture\\_media\\_fungicides\\_and\\_rice\\_germplasm\\_for\\_resistance](https://www.researchgate.net/publication/270452094_Behaviour_of_Bipolaris_oryzae_at_different_temperatures_culture_media_fungicides_and_rice_germplasm_for_resistance)
- Madia MC y Perris S. 1994. Hongos patógenos en semillas de especies forrajeras tropicales. Nota de investigación. *Pasturas Tropicales*, 16(1): 41-43. [https://tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Elements/DOCUMENTS/1994-vol16-rev1-2-3/Vol16\\_rev1\\_94\\_art9.pdf](https://tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Elements/DOCUMENTS/1994-vol16-rev1-2-3/Vol16_rev1_94_art9.pdf)
- Malandrakis AA, Apostolidou ZA, Markoglou A and Flouri F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitor and Mancozeb. *European J of Plant Pathology* 142(3): 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>
- Maude RB. 1985. Erradicative seed treatment. *Seed Science and Technology*. 11, 907-920. <https://worldveg.tind.io/record/17569>
- Merlington AA. 2014. Management options for control of *Fusarium* dry rot (*Fusarium* spp.) and potato common scab (*Streptomyces* spp.) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Michigan. Michigan State University. Thesis–Master of Science. 148 p. <https://doi.org/doi:10.25335/M5GX8R>
- Ñacato SCA, Valencia GMF y Acurio VRD. 2018. Aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en *Brassica oleracea* var. italiana. Tesis de Grado. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>
- Patiño L. y Rodríguez M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinifera*), variedad chardonnay en el viñedo dan Martin en el municipio de Sogamoso. Sogamoso: Trabajo de grado Pontificia Universidad Javeriana. 12-14
- Parveen S, Ganie AA and Wani AH. 2013. *In vitro* efficacy of some fungicides on mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Mucor pyriformis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46(10): 1230–1235. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.763617>
- Peláez ÁA, de los Santos VS, Yépez EA, Parra CFI y Reyes RRT. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6): 1401-1412. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n6/2007-0934-remexca-7-06-1401.pdf>
- Pirelli GJ, Anderson NP, Craig AM and Young CA. 2016. Endophyte toxins in grass and other feed sources. Risk to Livestock. EM-9156. Oregon State University. 10p. <https://catalog.extension.oregonstate.edu/em9156>
- PMARP (Plan Maestro de la Alianza Regional para la Conservación de los Pastizales). 2012. Plan Maestro de la Alianza Regional para la Conservación de los Pastizales del Desierto Chihuahuense 2011-2016. J. C. Guzmán-Aranda, J. Hoth y H. Berlanga (eds.). Comisión para la Cooperación Ambiental. Montreal, Canadá. 64p
- Quero CAR, Hernández GFJ, Velázquez MM, Gámez VH, Landa SP y Aguilar LP. 2016. Métodos de establecimiento de pasturas en zonas áridas de México utilizando semillas crudas o carióspsides. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales* 4(1):29-37. [https://doi.org/10.17138/tgft\(4\)29-37](https://doi.org/10.17138/tgft(4)29-37)
- Quero CAR, Hernández FJ, Pérez GP, Hernández RA, García LG, Landa SP y Ramírez SES. 2017. Germinación de carióspsides clasificados por tamaño y diásporas de cuatro pastos para temporal semiárido. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(3):489-502. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.26>
- Quero CAR, Enríquez QJF y Miranda JL. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o *status quo*. *Interciencia* 32(8): 566-571. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33932812.pdf>
- Quero CAR, Zárate RA, Robles YL, Nava DC, Miranda JL and González MS. 2020. Pathogenic fungi associated to commercial seed of Mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*. *Mexican J of Phytopathology* 38(2): 198-214. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-4>
- Rivero G.D, Martínez B, Ramírez AM, Cruz A y Rodríguez PAT. 2008. Actividad antifúngica *in vitro* de las quitosanas k1 y sigma frente a *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem. *Rev. Protección Vegetal* 23 (1): 43-47. [https://www.researchgate.net/publication/262502313\\_ACTIVIDAD\\_ANTIFUNGICA\\_in\\_vitro\\_DE\\_LAS\\_QUITOSANAS\\_k1\\_y\\_SIGMA\\_FRENTE\\_A\\_Bipolaris\\_oryzae\\_B\\_de\\_Haan\\_Shoem](https://www.researchgate.net/publication/262502313_ACTIVIDAD_ANTIFUNGICA_in_vitro_DE_LAS_QUITOSANAS_k1_y_SIGMA_FRENTE_A_Bipolaris_oryzae_B_de_Haan_Shoem)
- Roede JR and Miller GW. 2014. Mancozeb. *Encyclopedia of Toxicology*, 144-146. Elsevier Inc. (consultation, august 2018). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00157-3>
- Rondón O, Sanabria de AN y Rondón A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Tropical* 56(2): 219-235. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2006000200005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2006000200005)
- Romero VSD, Tlapal BB, Cadena IJ, Nieto DÁ y Arévalo GL. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su control *in vitro*. *Revista Agronomía Costarricense* 39(2):19-32. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/436/43642603002/43642603002.pdf>
- Sandoval CRA, Martínez PRÁ, Hernández IM, Fernández EE, Arvizu MS and Soto ML. 2011. Postharvest biological and chemical control of *Fusarium stilboides* on bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(2): 161-172. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2011000200009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000200009)
- Sandoval ME, Leyva MSG, Villaseñor MHE, Rodríguez GMF y Mariscal ALA. 2012. Diversidad de hongos en semilla de trigo de temporal. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:145-149. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n2/v30n2a5.pdf>

- Sánchez AJF, Wehenkel C, Carrete CFO, Murillo OM, Herrera TE and Quero CAR. 2018. Establishment attributes of *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. Populations native to México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(3): 237-243. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v41n3/0187-7380-rfm-41-03-237.pdf>
- Song M., Yun HY and Kim YH. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of Ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *J of Ginseng Research* 38(2): 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.016>
- Tapia C. 2005. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Meadwave* 5(4): 3548. <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3548>
- Villareal DF, Villa RE, Cira CL, Estrada AI, Parra CF y de los Santos VS. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

# Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings

## Caracterización y patogenicidad de un aislado de *Pythium aphanidermatum* causante de ‘damping off’ en plántulas de chile

Omar Jiménez-Pérez, Gabriel Gallegos-Morales\*, Francisco Daniel Hernández-Castillo, Melchor Cepeda-Siller, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México; Cesar Alejandro Espinoza-Ahumada, Instituto Tecnológico Superior De El Mante. Carretera Federal Libre Mante-Ciudad Valles Km 6.7, Congregación Quintero, Tamaulipas; C. P. 89930, México. \*Corresponding author: ggalmor@uaaan.edu.mx

Received: September 14, 2021.

Accepted: December 22, 2021.

Jiménez-Pérez O, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Cepeda-Siller M and Espinoza-Ahumada CA. 2022. Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 116-130.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-3>

First DOI publication: December 29, 2021.

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** The production of the pepper seedling (*Capsicum annuum*) is affected by the fungal complex that causes the ‘damping-off’, in which some species of the oomycete *Pythium* spp., stand out. The objective of the present study was to identify the causal agent of the death of pepper plants and evaluate its pathogenicity in

**Resumen.** La producción de plántula de chile (*Capsicum annuum*) es afectada por el complejo de hongos causantes del ‘damping off’, donde sobresalen especies del oomyceto *Pythium* spp. El objetivo del presente estudio fue identificar el agente causal de la muerte de plantas de chile y evaluar su patogenicidad en semillas y plántulas de chile. Se aisló un oomyceto de crecimiento rápido y agresivo en plantas de chile, identificado morfológicamente como *P. aphanidermatum* en base a sus estructuras de reproducción sexual y asexual y, mediante técnicas moleculares. Este aislamiento tuvo un alto grado de patogenicidad *in vitro* en pre-emergencia y post-emergencia en chile, mostrando el 100% de mortalidad. Además, presentó una tasa alta de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo (V8- Agar, Maíz Agar, Maíz Papa Agar, Papa Dextrosa Agar, Czapek y Avena Agar), siendo el medio V8-Agar el único medio donde desarrolló estructuras



pepper seeds and seedlings. A fast and aggressive growing oomycete was isolate from pepper plants, morphologically identified as *P. aphanidermatum* based on its sexual and asexual reproduction structures and, by molecular techniques. This isolate had a high degree of *in vitro* pathogenicity in pre-emergence and post-emergence in Chile, showing 100% mortality. In addition, it presented a high rate of mycelial growth in different culture media (V8-Agar, Corn Agar, Corn Potato Agar, Potato Dextrose Agar, Czapek & Oat Agar), being in V8-Agar medium the only medium where it developed reproduction structures sexual and asexual. The isolation presented a mycelial growth rate of  $58.3 \pm 0.3$  mm / day at  $26 \pm 2$  °C in PDA medium. Due to its rapid growth and its high degree of pathogenicity *in vitro*, it is an unusual and aggressive isolate for pepper seedlings.

**Key words:** growth, culture media, oomycete, virulence, reproduction.

In Mexico, the production of pepper seedlings is severely affected by the disease known as ‘damping off’, with losses ranging between 10 and 100%. The disease is caused by a complex of species of *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* and *Pythium* (Hernández, 2018), although the *Pythium* species are considered the main causal agent (Elshahawy *et al.*, 2018; Hernández, 2018). *Pythium* is an oomycete which is differentiated from true fungi in that it contains cellulose and  $\beta$ -glucans as the constituents of its cell wall. This genus is distributed globally, and it is favored by climates with high humidity levels and highly varied temperatures, depending on the species (Schroeder *et al.*, 2013). The initial infection can be triggered by the fragment of a mycelium in growth or the germination of zoospores, oospores and even a sporangium. In the

de reproducción sexual y asexual. El aislamiento, presentó una tasa de crecimiento micelial de  $58.3 \pm 0.3$  mm/día a  $26 \pm 2$  °C en el medio PDA. Por su rapidez de crecimiento y su alto grado de patogenicidad *in vitro*, es un aislado inusual y agresivo para plántula de Chile.

**Palabras clave:** crecimiento, medios de cultivos, oomiceto, virulencia, reproducción.

En México, la producción de plántula de Chile es severamente afectada por la enfermedad conocida como ‘damping off’ o ahogamiento, con pérdidas que oscilan del 10 al 100%. La enfermedad es causada por un complejo de especies de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y *Pythium* (Hernández, 2018), sin embargo, las especies de *Pythium* se les considera como el principal agente causal (Elshahawy *et al.*, 2018; Hernández, 2018). *Pythium* es un oomiceto que se diferencia de los hongos verdaderos al poseer celulosa y  $\beta$ -glucanos como constituyentes de su pared celular. Este género tiene distribución mundial y le favorecen climas con alta humedad y temperaturas muy variadas, dependiendo de la especie (Schroeder *et al.*, 2013). La infección inicial se puede originar por un fragmento de micelio en crecimiento o la germinación de zoosporas, oósporas y hasta de un esporangio. En la etapa de penetración, las especies de *Pythium* requieren de alta humedad y se introduce a través de heridas o ejerciendo presión mecánica y degradación enzimática de los tejidos de la planta. En raíces jóvenes penetra por las puntas de las raíces (Agrios, 2005). Este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir como saprofito en restos de plantas y como parásito en más de 60 géneros de cultivos pertenecientes a las familias solanáceas, cucurbitáceas, entre otras (Agrios, 2005; Díaz *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2011). En el establecimiento de

stage of penetration, the *Pythium* species require high humidity levels and they introduce themselves through lesions or exerting mechanical pressure and via the enzymatic degradation of the plant tissues. In young roots it penetrates through the tips of the rootlets (Agrios, 2005). This microorganism can survive as a saprophyte in the remains of plants and as a parasite in over 60 genera of crops belonging to the Solanaceae, cucurbit families, and others (Agrios, 2005; Díaz *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2011). In the establishment of trays or seedbeds, the damage by *Pythium* spp. presents itself in the stage of pre- and post-emergence (Gómez *et al.*, 2011; Grijalba and Ridao, 2017), in which it causes the rotting of seeds, strangling of the base of the stem, root necrosis, wilt, lodging and the death of seedlings (Gómez and Melero, 2011; D'Angelo, 2016; Rivera and Fernández, 2017). Adult plants are generally affected at the level of roots with small lesions in the epidermis, although it may damage the fruits exposed to high levels humidity or in postharvest (Fry *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2018). This genus has a high growth rate (Schroeder *et al.*, 2013) of up to 7-34 mm a day, depending on the species, the temperature and the substrate in which it develops (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Approximately 160 species have been documented from the genus *Pythium* (Grijalba and Ridao, 2017), out of which the most important are *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum* and others (Díaz *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015; Ríos and de Rocha, 2018; Grijalba *et al.*, 2020). The morphological identification of *Pythium* spp. is based on the shape and dimensions of the sexual and asexual reproductive structures, such as sporangia, oogonia, type of oospore (aplerotic or plerotic) and the number and position of the antheridium when attaching with the oogonium. Due to the

charolas o almácigos, el daño por *Pythium* spp., se presenta en etapa de pre y post-emergencia (Gómez *et al.*, 2011; Grijalba y Ridao, 2017), en las que ocasiona pudrición de semillas, estrangulamiento de la base del tallo, necrosis de raíces, marchitamiento, acame y muerte de plántulas (Gómez y Melero, 2011; D'Angelo, 2016; Rivera y Fernández, 2017). Las plantas adultas generalmente son afectadas a nivel de las raíces con lesiones pequeñas en la epidermis, aunque puede llegar a dañar los frutos expuestos a alta humedad o en postcosecha (Fry *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2018). Este género tiene una alta tasa de crecimiento (Schroeder *et al.*, 2013), pudiendo ser entre 7-34 mm diarios, dependiendo de la especie, la temperatura y del sustrato en el que se desarrolla (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Se han documentado aproximadamente 160 especies pertenecientes al género *Pythium* (Grijalba y Ridao, 2017), donde las de mayor importancia son *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum* entre otras (Díaz *et al.*, 2011; Grijalba *et al.*, 2015; Ríos y de Rocha, 2018; Grijalba *et al.*, 2020). La identificación morfológica de *Pythium* spp., se basa en la forma y dimensiones de las estructuras de reproducción sexual y asexual como son, esporangios, oogonio, tipo de oóspora (aplerótica o plerótica) y el número y posición del anteridio con su unión al oogonio. Debido a que existe mucha variación de estas estructuras entre las especies, resulta difícil su identificación morfológica, por lo que se recurre a la identificación molecular para obtener una caracterización con mayor confiabilidad (Díaz *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2013). Durante un recorrido en Julio del 2019 en invernaderos establecidos con chile, en el municipio de Parras de la Fuente, Coahuila, México, se detectó la muerte de plántulas. En esta región no se cuenta con registros de patógenos en chile causantes de "damping off", por lo que se decidió identificar

high variation of these structures among species, their morphological identification is difficult, therefore we resort to molecular identification to obtain a more reliable characterization (Díaz *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2013). During a visit in July, 2019, to greenhouses with pepper plants in the municipal area of Parras de la Fuente, Coahuila, Mexico, dead seedlings were found. In this region there are no records of pathogens in pepper causing damping off, therefore we decided to identify the causal agent; preliminary studies indicated that the oomycete related to the disease displayed characteristics of the genus *Pythium*. Due to this, the present study was carried out with the following aims: A) to identify the causal agent of the deaths of pepper plants in the greenhouses in Parras, Coahuila, Mexico and B) to evaluate its pathogenicity in seeds and seedlings, as well as its behavior and growth rate in different culture media in the laboratory.

**Location of the experiment.** This work was carried out in the Microbiology Laboratory of the Department of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Antonio Narro Autonomous Agrarian University - UAAAN) located in Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

**Isolation of the phytopathogen.** Serrano pepper seedlings with the typical symptoms of ‘damping off’ were collected from three greenhouses in the area of Parras de la Fuente, Coahuila. The seedlings were taken to the laboratory, where they were washed with tap water and the roots were separated from the stems. Later, using a sterilized scalpel, they were cut into small pieces which were then disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 3 min, washed in three steps of sterile distilled water and left to dry on brown paper under

al agente causal, estudios preliminares indicaron que el Oomyceto asociado a la enfermedad mostró características del género *Pythium*. Por lo anterior se llevó a cabo el presente estudio con los siguientes objetivos. A) Identificar al agente causal de la muerte de plantas de chile en invernaderos de Parras, Coahuila, México y B) Evaluar su patogenicidad en semillas y plántulas además de su comportamiento y tasa de crecimiento en diferentes medios de cultivo en laboratorio.

**Ubicación del experimento.** Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicada en Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

**Aislamiento del fitopatógeno.** Se colectaron plántulas de chiles serrano con sintomatología típica de ‘damping off’ o ahogamiento en tres invernaderos de la región de Parras de la Fuente, Coahuila. Las plántulas se trasladaron al laboratorio, donde se lavaron con agua corriente y se separaron las raíces y tallos. Posteriormente, se cortaron en pequeños trozos con ayuda de un bisturí estéril, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se lavaron en tres pasos de agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel estera estéril bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Las porciones de raíz y tallo se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo V8- Agar (V8A) y se incubaron a  $26 \pm 2$  °C por 4 días, donde se presentó micelio hialino cenocítico, oogonios, anteridios y esporangios típicos del género *Pythium* (Van der Plaats-Niterink, 1981). Fragmentos de micelio se transfirieron a medio de cultivo agar agua (AA), 24 h después el aislamiento se purificó transfiriendo puntas de hifas a cajas Petri con medio V8A y se incubó a  $26 \pm 2$  °C con un

aseptic conditions in a laminar flow cabinet. The pieces of roots and stems were placed in Petri dishes with a V8-Agar (V8A) culture medium and incubated at  $26 \pm 2$  °C for 4 days, where cenocytic hyaline mycelium, oogonia, antheridia and typical sporangia of the genus *Pythium* (Van der Plaats-Niterink, 1981) appeared. Pieces of mycelium were transferred to water agar culture medium (AA) and 24 h later, the isolation was purified by transferring hypha tips into Petri dishes with V8A medium and incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) for seven days for its identification, measurement of its growth rate and pathogenicity tests.

**Morphological identification.** This was carried out with direct observations of the mycelial growth, formation of sporangia, oogonia and antheridia developed over a sterilized seed, inoculated with a 3 mm piece of *Pythium* spp. cultivation placed on a Petri dish with AA culture medium and incubated for seven days in which the mentioned structures of this oomycete would form. Observations were carried out using a Keyence VHX-7000 digital microscope and a Motic BA210E compound microscope, in which microscopic preparations were observed. The identification was carried out following the descriptive keys by Van der Plaats-Niterink (1981).

**Molecular characterization.** The confirmation of the identity of the species of *Pythium* sp. was carried out based on the internal transcribed spacer (ITS's) sequences 1 and 4, including gene 5.8S rDNA, obtained in the National Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology Laboratory (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental - LANBAMA) in San Luis Potosí, Mexico. The samples were sequenced with the marked dideoxynucleotide method in the 3130

fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) durante siete días, para su identificación, medición de su tasa de crecimiento y pruebas de patogenicidad.

**Identificación morfológica.** Se realizó por observaciones directas del crecimiento micelial, formación de esporangios, oogonios y anteridios desarrollados sobre una semilla esterilizada e inoculada con una porción de 3 mm de cultivo de *Pythium* spp., colocados en una caja Petri con medio de cultivo AA e incubada por siete días, tiempo en el que se formarían las estructuras mencionadas de este oomiceto. Las observaciones se realizaron con un microscopio digital Keyence VHX-7000 y un microscopio compuesto Motic BA210E, en este último se observaron preparaciones microscópicas. La identificación se realizó de acuerdo a las claves descriptivas de Van der Plaats-Niterink (1981).

**Caracterización molecular.** La confirmación de la identidad de la especie de *Pythium* sp., se realizó con base a las secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS's) 1 y 4, incluyendo el gen 5.8S DNAr, obtenidas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México. Las muestras fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en un analizador automático de la serie 3500 Genic Analyzer. Para amplificar los genes se utilizó un termociclador Verity para PCR de punto final (Applied Biosystems) usando los oligos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Al-Sheikh, 2010; Jahén Rivera *et al.*, 2020).

**Pruebas de patogenicidad.** Se realizaron *in vitro* en cajas Petri con medio de cultivo AA, mediante dos metodologías; en pre-emergencia y post-emergencia. La primera se realizó mediante la técnica

Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequencer in an automatic Genic Analyzer series 3500. To amplify the genes, we used a Veriti thermocycler for Endpoint PCR (Applied Biosystems) with oligos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Al-Sheikh, 2010; Jahén Rivera *et al.*, 2020).

**Pathogenicity tests.** These were carried out *in vitro* in Petri dishes with AA culture medium, using two methods: in pre-emergence and post-emergence. The former was carried out with the technique used by Apodaca *et al.* (2002), which consisted in placing 10 Platino hybrid serrano pepper seeds in Petri dishes containing AA and inoculating them with a mixture of mycelium, oogonia, oospores and *Pythium* zoospores. The inoculated seeds were incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) and the severity was evaluated every 24 h for 12 days. The second method was carried out using the technique proposed by Sánchez *et al.*, (1975) with slight modifications. Fifty seeds of the same hybrid were germinated in AA medium. After five days and once the hypocotyl (hp) developed, they were transferred axenically pure in groups of three seeds into new Petri dishes containing AA, two days later. When the development of their roots and cotyledons were observed, a piece of *Pythium* mycelium was transferred to the center of the Petri dishes along with culture medium, 3 mm in diameter, with 7 day's growth, from the Petri dishes with V8A. The Petri dishes were incubated at  $26 \pm 2$  °C with a light period of 12:12 (light: darkness) and the severity was evaluated five days after inoculation. In both methodologies, the visual severity scale described by Apodaca *et al.* (2002) was used, with modifications, where 0= no symptoms, healthy plant, 1= few small necrotic spots in the hp or on cotyledons, 2= necrotizing on the base of the hp, 3=

utilizada por Apodaca *et al.* (2002), que consistió en colocar 10 semillas de chile serrano híbrido Platino en cajas Petri conteniendo AA e inocularlas con una mezcla de micelio, oogonios, oósporas y zoosporas de *Pythium*. Las semillas inoculadas se incubaron a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y se evaluó la severidad cada 24 h por 12 días. La segunda metodología se realizó mediante la técnica propuesta por Sánchez *et al.* (1975) con ligeras modificaciones; se germinaron 50 semillas del mismo híbrido en medio AA, transcurridos cinco días y una vez que se desarrolló el hipocótilo (hp), se transfirieron axenicamente puras en grupos de tres semillas, a nuevas cajas Petri conteniendo AA, dos días después, cuando se observó el desarrollo de su raíz y cotiledones, se transfirió en el centro de las cajas Petri una porción de micelio de *Pythium* con medio de cultivo de 3 mm de diámetro de siete días de crecimiento que procedía de cajas Petri conteniendo V8A. Las cajas Petri se incubaron a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y se evaluó la severidad a los cinco días después de la inoculación. En ambas metodologías se utilizó la escala visual de severidad descrita por Apodaca *et al.* (2002), con modificaciones, donde 0= sin síntomas planta sana, 1= pocos puntos pequeños necróticos en el hp o en cotiledones, 2= necrosamiento en la base del hp, 3= hp necrosado hasta en un 50%, 4= semilla, hp o planta completamente necrosada. Los dos tratamientos (uno con inoculación y el otro sin inoculación) se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con tres repeticiones y dos tratamientos. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) en el programa estadístico R versión 3.3.1.

**Desarrollo de *Pythium* en diferentes medios de cultivo.** Se utilizaron los medios de cultivos V8-

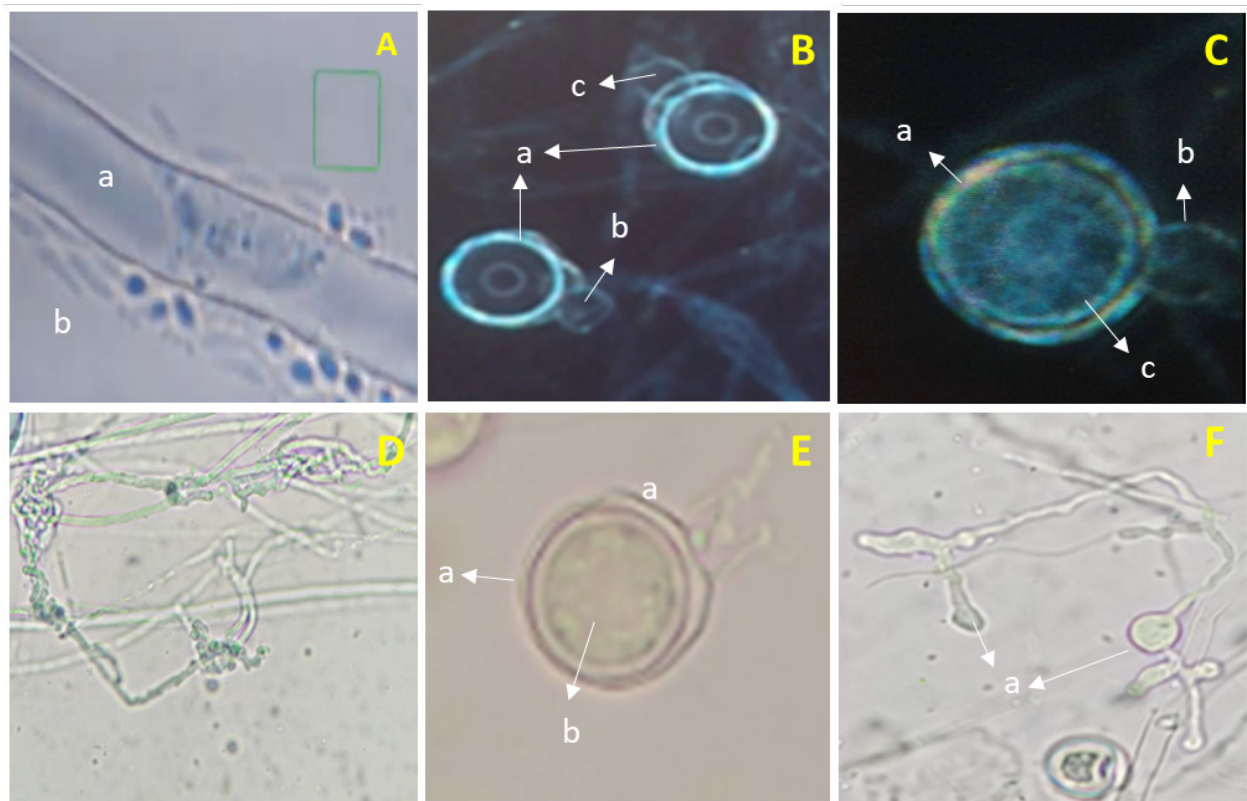
hp necrotized by up to 50%, 4= seed, hp or plant completely necrotized. Both treatments (one with inoculation, the other without inoculation) were distributed in a completely random arrangement with three repetitions and two treatments. The data underwent an analysis of variation (ANOVA) and a Tukey means comparison test ( $p \leq 0.05$ ) in the R statistical program, version 3.3.1.

**Development of *Pythium* in different culture media.** The culture media used were V8- Agar (V8A), Maize Agar (MA), Maize Potato Agar (MPA), Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek (Czp) and Oat Agar (AvA), in Petri dishes, all 9 cm in diameter. In each one of the media, a piece of *Pythium* mycelium, 3 mm in diameter, was placed after two days growing in V8A. The mycelial growth was measured 24 h after planting. A completely randomized design was used, with four repetitions (four Petri dishes). The data underwent an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey means comparison test ( $p \leq 0.05$ ) in the R statistical program, version 3.3.1.

**Morphological identification of *Pythium* sp.** The isolation obtained from pepper plants with symptoms of damping off presented hyaline coenocytic toruloid hyphae with diameters between 5 and 7  $\mu\text{m}$  (Figure 1-Aa and Da), spherical terminal oogonia, flat ones with a diameter of 25-28  $\mu\text{m}$  (Figure 1- Ba, Ca and Ea), with an aplerotic oospore with a diameter between 24 and 26  $\mu\text{m}$  (Figure 1Cc and Eb), declinate or monoclinal antheridia, one per oogonium (Figure 1-Bbc and Cb), filamentous, lobulated and irregular sporangia, (Figura 1-Fa) and zoospores (Figure 1Ab). These characteristics coincided, when using the taxonomic keys by Van der Plaats-Niterink (1981) and Tsuneo (2010), with those of *Pythium aphanidermatum*. However, although the morphological characteristics

Agar (V8A), Maíz Agar (MA), Maíz Papa Agar (MPA), Papa Dextrosa Agar (PDA), Czapek (Czp) y Avena Agar (AvA), en cajas Petri de 9 cm de diámetro. En cada uno de los medios se transfirió una porción de micelio de 3 mm de diámetro de *Pythium* de dos días de crecimiento en V8A. La medición del crecimiento micelial se realizó a las 24 h después de la siembra. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones (cuatro cajas Petri). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) en el programa estadístico R versión 3.3.1.

**Identificación morfológica de *Pythium* sp.** El aislamiento obtenido de plantas de chile con síntomas de damping off, presentó hifas toruloides cenocíticas hialinas con diámetro de 5-7  $\mu\text{m}$  (Figura 1-Aa y Da), oogonios terminales esféricos, lisos de 25-28  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1- Ba, Ca y Ea), con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1Cc y Eb), anteridios declinos o monoclinos uno por oogonio (Figura 1-Bbc y Cb), esporangios filamentosos, lobulados e irregulares (Figura 1-Fa) y zoosporas (Figura 1Ab). Estas características concordaron al usar las claves taxonómicas de Van der Plaats-Niterink (1981) y Tsuneo (2010) con las de *Pythium aphanidermatum*. Sin embargo, aunque las características morfológicas observadas en *Pythium* concuerdan con las descritas por estos dos autores existen diferencias con los tamaños de algunas estructuras; por ejemplo Van der Plaats-Niterink (1981) describe a la hifa con un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ , oogonios que miden de 20-25  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 18-22  $\mu\text{m}$  y de uno a dos anteridios por oogonio, mientras que en esta investigación se encontraron hifas de un diámetro de 5-7  $\mu\text{m}$ , oogonios con diámetro de 25-28  $\mu\text{m}$  con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  y con un solo anteridio por oogonio. Las características observadas en



**Figure 1. *Pythium aphanidermatum*. A) a- cenocytic hypha and b- Zoospores. B) a- Smooth spherical terminal oogonia, b and c- Dicline antheridia. C) a- Oogonium, b- Monoclone antheridium and c- Aplerotic oospore. D) a- Toruloid hypha. E) a- Terminal oogonium and b- Aplerotic oospore. F) a- Lobulated sporangia.**  
**Figura 1. *Pythium aphanidermatum*. A) a- hifa cenocítica y b- Zoosporas. B) a- Oogonios terminales esféricos lisos, b y c- Anteridios diclinos. C) a- Oogonio, b- Anteridio monoclino y c- Oóspora aplerótica. D) a- Hifas toruloides. E) a- Oogonio terminal y b- Oóspora aplerótica. F) a- esporangios lobulados.**

observed in *Pythium* coincide with those described by these authors, there are differences with the sizes of some structures. For example, Van der Plaats-Niterink (1981) describes the hypha as having a 10  $\mu\text{m}$  diameter, oogonia that measure 20-25  $\mu\text{m}$  with an aplerotic 18-22  $\mu\text{m}$  oospore and one or two antheridia per oogonium, whereas this study found hyphae with diameters of 5-7  $\mu\text{m}$ , oogonia with diameters of 25-28  $\mu\text{m}$  with aplerotic oospores of 24-26  $\mu\text{m}$  and with only one antheridium per oogonium. The characteristics observed in this study were similar to those observed by Díaz *et al.* (2011), who found oogonia with a diameter of

este estudio fueron similares a las observadas por Díaz *et al.* (2011) donde observó oogonios de 27.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y solo un antheridio por oogonio, al igual con Al-Sheikh (2010), que reporta esporangios irregulares, oogonios terminales esféricos de 24  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, con oóspora aplerótica de 24-26  $\mu\text{m}$  y un antheridio diclino o monoclino.

**Identificación molecular de *Pythium* sp.** La secuenciación de la región del ADNr ITS-1- del gen 5.8S- ITS-4 del oomiceto mostró un porcentaje de 99.15% de similitud con la secuencia clave de

27.5  $\mu\text{m}$  and only one antheridium per oogonium, as well as Al-Sheikh (2010), who reported irregular sporangia, spherical terminal oogonia with an average diameter of 24  $\mu\text{m}$ , with an aplerotic oospore measuring 24-26  $\mu\text{m}$  and a declive or monocline antheridium.

**Molecular identification of *Pythium* sp.** The sequencing of the region of the rDNA ITS-1- of gene 5.8S- ITS-4 of the oomycete displayed a similarity of 99.15% with accession key sequence JN695786.1., of the GenBank, corresponding to *P. aphanidermatum*. This provided certainty regarding the identity of the causal agent of the damping off found in pepper plants in greenhouses in Parras de la Fuente. Other investigators, in order to characterize this species, have used different oligos such as ITS4 and ITS5, ITS1 and ITS2. Such was the case for Al-Sheikh, (2010) and Díaz *et al.* (2011), whereas Grijalba *et al.* (2015) used oligos ITS4 and ITS5, confirming the identity of the species *P. aphanidermatum* as the cause of damping off in wheat, tomato and ornamental plants, unlike this study, which reports the isolation of plantlets in pepper plants in greenhouses.

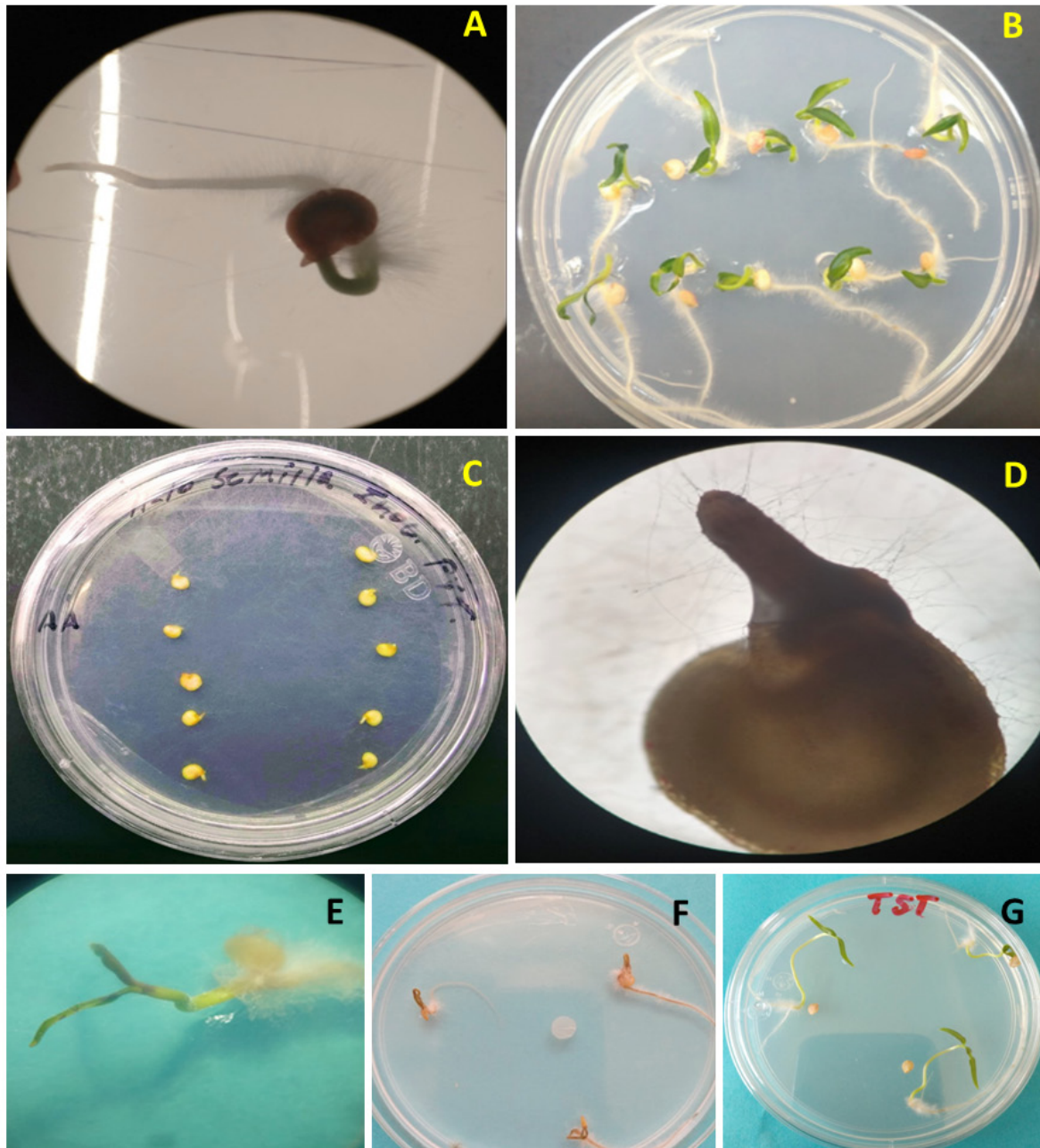
**Pathogenicity tests.** In pre-emergence, the seeds inoculated with *P. aphanidermatum* displayed the growth of whitish mycelia 24 h after inoculation, which did not occur in the control seeds. Five days after inoculation, the formation of the hypocotyl (hp) was observed in inoculated and non-inoculated treatments, but only the control treatment developed a root (Figure 2A and C). Twelve days after inoculation, the treatments inoculated with *P. aphanidermatum* did not display the growth of cotyledons or roots, and its hypocotyl was necrotized and contained mycelia (Figure 2D). Out of the 30 seeds inoculated, only three displayed no development of the hypocotyl, whereas in the

acceso JN695786.1., del Gen Bank, correspondiente a *P. aphanidermatum*. Lo anterior, permitió tener certidumbre de la identidad del agente causal del “damping off” de plantas de chile en invernaderos de Parras de la Fuente. Otros investigadores para caracterizar esta especie han empleado oligos diferentes como ITS4 e ITS5, ITS1 e ITS2 tal es el caso de Al-Sheikh, (2010) y Díaz *et al.* (2011), mientras que Grijalba *et al.* (2015) utilizaron los oligos ITS4 e ITS5, confirmando la identidad de la especie *P. aphanidermatum* como causante del ahogamiento de plantas de trigo, jitomate y ornamentales, a diferencia de este estudio que reporta el aislamiento de plántulas de chile en invernadero.

**Pruebas de patogenicidad.** En pre-emergencia, las semillas inoculadas con *P. aphanidermatum*, mostraron el crecimiento de micelio blanquecino a las 24 h después de la inoculación, lo que no ocurrió en las semillas testigo. Cinco días después de la inoculación se observó la formación del hipocótilo (hp) en los tratamientos sin inocular e inoculado, pero sólo el tratamiento testigo desarrolló la raíz (Figura 2A y C). Doce días después de la inoculación se observó que los tratamientos inoculados con *P. aphanidermatum* no mostraron desarrollo de cotiledones, ni de raíz y su hipocótilo se encontraba necrosado y con presencia de micelio (Figura 2D), de las 30 semillas inoculadas sólo tres no mostraron desarrollo del hipocótilo, mientras que en el tratamiento testigo las semillas desarrollaron raíz, tallo y cotiledones sin síntomas ni signos del microorganismo (Figura 2B).

En el caso de post-emergencia, en todos los tratamientos inoculados con una porción de micelio de 3 mm de diámetro del cultivo de *Pythium*, se observó crecimiento micelial a las 24 h después de la inoculación, excepto en el testigo. Tres días después de la inoculación, las plantas mostraron síntomas de necrosis en cotiledones y raíces, además,





**Figure 2.** *P. aphanidermatum* pathogenicity test's in serrano pepper seeds and seedlings. A) Control treatment, seed five days after planting (dap), B) Treatment control 12 dap, C) Seeds inoculated with *P. aphanidermatum* five days after inoculation (dai), D) Seed inoculated with *P. aphanidermatum*, 12 dai, E) Necrosis of cotyledons and abundant mycelium in the root 3 dai, F) Total necrosis of seedlings 5 dai, G) Control treatment with symptom-free seedlings.

**Figura 2.** Pruebas de patogenicidad de *P. aphanidermatum* en semillas y plántulas de chile serrano. A) Tratamiento testigo, semilla de cinco días después de la siembra (dds), B) Tratamiento testigo 12 dds, C) Semillas inoculadas con *P. aphanidermatum* cinco días después de la inoculación (ddi), D) Semilla inoculada con *P. aphanidermatum* de 12 ddi, E) Necrosis de los cotiledones y abundante micelio en la raíz 3 ddi, F) Necrosis total de las plántulas 5 ddi, G) Tratamiento testigo con plántulas sin síntomas.

control treatment, the seeds developed roots, stems and cotyledons without signs or symptoms of the microorganism (Figure 2B).

In the case of post-emergence, in all treatments inoculated with a piece of mycelium with 3 mm in diameter from the *Pythium* culture, mycelial growth was observed 24 h after inoculation, except in the control. Three days after inoculation, plants displayed symptoms of necrosis in cotyledons and roots, as well as abundant mycelia (Figure 2E) and after five days, they displayed total necrosis (Figure 2F), whereas the controls presented no symptoms (Figure 2G). The isolation characterized as *P. aphanidermatum* displayed a high pathogenicity in pre- and post-emergence, since it caused a mortality rate of 100% in serrano pepper seeds and seedlings, which is similar to the data reported by Grijalba *et al.* (2015) and Grijalba *et al.* (2020) in tomato and soybean seedlings, respectively. At a temperature above 25 °C, as in reports by Al-Sheikh (2010), *P. aphanidermatum* caused 100% of ‘damping off’ in both pre- and post-emergence in wheat. Meanwhile, Valdez *et al.* (2011) reported a reduction of 65% in the germination of *Jatropha* seeds inoculated *in vitro* with the same oomycete.

According to the severity scale by Apodaca *et al.* (2002), the damage observed in the inoculated treatments was placed in the highest level (4) of the scale, since necrosis was found, along with seed rot and death of the seedling, whereas the controls were located in level 0 of the scale, due to the absence of signs or symptoms of the microorganism. Given this, the isolation identified as *P. aphanidermatum* was considered a severe causal agent of damping off in pre- and post-emergence in pepper seedlings and seeds.

**Development of *Pythium aphanidermatum* in different culture media.** Table 1 shows that 24 h after the microorganism was planted, it presented

de abundante micelio (Figura 2E) y a los cinco días mostraron necrosis total (Figura 2F), mientras que los testigos no presentaron síntomas (Figura 2G).

El aislamiento caracterizado como *P. aphanidermatum* mostró alta patogenicidad en pre y post-emergencia al causar el 100% de mortalidad de las semillas y plántulas de chile serrano, datos similares a los reportados por Grijalba *et al.* (2015) y Grijalba *et al.* (2020) en plántulas de jitomate y soya respectivamente. A temperatura superior a 25 °C, al igual que Al-Sheikh (2010) reportó que *P. aphanidermatum* causa 100% de ‘damping off’ tanto en pre y post-emergencia en trigo. Mientras que Valdez *et al.* (2011) reportó una reducción del 65% de la germinación de semillas de *Jatropha* inoculadas con el mismo oomiceto *in vitro*.

De acuerdo a la escala de severidad de Apodaca *et al.* (2002), el nivel de daño observado en los tratamientos inoculados se ubicó en el nivel más alto (4) de la escala; donde se detectó necrosis, pudrición de semillas y muerte de la plántula, mientras que los testigos se ubicaron en el nivel 0 de la escala por no presentar signos ni síntomas del microorganismo. Dado lo anterior, se consideró al aislado identificado como *P. aphanidermatum* como un agente causal severo de “damping off” en pre y post-emergente de plántulas y semillas de chile.

**Desarrollo de *Pythium aphanidermatum* en diferentes medios de cultivo.** En el cuadro 1 se observó que 24 h después de la siembra del microorganismo presentó diferencia significativa del crecimiento micelial en los distintos tratamientos, siendo V8A el medio donde *P. aphanidermatum* logró el mayor crecimiento micelial con 67.7 mm/día, siendo estadísticamente superior al resto de los tratamientos con un incremento del 18% con respecto al tratamiento MA que fue el que obtuvo el menor crecimiento con 57.3 mm/día. Estos crecimientos fueron superiores al reportado por Van der Plaats-

**Table 1. *P. aphanidermatum* mycelial growth rate after 24 h in different culture media.****Cuadro 1. Tasa de crecimiento micelial de *P. aphanidermatum* en 24 h en distintos medios de cultivo.**

| Medio de Cultivo | Media del Crecimiento (mm ± DS) |
|------------------|---------------------------------|
| V8A              | 67.7± 0.7 a <sup>2</sup>        |
| MPA              | 60.2± 0.7 b                     |
| PDA              | 58.3± 0.3 bc                    |
| Czp              | 58.2± 0.5 bc                    |
| AvA              | 58.1± 0.3 c                     |
| MA               | 57.3± 1.8 c                     |

<sup>2</sup>Means with different letters are significantly different (Tukey; p≤0,05). /

<sup>2</sup>Medias con letras distintas son significativamente diferentes (Tukey; p≤0,05).

a significant difference in mycelial growth in the different treatments, V8A being the medium in which *P. aphanidermatum* achieved the highest growth rate, with 67.7 mm/day, making it statistically higher than the rest of the treatments with an 18% increase in regard to the MA treatment, which had the lowest growth rate, with 57.3 mm/day. These growth rates were higher than the one reported by Van der Plaats-Niterink (1981), who mentions a growth rate of 30 mm/day for this species, which may be a factor involved in the high pathogenic ability observed on pepper seeds and seedling.

The behavior of *P. aphanidermatum* after 32 h in the different culture media appears in Figure 3, in which white and cotton-like mycelia are visible, with the exception of the Czp medium (Figure 3A), in which mycelium was scarce and superficial, at the level of the culture medium. In the MA medium (Figure 3B), *P. aphanidermatum* presented dense mycelium, yet lower growth than in MPA (Figure 3C), V8A (Figure 3F) and AvA (Figure 3D). In the latter medium, the oomycete developed the most abundant and dense mycelia. However, it was in V8A where cellular differentiation took place, and sexual and asexual reproduction structures were observed.

Niterink (1981) quien menciona un crecimiento de 30 mm/día para esta misma especie, lo cual pudiera ser un factor implicado en la elevada capacidad patogénica observada sobre semilla y plántulas de Chile.

El comportamiento de *P. aphanidermatum* a las 32 h en los distintos medios de cultivo se observa en la Figura 3, donde se aprecia que presentó micelio blanco y algodonoso, excepto en el medio Czp (Figura 3A), donde su micelio fue escaso y superficial al ras del medio de cultivo. En medio MA (Figura 3B), *P. aphanidermatum* presentó micelio denso, pero menor crecimiento que en MPA (Figura 3C), V8A (Figura 3F) y AvA (Figura 3D). En este último medio, el oomiceto logró desarrollar el micelio más abundante y denso. Sin embargo, fue en V8A donde se presentó la diferenciación celular y se observaron estructuras de reproducción asexual y sexual.

Es importante resaltar que la formación de estructuras de reproducción de *Pythium aphanidermatum* como esporangios, oogonios y zoosporas sólo ocurrió en el medio V8A en 96 h después de la siembra, ningún de los demás tratamientos estudiados (medios de cultivo) desarrollaron estructuras de reproducción sexual o asexual hasta las 168 h de

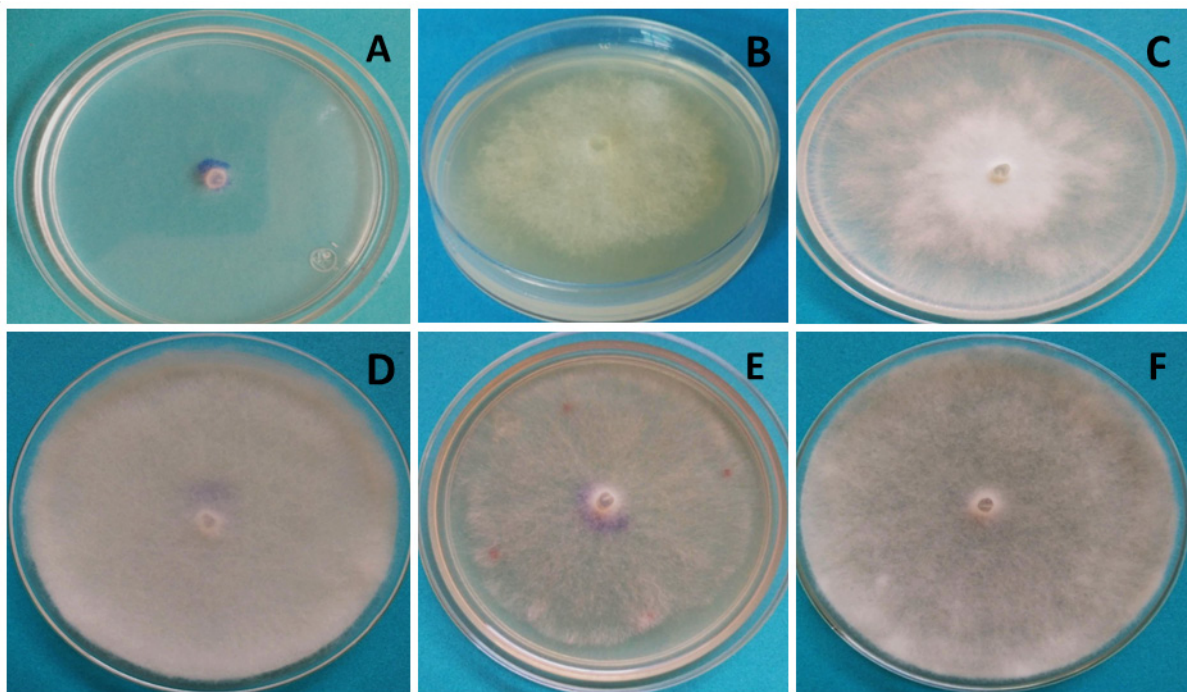


Figure 3. Growth of *Pythium aphanidermatum* after 32 h of incubation; A) Czp medium, B) MA medium, C) MPA medium, D) AvA medium, E) PDA medium, F) V8A medium.

Figure 3. Crecimiento de *Pythium aphanidermatum* a las 32 h de incubación; A) Medio Czp, B) Medio MA, C) medio MPA, D) Medio AvA, E) Medio PDA, F) Medio V8A.

It is worth highlighting that the formation of reproductive structures in *Pythium aphanidermatum* such as sporangia, oogonia and zoospores only took place in the V8A medium 96 h after planting, and no other treatments studied (culture media) developed sexual or asexual reproductive structures before 168 h of incubation. Therefore, the amount of nutrients in V8A promoted the growth and formation of sexual and asexual structures in *P. aphanidermatum*, as reported by Ko (1998) and González *et al.* (2014), who claim that culture media with high sugar levels (glycerides) and vitamins promote the production of *Pythium* and *Phytophthora* oospores and antheridia. Also observed was the growth of cotton-like mycelia, typical of *P. aphanidermatum*, in the PDA culture medium (Grijalba *et al.*, 2015; Al-Sheikh, 2010).

incubación. Por lo que el V8A por su contenido de nutrientes favoreció el crecimiento y formación de estructuras sexuales y asexuales de *P. aphanidermatum*, tal y como lo reporta Ko (1998) y González *et al.* (2014), que medios de cultivo con altos contenidos de azúcares (gliceridos) y vitaminas favorecen la producción de oósporas y anteridios de *Pythium* y *Phytophthora*. También se observó el crecimiento de micelio algodónoso característico de *P. aphanidermatum* en el medio de cultivo PDA (Grijalba *et al.*, 2015; Al-Sheikh, 2010). Este fitopatógeno al crecer en medio Czapek mostró un pobre desarrollo al igual que en PDA, siendo en AvA y V8A donde se favoreció el crecimiento de micelio algodónoso.

Se aisló e identificó morfológica y molecularmente a una cepa del oomiceto *Pythium aphanidermatum* causante de la muerte de plántulas de Chile

This phytopathogen, due to its growth in Czapek medium, displayed poor development, as it did in PDA, being AvA and V8A where the growth of cotton-like mycelia was promoted.

A strain of the oomycete *Pythium aphanidermatum*, which caused the death of pepper seedlings in a greenhouse in Parras de la Fuente in Coahuila, Mexico, was isolated and morphologically and molecularly identified. The isolated strain presented a high virulence *in vitro* in pre-emergence over the seeds and in post-emergence in serrano pepper seedlings. The isolated strain has a quick development in different culture media, being V8A the medium in which it displayed a better development. In addition, this culture medium, which is composed of tomato juice, plant extracts and CaCO<sub>3</sub>, allowed it to form sexual and asexual reproductive structures.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the CONACYT for the scholarship granted to study a Master's in Science degree with a specialty in Agricultural Parasitology.

#### LITERATURE CITED

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5a Ed., Academic Press. 922 pp.
- Al-Sheikh H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. Saudi Journal of Biological Sciences 17(4): 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.001>
- Apodaca SMÁ, Zavaleta ME, Garcia ER, Osada KS y Valenzuela UJG. 2002. Frecuencia de Campos Infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su Control. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1): 1-7. <http://www.Reddalyc.org/articulo.oo?id=61220101>
- Cotilla PL, Díaz RA, Berroa NG y Rodríguez RR. 2007. Influencia de cuatro medios de cultivo sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. Centro Agrícola 34(2):49-52. [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V34-Numero\\_2/cag102071543.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V34-Numero_2/cag102071543.pdf)
- D'Angelo OR. 2016. Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: Un modelo didáctico-experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. Revista en invernadero de Parras de la Fuente en Coahuila, México. Se determinó que la cepa aislada presentó alta virulencia *in vitro* en preemergencia sobre semillas y en postemergencia en plántulas de chile serrano. La cepa aislada tiene un rápido desarrollo en diferentes medios de cultivo, siendo en V8A donde presentó mejor desarrollo, además, fue capaz de formar estructuras de reproducción sexual y asexual en dicho medio de cultivo el cual está elaborado a base de jugo de tomate, extractos vegetales y CaCO<sub>3</sub>.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría en Ciencias con Especialidad en Parasitología Agrícola.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias 13(3): 680-685. <http://hdl.handle.net/1049818505>

Díaz CM, Rodríguez AG, Silva RHV, Pedraza SME, Salgado GR y Fernández PSP. 2011. Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(3): 431-443. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_pi&id=S2007-09342011000900003&lng=es&nrn=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_pi&id=S2007-09342011000900003&lng=es&nrn=iso). ISSN 2007-0934

Elshahawy I, Abouelnasr HM, Lashin SM and Darwesh OM. 2018. First report of *Pythium aphanidermatum* infecting tomato in Egypt and its control using biogenic silver nanoparticles. Journal of Plant Protection Research 58(2): 137-151. <http://dx.doi.org/10.24425/122929>

Fry W, Grünwald N y Ocotlán JM. 2010. Introducción a los Oomicetes. Editado por Alberto Valencia-Botín. The Plant Health Instructor. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2012-0220-01>

Gómez JR, Hernández FLM, Cossio VLE, López AJG y Sánchez LR. 2011. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 19, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. <https://es.readkong.com/page/enfermedades-fungosas-y-bacterianas-del-cultivo-de-tomate-9739198?p=1>

Gómez J y Melero JM. 2011. Patogenia de *Pythium aphanidermatum* y *Pythium* spp. sobre plántulas de pepino: I Influencia del cultivar y del sustrato en la gravedad de

- la enfermedad. Boletín de Sanidad Vegetal 37: 207-223. <http://hdl.handle.net/10261/84091>
- González PFD, Costales MD y Falcón RAB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal 29(1): 33-41. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100004&lng=es&nrm=iso). ISSN 1010-2752
- Grijalba PE, Zapata RL, Palmucci HE y Baron C. 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 50(1): 11-15. <http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v50.n1.10843>
- Grijalba PE y Ridao ADC. 2017. Control químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 43(1): 67-71. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86451165010>
- Grijalba PE, Ridao ADC and Steciow M. 2020. Damping off on soybean (*Glycine max*) caused by *Pythium aphanidermatum* in Buenos Aires Province (Argentina). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias *UNCuyo* 52(2): 282-288. [http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFC\\_A/artic/view/3027](http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFC_A/artic/view/3027)
- Hernández HEJ, Hernández RI, Almaraz SJJ, López LA, Torres AM, y Morales FFJ. 2018. Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del Damping off en chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9(3): 525-537. <http://dx.doi.10.29312/remexca.v9i3.335>
- Jahén Rivera SN, Gomez Rivera O and Espinosa Victoria D. 2020. Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*). Revista Mexicana de Fitopatología 38 (2): 269-279. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2001-6>.
- Ko, WH. 1998. Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. Botanical Bulletin of Academia Sinica 39: 81-86. <https://pdfs.semanticscholar.org/eb6a/e91e160c2071b24177c26742e14b76d21e21.pdf>
- Lévesque, CA and De Cock, AWAM. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108(12): 1363-1383. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756204001431>
- Rios TL and De Rocha JRS. 2018. Potencial patogênico de especies do complexo *Pythium* (Oomycota) para a agricultura familiar no estado do piauí. Pesquisas Botânica 71: 147-158. <http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/botanica71/012.pdf>
- Rivera FCH y Fernández PS. 2017. Técnica de evaluación para damping-off en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectado por *Pythium aphanidermatum*. Tecnociencia Chihuahua 11(2): 41-47. <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/156>
- Sánchez LE, Endo RM and Leary JV. 1975. A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing crown and root rot of tomato. Phytopathology 65(6): 726-727. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1975Articles/Phyto65n06\\_726.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1975Articles/Phyto65n06_726.PDF)
- Schroeder KL, Martin FN, De Cock AWAM, Lévesque CA, Spies CFJ, Okubara PA and Paulitz TC. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. Plant Disease 97(1): 4-20. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-03-12-0243-fe>
- Tsuneo W. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRC Press\_Taylor & Francis, Group Boca Raton London New York. pp. 26-68. ISBN 9781439804193.
- Valdés ROA, Garcia ER, Sánchez, SO y Pérez VA. 2011. Aislamiento y patogenicidad de un posible *Pythium aphanidermatum* en *Jatropha Curcas* L. no tóxica. Tropical and subtropical agroecosystems 14(2): 649-660. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000200022](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200022)
- Van der Plaats-Niterink AJ. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21:1-242. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>

# First report of *Alternaria alternata* causing the golden spot in xoconostle (*Opuntia matudae*) in Hidalgo, México

## Primer reporte de *Alternaria alternata* causante de la mancha dorada en xoconostle (*Opuntia matudae*) en Hidalgo, México

David Montiel-Salero, Angélica Jiménez-Aguilar, Susana E. Ramírez-Sánchez, Daniel Ruiz-Juárez, Departamento de Producción Agrícola y Animal<sup>1</sup>, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, México; Octavio Guerrero-Andrade, División de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico Superior de Huichapan, El Saucillo sn, Huichapan, 42411, Hidalgo; México; Eva Segundo-Pedraza<sup>1</sup>, Javier L. Olivares-Orozco<sup>1</sup>, Miguel Ángel Ramos-López, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro 76010, México; Antonio Flores-Macías<sup>1\*</sup>.

\*Corresponding author: aflores981@gmail.com

Received: July 29, 2021.

Accepted: December 24, 2021.

Montiel-Salero D, Jiménez-Aguilar A, Ramírez-Sánchez SE, Ruiz-Juárez D, Guerrero-Andrade O, Segundo-Pedraza E, Olivares-Orozco JL, Ramos-López MA and Flores-Macías A. 2022. First report of *Alternaria alternata* causing the golden spot in xoconostle (*Opuntia matudae*) in Hidalgo, México. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 131-144.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2107-3>

First DOI publication: December 31, 2021.

Primera publicación DOI: 31 de Diciembre, 2021.

**Abstract.** The species *Opuntia ficus-indica* is affected by pests and diseases, one of the most important of these being golden spot. The latter has been reported in various countries, including Mexico. Symptoms similar to those of golden spot in *O. ficus-indica* have been observed in the

**Resumen.** La especie *Opuntia ficus-indica* es afectado por varias plagas y enfermedades, siendo una de las más importantes la mancha dorada. Ésta ha sido reportada en varios países, incluyendo México. Síntomas similares a los causados por la mancha dorada en *O. ficus-indica* se han observado en el cultivo de xoconostle (*Opuntia matudae* Scheinvar, cv. Rosa). El objetivo de este estudio fue aislar e identificar el agente causal que ocasiona en este cultivo, los síntomas que se asemejan a los de la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Se realizó un muestreo (10 parcelas) simple al azar en campo sobre plantas de xoconostle que presentaban los síntomas descritos. Se realizaron cortes de tejido vegetal enfermo y se sembraron en cajas con medio PDA. El cumplimiento de los postulados de Koch demostró que el aislamiento (un aislado) de la especie obtenida de las muestras de campo, colonizó los cladodios después de las inoculaciones

xoconostle crop (*Opuntia matudae* Scheinvar, cv. Rosa). The objective of this study was to isolate and identify the causative agent that causes the symptoms, which resembled those of the disease described as golden spot in *O. ficus-indica*. Simple random sampling in the field (10 plots) was carried out on xoconostle plants that presented the described symptoms. Slices of diseased plant tissue were cut and placed in Petri plates with PDA medium. Compliance with Koch's postulates showed that the isolated (one isolated) of *Alternaria* sp. obtained from the field samples colonized the cladodes after inoculations in the greenhouse. Through taxonomic keys, *Alternaria* sp. was identified as the causative microorganism. Molecular characterization of the isolated *Alternaria* sp. was identified as *Alternaria alternata*. This is the first report worldwide of *Alternaria alternata* as the causal agent of golden spot in a xoconostle crop.

**Key words:** *Opuntia* spp., cladode, fruiting cladode, chlorotic spots.

The genus *Opuntia* is a natural resource that is used as live fencing and is also cultivated on commercial plantations as a source of fodder and as an edible vegetable for the nutritional value of cladodes and fruits (Griffith, 2004; Defelice, 2004; Sáenz *et al.*, 2006). It is a crop with high demand as a food worldwide, and it is exported to the U.S., Europe and Japan (Flores *et al.*, 2013). Among the species of the genus *Opuntia*, we find a set of wild cultivars generically known as xoconostles or acidic cactus pears, the name deriving from the Náhuatl (xoco = sour and nochtli = prickly pear) (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012). These species are considered of high ecological adaptability and their anatomy and morphology enable them to adapt to conditions of environmental stress, being considered valuable

en el invernadero. Mediante claves taxonómicas, se identificó a *Alternaria* sp. como microorganismo causante. La caracterización molecular del aislado de *Alternaria* sp. fue identificado como *Alternaria alternata*. Este es el primer reporte a nivel mundial de *A. alternata* como el agente causante de golden spot en el cultivo de xoconostle.

**Palabras clave:** *Opuntia* spp., cladodio, fruto del cladodio, manchas cloróticas.

El género *Opuntia* es un recurso natural que se usa como cercado vivo, también se siembra en campos comerciales como fuente de forraje y como verdura comestible por el valor nutricional de sus cladidos y frutas (Griffith, 2004; Defelice, 2004; Sáenz *et al.*, 2006). Es un cultivo con alta demanda a nivel mundial y se exporta a EE.UU., Europa y Japón (Flores *et al.*, 2013). Entre las especies del género *Opuntia* se encuentran un conjunto de cultivares silvestres genéricamente conocidos como xoconostles o tunas ácidas, cuyo nombre proviene del náhuatl (xoco = agrio y nochtli = tuna) (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012). Estas especies son consideradas de alta adaptabilidad ecológica y, su anatomía y morfología les permite adaptarse a condiciones de estrés ambiental, siendo considerados alimentos vegetales valiosos en América Latina. Los cultivares del xoconostle poseen una cantidad importante de fibra y compuestos antioxidantes tales como ácido ascórbico, mientras que las semillas son fuente de fibra, fenoles, flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles (especialmente  $\gamma$ -tocoferol), que le proporcionan buena capacidad antioxidante (Morales *et al.*, 2012), así como compuestos bioactivos de alta calidad que se podrían incorporar en formulaciones alimenticias funcionales (Morales *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2015). Esto hace de la planta un cultivo ideal en zonas donde el desarrollo



vegetable foods in Latin America. Xoconostle cultivars possess an appreciable amount of soluble fiber and antioxidant compounds such as ascorbic acid, while the seeds are a source of fiber, phenolics, flavonoids, polyunsaturated fatty acids, and tocopherols (especialmente  $\gamma$ -tocopherol), which provide good antioxidant capacity (Morales *et al.*, 2012), as well as high-quality bioactive compounds that could be incorporated into functional food formulation (Morales *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2015). This renders the plant an ideal crop in zones where the growth of other species-of-agricultural-interest is a challenge (Sáenz *et al.*, 2006).

In common with *O. ficus-indica* and *O. monacantha*, the xoconostle species also present phytosanitary problems caused by different microorganisms that affect the quality and yield of the crop (Rodríguez *et al.*, 2001; Choueiri *et al.*, 2005). Among the most common of these problems in *Opuntia* we find golden spot (Quezada *et al.*, 2006), necrosis of the cladode (Swart and Kriel 2002), and golden spot produced by *Alternaria alternata* (Granata and Sidoti, 1997; Swart and Kriel, 2002). The symptoms of the latter disease have been described as an infection that begins in the areoles of the cladode, near the site of penetration, where a slight bump appears, with the tissue changing color from the original dark to light green until becoming golden (Méndez *et al.*, 2008).

Similar symptomatology to that of golden spots in *O. ficus-indica* has recently been observed on both faces of the cladodes of xoconostle (Personal observation). However, to our knowledge, there have been no reports of this disease in xoconostle. Therefore, the aim of this study was to perform a comparative analysis of the disease symptomatology in xoconostle with those reported in other *Opuntia* species and to identify the microorganism that cause this symptomatology.

de otras especies de interés agrícola representa un desafío (Sáenz *et al.*, 2006).

Al igual que con *O. ficus-indica* y *O. monacantha*, la especie del xoconostle también presentan problemas fitosanitarios causados por diferentes microorganismos que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2001; Choueiri *et al.*, 2005). Entre los problemas más comunes de este tipo en *Opuntia* se encuentran la mancha dorada (Quezada *et al.*, 2006), necrosis del cladodio (Swart y Kriel 2002), y la mancha dorada producida por *A. alternata* (Granata y Sidoti, 1997; Swart y Kriel, 2002). Los síntomas de esta última enfermedad han sido descritos como una infección que comienza en las areolas del cladodio, cerca del sitio de penetración, donde aparece una ligera protuberancia, en la que el tejido cambia de color de un verde oscuro original a un verde claro hasta volverse dorado (Méndez *et al.*, 2008).

Una sintomatología similar a la mancha dorada en *O. ficus-indica* ha sido observado recientemente en ambos lados del cladodio del xoconostle (observación personal). Sin embargo, no conocemos reportes de esta enfermedad en el xoconostle. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis comparativo de la sintomatología de la enfermedad en xoconostle con aquellas reportadas en otras especies de *Opuntia* e identificar al microorganismo que causa esta sintomatología.

El estudio se llevó a cabo durante los años 2017-2018 en Chapantongo (2017-2018) en Hidalgo, México (20° 17' N y 99° 24' O, a 2,120 metros sobre el nivel del mar) en un área agrícola establecida en suelos tipo Phaeozem y Vertisol. El clima es templado-subhúmedo con una precipitación anual promedio de 550 mm y una temperatura anual promedio de 18 °C. Los sitios de estudio presentan una inclinación de 7% norte-sur (INEGI, 2009); los sitios fueron previamente ocupados por pastizales y

The study was conducted during the years 2017-2018 in Chapantongo (2017-2018) in Hidalgo, Mexico (20° 17' N and 99° 24' W, at 2,120 meters above sea level) in an agricultural area established in Phaeozem and Vertisol soil types. The climate is temperate-subhumid with an annual average precipitation of 550 mm and an average annual temperature of 18 °C. The study sites feature a north-south slope of 7% (INEGI, 2009), the sites were previously occupied by pastureland, and present an arable layer of up to 20 cm in depth.

**Field sampling.** Simple random sampling was performed from a field crop established in 10 plots on one-hectare with 13 rows containing 1,250 *O. matudae* cv. Rosa plants. A total of 200 plants were sampled with symptoms that resembled those of the disease described as golden spot in *O. ficus-indica* were found. Of these, 100 samples were randomly selected for isolation and purification of the pathogen causing the disease. The symptoms on the cladodes of the infected plants of *O. ficus-indica* are chlorotic spots around the spines. The spots develop into round and prominent golden yellow scabs, then the center necrotized leaving a yellowish halo. The disease caused by *A. alternata* in *O. ficus-indica* is also seen on the fruits, which often presents the same symptoms observed on the pads (Granata and Sidoti, 1997). Cladodes of *O. matudae* cv. Rosa plants presenting symptoms of the disease were collected, wrapped in sterile paper, and stored at 4 °C until their analysis. Plant samples were identified and deposited in the culture collection in the Laboratory of Phytopathology of the Xochimilco Metropolitan Autonomous University.

**Isolation and purification of fungus.** The plant material was washed with potable water and 2 cm<sup>2</sup> of tissue were disinfected during 3 min with a solution

presentan una capa arable con una profundidad de hasta 20 cm.

**Muestreo en campo.** Un muestreo aleatorio simple se llevó a cabo en un campo establecido en 10 parcelas que ocupaban una hectárea de superficie, con 13 hileras que contenían 1,250 plantas de *O. matudae* cv. Rosa. Un total de 200 plantas fueron muestreadas con síntomas que se asemejaban a los de la enfermedad descrita como mancha dorada en *O. ficus-indica*. De estas, 100 muestras fueron seleccionadas al azar para realizar el aislamiento y la purificación del patógeno causante de la enfermedad. Los síntomas de los cladidos de las plantas infectadas de *O. ficus-indica* son manchas cloróticas alrededor de las espinas. Las manchas se desarrollan hasta convertirse en costras redondas de color amarillo dorado, luego el centro se necrotiza dejando un halo amarillento. La enfermedad causada por *A. alternata* en *O. ficus-indica* también se observa en las frutas, que con frecuencia presenta los mismos síntomas que se observan en los cladidos (Granata y Sidoti, 1997). Cladidos de plantas de *O. matudae* cv. Rosa con síntomas de la enfermedad fueron recolectados, envueltos en papel estéril y almacenados a 4 °C hasta su análisis. Se identificaron muestras de plantas y se depositaron en la colección de cultivos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

**Aislamiento y purificación de hongos.** El material vegetal se lavó con agua potable y se desinfectaron 2 cm<sup>2</sup> de tejido durante 3 min con una solución de 5% de hipoclorito de sodio y 50% de alcohol. Después de enjuagarse tres veces con agua destilada estéril, fueron colocados sobre papel estéril para retirar el exceso de agua y después se colocaron fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> en cincuenta cajas con Papa Dextrosa Agar (PDA) y otros cincuenta con Agua y

of 5% of sodium hypochlorite and 50% alcohol. After washed three times with sterile distilled water they were placed on sterile paper to remove residual water, and then 0.5 cm<sup>2</sup> fragments were placed onto fifty plates containing Potato Dextrose Agar (PDA) and fifty containing Water Agar (WA). They were randomly placed and incubated at 28 ± 2 °C for five days. The fungi were identified using specific keys (Simmons, 2008). The same amount was used during purification.

The strains identified as *Alternaria* sp. were isolated with the hyphal tip technique in WA media and PDA and incubated at 28 ± 2 °C until sporulation was confirmed. The spores were collected, placed in an Eppendorf tube with 1 mL of Tween 20 solution (0.5%), and then stirred for 1 min. The samples were centrifuged for 30 s and then the supernatant was removed. Sterile distilled water was added to resuspend the spores. From this spore suspension 10<sup>-4</sup> dilutions were prepared, 0.5 mL was placed on PDA and WA plates, and were incubated at 28 ± 2 °C. After 24 h a fragment of the culture medium containing germinated spores was cut out and placed on PDA and WA plates and incubated at 28 ± 2 °C until sporulation (Montiel *et al.*, 2016). Fragments of monosporic cultures in Rose Bengal Agar culture media, Czapek Dox-agar and Sabouraud Agar plates were incubated at 28 ± 2 °C for 24 h. The spores were identified morphologically with taxonomic keys (Simmons, 2008).

#### **Morphological and molecular identification.**

A fragment of two pure *Alternaria* colony were placed in PDA medium and incubated at 28 °C until maximum development; the mycelium developed was macerated with liquid nitrogen until a fine powder was obtained. From this colony genomic DNA extraction was performed with 0.5 g of powdered mycelium (Shure *et al.*, 1983),

Agar (WA). Fueron colocados de manera aleatoria e incubados a 28 ± 2 °C por cinco días. Los hongos fueron identificados mediante el uso de claves específicas (Simmons, 2008). Las mismas cantidades se usaron para la purificación.

Las cepas identificadas como *Alternaria* sp. se aislaron mediante la técnica de punta de hifa en los medios WA y PDA y se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que se confirmó la esporulación. Las esporas se colectaron, y se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 mL de solución Tween 20 (0.5%) y se agitaron por 1 min. Las muestras se centrifugaron por 30 s y el sobrenadante se descartó. Se agregó agua estéril destilada para resuspender las esporas. De esta suspensión de esporas se prepararon diluciones al 10<sup>-4</sup>, 0.5 mL se colocaron en cajas con PDA y WA y se incubaron a 28 ± 2 °C. Después de 24 h se cortó un fragmento del medio de cultivo con esporas germinadas y se colocó en cajas con PDA y WA y se incubó a 28 ± 2 °C hasta la esporulación (Montiel *et al.*, 2016). Se incubaron fragmentos de cultivos monospóricos en un medio de cultivo Agar Rosa de Bengala, agar modificado Czapek Dox y Agar Sabouraud a 28 ± 2 °C por 24 h. Las esporas se identificaron morfológicamente mediante claves taxonómicas (Simmons, 2008).

**Identificación morfológica y molecular.** Un fragmento de dos cultivos puros de *Alternaria* se colocaron en un medio PDA y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar su desarrollo máximo; el micelio desarrollado se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. A partir de este cultivo se realizó una extracción de ADN genómico con 0.5 g of de micelio en polvo (Shure *et al.*, 1983), se verificó con la técnica de electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, se tiñió con bromuro de etidio y la concentración se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop 1000. El ADN fúngico se usó para la amplificación del gen ARN 18S ribosomal.

verification was performed with the technique of electrophoresis in 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide and the concentration was determined with the NanoDrop 1000 spectrophotometer. The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene.

The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene using the oligonucleotides NS5 / NS6, and the intergenic region ITS1 (ITS5 / ITS2) and ITS2 (ITS5 / ITS4) of the genes that encode for ribosomal RNAs 18S, 5.8S and 28S, respectively (White *et al.*, 1990). The amplification of the fragments (ITS1 was a length of 234 bp and ITS2 was a length of 565 bp) was done with the PCR technique (30  $\mu\text{L}$  of a reaction mixture: JumpStart™ Reaction mix 2x, 50 ng of fungal gDNA and 10 pM  $\mu\text{L}^{-1}$  of oligonucleotides). The mixture was placed in the TC-5000 Techne® thermal cycler according to the program (denaturalization at 94 °C, 160/35 s, 35 cycles; alignment at 55 °C, 35 cycles; extension at 72 °C, 45 s, 35 cycles and final extension at 72 °C, 300 s 35 cycles) (White *et al.*, 1990). The PCR products were separated by electrophoresis in agarose gel at 0.8% and purified with the Sigma® GenElute Gel extraction kit. The purified PCR products were bound in pGEM T-Easy vector (Promega), transformed into competent cells of *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ , re-sowed in liquid medium LB with ampicillin, incubated at 37 °C with constant movement during 24 h. From the obtained colonies the plasmid DNA was purified with Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit of GE Healthcare and the digestion was done with the restriction enzymes EcoRI and PstI; the digestion was separated by electrophoresis in agarose gel at 0.8% with ethidium bromide, photo-documented on the BIO-RAD Fluor-S® Max Multi Imager and quantified on the NanoDrop 1000

El ADN fúngico extraído se usó para la amplificación del gen ARN 18S ribosomal mediante los oligonucleótidos NS5 / NS6, y la region intergénica ITS1 (ITS5 / ITS2) y ITS2 (ITS5 / ITS4) de los genes que codifican para los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S, respectivamente (White *et al.*, 1990). La amplificación de los fragmentos (ITS1 fue de un largo de 234 bp y ITS2, de 565 bp) se llevó a cabo con la técnica PCR (30  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción: JumpStart™ Reaction mix 2x, 50 ng de gADN fúngico y 10 pM  $\mu\text{L}^{-1}$  de oligonucleótidos). La mezcla se colocó en el termociclador TC-5000 Techne® de acuerdo con el programa (desnaturalización a 94 °C, 160/35 s, 35 cycles; alineamiento a 55 °C, 35 ciclos; extensión a 72 °C, 45 s, 35 ciclos y extensión final a 72 °C, 300 s 35 ciclos) (White *et al.*, 1990). Los productos PCR se separaron por electrophoresis en gel de agarose a 0.8% y se purificaron con el kit de extracción Sigma® GenElute Gel. Los productos de PCR purificados fueron unidos en pGEM T-Easy vector (Promega), transformados en células de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , re-plantados en medio líquido LB con ampicilina, e incubados a 37 °C con movimiento constante durante 24 h. De los cultivos obtenidos, el ADN plásmido se purificó con Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit de GE Healthcare y la digestión se realizó con las enzimas de restricción EcoRI y PstI; la digestión se separó por electroforesis en gel de agarosa a 0.8% con bromuro de etidio, se fotodocumentó en el BIO-RAD Fluor-S® Max Multi Imager y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Las secuencias se llevaron a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se editaron mediante FinchTV y fueron identificadas como Altal-ITS1 y Altal-ITS2. Para determinar sus especies se usó la herramienta BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) database

spectrophotometer. The sequences were performed in the DNA Synthesis and Sequencing Unit of the Biotechnology Institute of UNAM. The obtained sequences were edited on FinchTV and identified as Altal-ITS1 and Altal-ITS2. To determine their species, the BLAST tool was used in the National Center Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). To determine the sequence identity of the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 (234 and 565 bp respectively), the isolates used were *Alternaria alternata* isolate wxm90 (GenBank: HM051066.1); *Alternaria* sp. ZH7-C2 (GenBank: FJ037737.1); Uncultured fungus clone AA45-2 (GenBank: GU065589.1); *Septoria lycopersici* isolate NW574B (GenBank: EU520171.1); *Alternaria* sp. ALT3 (GenBank: HM114272.1); *Alternaria alternata* strain KHF-5 (GenBank: MN173818.1); *Alternaria alternata* isolate Altal-ITS1 (GenBank: MW092952.1); Altal-ITS2 (GenBank: MW092953); *Alternaria* sp. JM-1 (GenBank: GQ389617.1); *Alternaria azukiae* strain wxm133 (GenBank: HM037984.1); *Alternaria alternata* (GenBank: LC269969.1) and *Alternaria alternata* isolate R1-1 (GenBank: FJ827039.1). The Altal-ITS1 and Altal-ITS2 sequence was aligned with the previous sequences and the phylogenetic tree was constructed using Unipro UGENE v. 41.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

**Pathogenicity test.** Field evaluation was carried out under greenhouse conditions, in which mature cladodes of xoconostle (*O. matudae* cv. Rosa) were obtained from healthy plants. Prior to performing the seeding, twenty cladodes were washed with sterilized water and disinfected with a solution of 5% sodium hypochlorite; these cladodes were left in the shade during 20 days for scarring of the cut. Later, they were established in 35 x 35 cm plastic bags filled with a mixture of tezontle (volcanic

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para determinar la identidad de la secuencia de Altal-ITS1 y de Altal-ITS2 (234 y 565 bp respectivamente), los aislados usados fueron *Alternaria alternata* aislado wxm90 (GenBank: HM051066.1); *Alternaria* sp. ZH7-C2 (GenBank: FJ037737.1); Clon fúngico no-cultivado AA45-2 (GenBank: GU065589.1); *Septoria lycopersici* aislado NW574B (GenBank: EU520171.1); *Alternaria* sp. ALT3 (GenBank: HM114272.1); *Alternaria alternata* cepa KHF-5 (GenBank: MN173818.1); *Alternaria alternata* aislado Altal-ITS1 (GenBank: MW092952.1); Altal-ITS2 (GenBank: MW092953); *Alternaria* sp. JM-1 (GenBank: GQ389617.1); *Alternaria azukiae* cepa wxm133 (GenBank: HM037984.1); *Alternaria alternata* (GenBank: LC269969.1) y *Alternaria alternata* isolate R1-1 (GenBank: FJ827039.1). Las secuencias de Altal-ITS1 y Altal-ITS2 se alinearon con las secuencias previas y se contruyó un árbol filogenético mediante el uso de Unipro UGENE v. 41.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

**Prueba de patogenicidad.** Se realizó una evaluación de campo bajo condiciones de invernadero, en la que se utilizaron cladodios maduros de xoconostle (*O. matudae* cv. Rosa) de plantas sanas. Antes de realizar la siembra, se lavaron 20 cladodios con agua esterilizada y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Estos cladodios se dejaron a la sombra durante 20 días para dejar cicatrizar los cortes. Luego, se sembraron en bolsas de plástico de 35 x 35 cm llenas con una mezcla de tezontle (piedra volcánica) y arena de sílice (2:1).

Antes de la inoculación llevada a cabo en el invernadero, se realizó la activación de un aislado de forma separada en matraces de 250 mL con un medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Después de 8 días de incubación a  $28 \pm 2$  °C, se agregaron a cada matraz 20 mL adicionales de Tween 80 a 0.05%, y éstos se colocaron bajo agitación orbital

rock) and silica sand (2:1).

Prior to the inoculation carried out at the greenhouse, activation of one isolated was performed separately in 250 mL flasks in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. After 8 days of incubation at  $28 \pm 2$  °C, an additional 20 mL of Tween 80 at 0.05%, was added to each flask and these were placed under orbital shaking during 1 min. The solution obtained from the shaking was passed through a Whatman #40 filter and the filtrate was diluted with 130 mL sterile water, which was applied to the cladodes of the xocostle plants. The cladodes inoculated by aspersion of 13 mL of a solution and a control (water) were constituted in the treatments. Each treatment had 10 repetitions (cladodes) distributed in an arrangement completely at random. Every 15 days, observations were performed in the search for the appearance of symptoms similar to those of golden spot, noting the treatment and the number of plants in cases in which the symptoms appeared. In case of the appearance of the symptomatology similar to those of golden spot 0.5 cm<sup>2</sup> fragments of the cladodes were disinfected in the 2% sodium hypochlorite solution and seeded onto PDA plates and incubated at  $28 \pm 2$  °C. After 8 days of growth, the colonies were identified morphologically with taxonomic keys (Simmons, 2008).

**Statistical analysis.** Data were submitted to tests of normality (Shapiro-Wilk W test) and homoscedasticity (Levene). Kruskal-Wallis Analysis of Variance (ANOVA) and means comparison (Steel-Dwass) tests were used when the supposed normality could not be corrected using transformations. ANOVA and the Tukey test ( $p < 0.05$ ) were used to separate treatments. Data analysis and processing was carried out with JMP® ver. 11 statistical software packages (SAS, 2012).

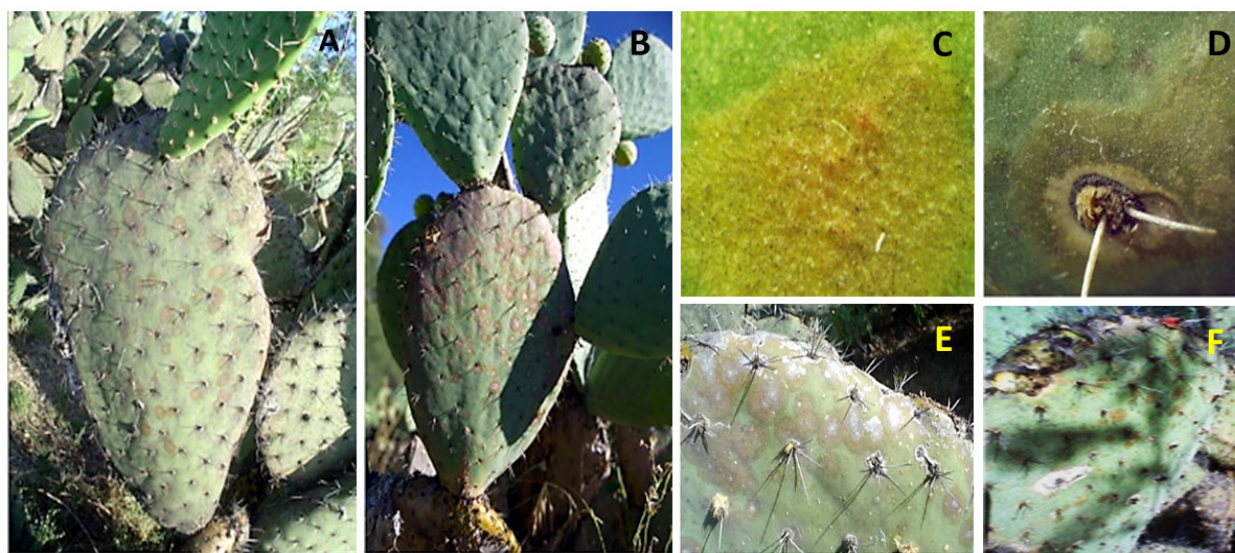
durante 1 min. La solución obtenida de la agitación se pasó a través de un filtro Whatman #40 y el filtrado se diluyó con 130 mL de agua estéril, la cual se aplicó a los cladodios de las plantas de xocostle. Los cladodios inoculados por aspersion con 13 mL de una solución y un control (agua) fueron los dos tratamientos evaluados. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones (cladodios) distribuidos en un arreglo completamente al azar. Cada 15 días se realizaban observaciones en busca de síntomas similares a los de la mancha dorada, anotando el tratamiento y el número de plantas cuando aparecían síntomas. En el caso de aparecer la sintomatología similar a la de la mancha dorada, se desinfectaban fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> de los cladodios en la solución de hipoclorito de sodio al 2%, se sembraban en cajas con PDA y se incubaban a  $28 \pm 2$  °C. Después de 8 días de crecimiento, los cultivos se identificaron morfológicamente con claves taxonómicas (Simmons, 2008).

**Análisis estadístico.** A los datos se les realizó una prueba de normalidad (prueba Shapiro-Wilk W) y de homocedasticidad (Levene). Se recurrió a las pruebas de Análisis de Varianza Kruskal-Wallis (ANDEVA) y comparación de medias (Steel-Dwass) cuando la supuesta normalidad no pudo ser corregida usando transformaciones. Se usaron las pruebas ANOVA y de Tukey ( $p < 0.05$ ) para separar tratamientos. El análisis y el procesamiento de datos se desarrollaron con los paquetes de software estadísticos JMP® ver. 11 (SAS, 2012).

**Muestreo en campo.** La presencia de síntomas se observó en 100% de las plantas muestreadas del cultivo de xocostle. La enfermedad se presentaba, por lo general, en el borde superior del cladodio previo al cladodio en fructificación (Figura 1A, B). Esta comienza en los cladodios como puntos

**Field Sampling.** The presence of symptoms was observed in 100% sampled plants of the xoconostle crop. The disease presented generally in the cladode on the upper edge or on that prior to fruiting cladode (Figure 1A, B). This begins in the cladodes as points of yellow color or spot chlorosis that often presented near the areoles (Figures 1C, D), similar to those caused by *A. alternata* and reported by Granata and Sidoti (1997) on cactus pear, and these evolved until they formed a golden spot and necrosis on the epidermis (Figures 1E, F). Subsequently, these acquired the appearance of burns as a result of the fusion of the spots, with elevation of the cuticle, dehydration of the tissue, and crusting. Similar symptomatology has been reported for *Opuntia ficus* (Swart and Kriel, 2002; Granata and Sidoti, 1997). The symptoms found in

amarillos o manchas cloróticas que normalmente se presentan cerca de las areolas (Figuras 1C, D), similares a las causadas por *A. alternata* y reportadas por Granata y Sidoti (1997) en tuna y que evolucionaron hasta formar una mancha dorada y necrosis en la epidermis (Figuras 1E, F). Más adelante, adquirieron la apariencia de quemaduras como resultado de la fusión de las manchas, con la elevación de la cutícula, deshidratación del tejido y formación de una costra. Una sintomatología similar ha sido reportada en *O. ficus-indica* (Swart y Kriel, 2002; Granata y Sidoti, 1997). Los síntomas hallados en la planta del xoconostle en este estudio no correspondían con los descritos por Ammar *et al.* (2004) y Flores *et al.* (2013) producidos por *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* en cladodios y pudrición de frutas del tunar,



**Figure 1.** Expression of golden spot in *Opuntia matudae*, var. Rosa in plants sampled in the field. The symptomatology generally presented on the upper edge of cladode (A); and on that prior to fruiting cladode (B); golden spot on the epithelial tissue (C); presence of golden spot in the areole and thickening of the epithelial tissue (D); thickening of the tissue caused by fusion of the golden spots, mainly on the upper edge of the cladode (E) and concentric lesion in cladode tissue and necrosis on the epidermis (F).

**Figura 1.** Expresión de mancha dorada en *Opuntia matudae*, var. Rosa en plantas muestreadas en el campo. La sintomatología por lo general se presentaba en la orilla superior del cladodio (A); y en el previo al cladodio en fructificación (B); mancha dorada en el tejido epitelial (C); presencia de mancha dorada en la areola y el engrosamiento del tejido epitelial (D); engrosamiento del tejido causado por la fusión de las manchas doradas, principalmente en el borde superior del cladodio (E) y lesiones concéntricas en tejido del cladodio y necrosis en la epidermis (F).

the xoconostle plant in this study did not correspond to those described by Ammar *et al.* (2004) and Flores *et al.* (2013) produced by *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani* on cladodes and fruit rots of prickly pear cactus, nor to those described by Méndez *et al.* (2008) for golden spot caused by *Alternaria* sp., *Hansfordia* sp., *Ascochyta* sp. in *O. ficus-indica*. These authors state that the damage presents in the fruiting cladode and that it affects the entire area of the cladode in this species, unlike in the xoconostle, where the damage is observed in the cladode prior to the apical cladode and that does not present in the fruits (Figure 1A, B).

The lesions reported by Swart and Kriel (2002) for golden spot in the cladodes of *O. ficus-indica* present a similar pattern, since these authors describe chlorosis around the spines, which was observed in our study; however, the presence of exudates in the lesions, reported by Ammar *et al.* (2004), was not found.

**Morphological and molecular identification.** Purification allowed for the elimination of saprophytic organisms. From a 100 samples *A. alternata* was identified in 100% of the incubated plates. The distinctive feature of the colony in PDA culture medium was greenish-grey plush, concentric with whitish rim, dark brown plate underside. The conidiophores were 3 to 6  $\mu\text{m}$  thick and 50  $\mu\text{m}$  long on average. The conidia were generally short in chains of 3 to 5 conidia, secondary conidiophores were also observed, short, straight, ovoid, with short cylindrical beak, 7-25  $\mu\text{m}$  long, 5-12  $\mu\text{m}$  wide, olive colored, with 3 transverse septa and 2 longitudinal septa. According to McKenzie (2013), the morphology corresponds to *A. alternata* (Figure 2C-D).

The Altal-ITS1 (length of 234 bp NCBI Access num: MW092952) and Altal-ITS2

ni con los descritos por Méndez *et al.* (2008) para la mancha dorada causada por *Alternaria* sp., *Hansfordia* sp., *Ascochyta* sp. en *O. ficus-indica*. Estos autores exponen que el daño se presenta en el cladodio en fructificación y que afecta al área completa del cladodio en esta especie, a diferencia del xoconostle, donde el daño se observó en el cladodio previo al cladodio apical y no se presenta en las fructificaciones (Figura 1A, B).

Las lesiones reportadas por Swart y Kriel (2002) para la mancha dorada en los cladodios de *O. ficus-indica* presentan un patrón similar, ya que estos autores registran la presencia de clorosis alrededor de las espinas, lo cual se observó en el presente estudio. Sin embargo, la presencia de exudados en las lesiones reportada por Ammar *et al.* (2004), no fue encontrada.

**Identificación morfológica y molecular.** La purificación permitió la eliminación de organismos saprofitos. De 100 muestras, se indentificó a *A. alternata* en 100% de las cajas incubadas. La característica distintiva del cultivo en el medio de cultivo PDA fue una capa color gris verdoso concéntrica con un borde blanquecino y un color café oscuro en el fondo de la caja. Los conidióforos median de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de grosor y un promedio de 50  $\mu\text{m}$  de largo. Los conidios eran cortos, por lo general, con cadenas de 3 a 5 conidios. También se observaron conidióforos secundarios cortos, rectos, ovoides, con un pico corto y cilíndrico de 7-25  $\mu\text{m}$  de largo, 5-12  $\mu\text{m}$  de ancho, color olivo, con 3 septas transversales y 2 longitudinales. De acuerdo con McKenzie (2013), la morfología corresponde a la de *A. alternata* (Figura 2C-D).

La secuencia de Altal-ITS1 (234 bp de largo Número de accession NCBI: MW092952) y Altal-ITS2 (largo de 565 bp Número de accession NCBI: MW092953) presentó un porcentaje de homología (98%). Los lineamientos de la base de datos de



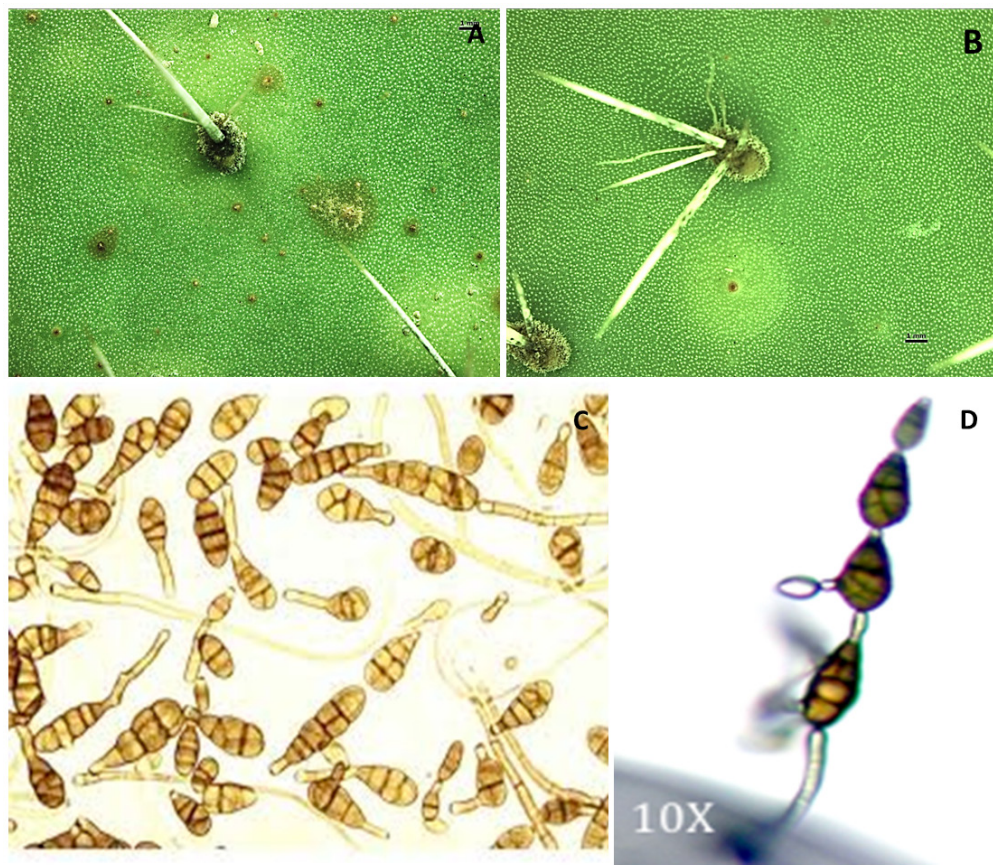


Figure 2. Symptoms caused by the inoculation of *Alternaria alternata* in cladodes of xocoostle under greenhouse conditions: without the presence of the chlorotic halo (A); with the presence of the chlorotic halo (B); *A. alternata* colony sporulation pattern in short (C); branched chain in the second conidium (D).

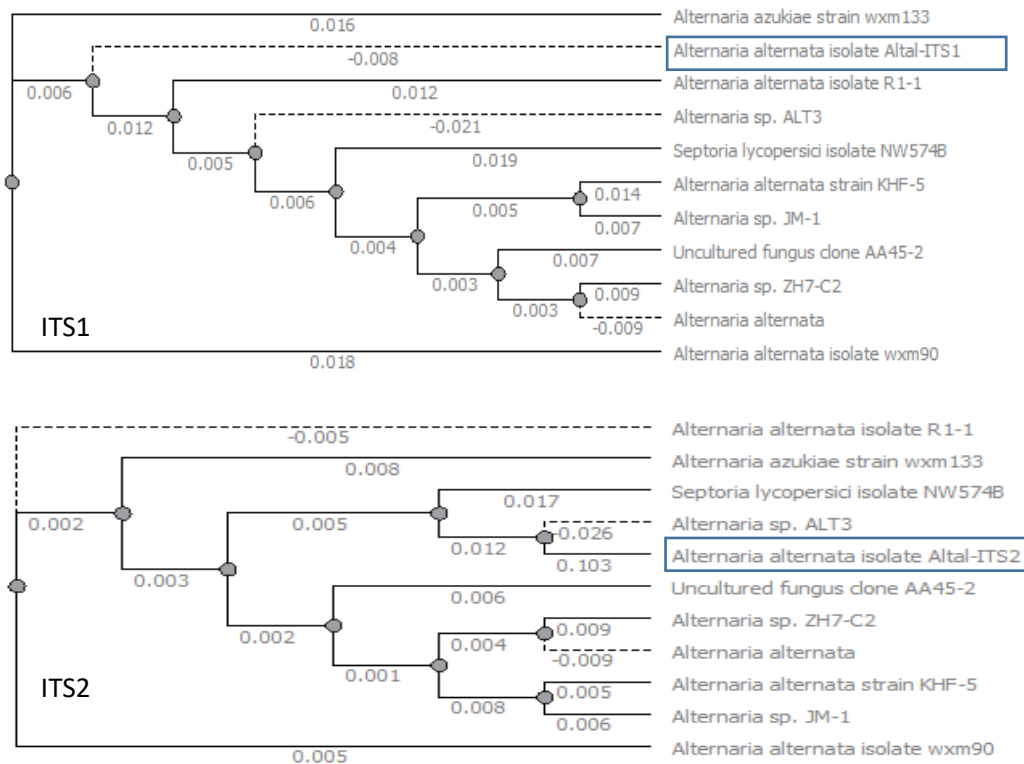
Figura 2. Síntomas causados por la inoculación de *Alternaria alternata* en cladodios de xocoostle en condiciones de invernadero: sin la presencia del halo clorótico (A); con la presencia del halo clorótico (B); patrón de esporulación del cultivo de *Alternaria alternata* en cadenas cortas (C); cadenas de conidios (D).

sequence (length of 565 bp NCBI Acces num: MW092953) showed a homology percentage (98%). According to alignments in the National Center Biotechnology Information database and the previous morphological characterization, allowed the identification of *Alternaria alternata* (Figure 3).

**Greenhouse experiment.** Ten months after inoculation carried out at the greenhouse, the appearance of symptoms similar to those caused by

National Center Biotechnology Information y la caracterización morfológica previamente descrita, permitieron la identificación de *Alternaria alternata* (Figura 3).

**Experimento en invernadero.** Diez meses después de la inoculación realizada en el invernadero comenzó la aparición de síntomas similares a los causados por la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) se observó entre los tratamientos evaluados, y se encontró que



**Figure 3. Phylogenetic tree construction comparing the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 amplified regions in *Alternaria alternata*.  
 Figura 3. Construcción del árbol filogenético comparando las regiones amplificadas Altal-ITS1 y Altal-ITS2 en *Alternaria alternata*.**

golden spot in *O. ficus-indica* began. A significant difference ( $P \leq 0.05$ ) was observed among the treatments evaluated, finding that those in which the solution containing the strain, were those that presented experimental units with symptomatology, while the control treatment did not present these. In cladodes inoculated with solution containing the isolated were identified areas in brown color with a diameter of between 1 and 5 mm and an elevation of the tissue; but chlorotic halos were not registered (Figure 2A). However, there were also cladodes in which the chlorotic halo was present (Figure 2B). The microorganisms identified from the isolates corresponded to *Alternaria alternata*, observing the presence of their conidia in the spines of the cladodes.

aquellos en que se aplicó la solución conteniendo los aislados, fueron los que presentaron la sintomatología, mientras que el tratamiento control no la presentó. En cladodios inoculados con la solución con el aislamiento se identificaron áreas en color café con un diámetro de entre 1 y 5 mm y una elevación del tejido, pero los halos cloróticos no se registraron (Figura 2A). Sin embargo, también hubo cladodios en los que el halo clorótico estaba presente (Figura 2B). Los microorganismos identificados a partir de los aislamientos correspondieron con *Alternaria alternata*, observando la presencia de sus conidios en las espigas de los cladodios.

Observaciones morfológicas permitieron identificar a *Alternaria alternata* como el agente causal de la mancha dorada en *O. matudae* y los síntomas

Morphological observations allowed to identify *A. alternata* as the causal agent of the Golden spot in *O. matudae* and the symptoms are similar to that of the golden spot in *O. ficus-indica*. The molecular characterizations of the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 isolation coincided with the *A. alternata* species. More research is needed to investigate the effect of the integrated management and specially of fungicides on the growth of the pathogenic fungi *A. alternata* in xoconostle.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Secretaría de Educación Pública (SEP) through the Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) with Project no. 34411246 “Rescate y Evaluación de Especies Endémicas de Interés Agrícola”, and the Department of Agricultural and Animal Production of the Autonomous Metropolitan University, Xochimilco Unit, with the Project denominated “Determinación Morfológica y Molecular del Agente causal del Mal del Oro en Xoconostles” DCBS.CD.447.12.

#### LITERATURE CITE

- Ammar MI, Shltout AM and Kamhawy M. 2004. Cladode and fruit rots of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.). Egyptian Journal of phytopathology 32:119-128.
- Choueiri E, Massad R, Jreijiri F, Danet JL, Salar P, Bové J and Foissac X. 2005. First report of a 16SrII group phytoplasma associated with shoot proliferation of a cactus (*Opuntia monacantha*) in Lebanon. Plant Disease 89:1129. <https://doi.org/10.1094/pd-89-1129b>
- Defelice MS. 2004. Prickly pear cactus, *Opuntia* spp. A spine-tingling tale. Weed Technology 18:869-877. <https://doi.org/10.1614/wt-04-134>
- Flores FR, Velázquez VMG, León RR, Flores MHE and Hernández LAN. 2013. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. Journal of Phytopathology 161:544-552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>
- Gallegos-Vázquez C, Scheinvar L, Núñez-Colín C and Mondragón-Jacobo C. 2012. Morphological diversity of xoconostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional foods. Fruits 67(2):4-20. <https://doi.org/10.1051/fruits/2012001>

son similares a los de la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Las caracterizaciones moleculares de los aislamientos Altal-ITS1 y Altal-ITS2 coincidieron con la especie de *Alternaria alternata*. Se requiere de más investigación para conocer el efecto del manejo integrado de productos y sobre todo de fungicidas en el crecimiento del hongo patógeno *A. alternata* en xoconostle.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Secretaría de Educación Pública (SEP) a través del Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) con el proyecto 34411246 “Rescate y Evaluación de Especies Endémicas de Interés Agrícola” y el Departamento de Producción Agrícola y Animal of the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, con el proyecto denominado “Determinación Morfológica y Molecular del Agente causal del Mal del Oro en Xoconostles” DCBS.CD.447.12.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Granata G and Sidoti A. 1997. Appearance of *Alternaria* golden spot on cactus pear in Italy. Acta Horticulture 438:129-130. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1997.438.16>
- Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany 91:1915-1921. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1915>
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Chapantongo, Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/13/13017.pdf>
- McKenzie, E. 2013. *Alternaria alternata* (*Alternaria alternata*). PaDIL <https://www.padil.gov.au/maf-border/pest/main/142985/50820>
- Méndez GSJ, Talavera MD and García HEJ. 2008. Identificación y control de las enfermedades más comunes en el nopal. Revista de Salud Pública y Nutrición 14:105-113. <http://respyn2.uanl.mx/especiales/2008/ee-14-2008/documentos/05.pdf>
- Montiel SD, Ruíz JD, Olivares OJL and Segundo PE. 2016. Guía práctica para el diagnóstico de microorganismos de interés agrícola. CBS 50. UAM. México. 60 p.

- Morales P, Barros L, Ramírez ME, Santos BC and Ferreira ICFR. 2015. Xoconostle fruit (*Opuntia matudae* Scheinvar cv. rosa) by-products as potential functional ingredients. *Food Chemistry* 185:289-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.012>
- Morales P, Barros L, Ramírez ME, Santos BC and Ferreira ICFR. 2014. Exploring xoconostle by-products as sources of bioactive compounds. *Food Research International* 65: 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.067>
- Morales P, Ramírez ME, Sánchez MMC, Carvalho AM and Ferreira ICFR. 2012. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International* 46: 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.031>
- Quezada A, Sandoval S, Alvarado D and Cárdenas E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia* 40: 641-653. <https://doi.org/10.24275/uami.hm50tr74r>
- Rodríguez AG, Fernández PSP and Landa HL. 2001. First Report of *Pythium aphanidermatum* causing crown and stem rot on *Opuntia ficus-indica*. *Plant Disease* 85:231. <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.2.231b>
- Sáenz C, Berger H, García JC, Galletti L, Cortázar VG, Higuera I, Mondragón C, Rodríguez FA, Sepúlveda E and Varnero MT. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*. FAO Roma, Italia.162p.
- SAS. 2012. Institute, Inc., JMP 10. Basic Analysis and Graphing, Vol. 1.
- Simmons GE. 2008. *Alternaria: An Identification Manual*. The Netherlands [CBS Fungal Diversity Series No. 6.] *Mycological Research* 112(9) 1130. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.012>
- Shure M, Wessler S and Fedoroff N. 1983. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell* 35 (1): 225-233 [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90225-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90225-8)
- Swart W and Kriel WM. 2002. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in South Africa. *Plant Disease* 86: 693. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.6.693d>
- Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M. 2012. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., New York, 315-322 pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>