

# Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*

## Análisis genético de la resistencia a fungicidas en *Fusarium oxysporum* asociado a *Vanilla planifolia*

Nelly Abigail González-Oviedo, Lourdes Georgina Iglesias-Andreu, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101, Col. Emiliano Zapata, CP 91090, Xalapa, Veracruz, México; Felipe Roberto Flores-de la Rosa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CIR Golfo Centro, Campo Experimental Ixtacuaco, Km 4.5 carretera federal Martínez de la Torre – Tlapacoyan, Cong. Rojo Gómez, CP 93650, Tlapacoyan, Veracruz, México; Andrés Rivera-Fernández, Mauricio Luna-Rodríguez\*, Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Lomas del Estadio s/n, CP 91000, Xalapa, Veracruz, México.

\*Corresponding author: mluna@uv.mx

Received: March 15, 2022.

Accepted: June 26, 2022.

González-Oviedo NA, Iglesias-Andreu LG, Flores-de la Rosa FR, Rivera-Fernández A and Luna-Rodríguez M. 2022. Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 330-348.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-3>

First DOI publication: July 15, 2022.

Primera publicación DOI: 15 de Julio, 2022.

**Abstract.** *Vanilla planifolia* is attacked by the fungus *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Since there are no resistant genotypes available to producers, they opt for the use of synthetic fungicides to control the disease, however, there is no information on a possible resistance of the pathogen to these commercial fungicides. The goal of the work was to analyze the response of *F. oxysporum* strains,

**Resumen.** *Vanilla planifolia* es atacada por *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*. Dado que no existen genotipos resistentes disponibles para los productores, éstos optan por el uso de fungicidas sintéticos para su control; sin embargo, no hay información sobre la respuesta del patógeno a estos productos comerciales. El objetivo del trabajo fue analizar la respuesta de cepas de *F. oxysporum*, patógenas (nueve) y no patógenas (tres) de *V. planifolia*, a tres bencimidazoles (tiofanato metílico, benomilo y carbendazim) y a clorotalonil, así como las bases genéticas de la respuesta al fungicida mediante el estudio de las proteínas blanco de los mismos, la  $\beta$ -tubulina y la GPDH, respectivamente. Se observó que las 12 cepas estudiadas fueron susceptibles a los fungicidas benomilo y carbendazim, mientras que 11 de ellas fueron resistentes al tiofanato metílico y nueve al clorotalonil. No se encontraron diferencias entre el carácter patogénico o la

pathogenic (nine) and non-pathogenic (three) of *V. planifolia*, to three fungicides of the benzimidazole family and to chlorothalonil, as well as the genetic bases by studying the target proteins of these active ingredients,  $\beta$ -tubulin and GPDH. It was observed that the 12 strains studied were susceptible to the fungicides benomyl and carbendazim, while 11 of them were resistant to thiophanate methyl and nine to chlorothalonil. No relationship was found between the pathogenic character or the origin of the strains and the susceptibility to fungicides. It was found that resistance to thiophanate methyl is not conferred by a point mutation of the  $\beta$ -tubulin coding sequence, as previously hypothesized; apparently, it could be more related to the absence of protein motifs. No relationship was observed between variation in the gene GPDH with the resistance or susceptibility of the strains.

**Keywords:** Vanilla, root rot, stem rot, GPDH,  $\beta$ -tubulin.

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is an orchid with important commercial value due to the compound vanillin, that it produces. Vanillin is sought after by various industries for its aroma and flavor. This crop faces a significant threat from the disease known as “root and stem rot”, which is caused by the ascomycete *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2015). However, it has been shown that vanilla is associated with multiple genotypes of *F. oxysporum* that do not necessarily behave as pathogens (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017). This also happens with other plant species, which has led to subdividing them into pathogenic (*formae speciales*) and beneficial endophytes to avoid losing valuable genetic information that could help understand the nature of this pathogen (Lecomte *et al.*, 2016).

procedencia de las cepas en relación con la susceptibilidad a los fungicidas. Se encontró que la resistencia al tiofanato metílico no es otorgada por una mutación puntual de la secuencia codificante de la  $\beta$ -tubulina, como se ha hipotetizado anteriormente; al parecer, pudiera estar más relacionada con la ausencia de motivos de la proteína. No se observó relación entre variación del gen GPDH con la resistencia o susceptibilidad de las cepas.

**Palabras clave:** Vainilla, pudrición de raíz, pudrición de tallo, GPDH,  $\beta$ -tubulina.

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una orquídea de alto valor comercial debido a que produce el compuesto vainillina. La vainillina es buscada por varias industrias por su aroma y sabor. Este cultivo enfrenta una importante amenaza por la enfermedad conocida como “pudrición de raíz y tallo” causada por el ascomicete *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la vainilla está asociada a múltiples genotipos de *F. oxysporum*, sin necesidad de que todos se comporten como patógenos (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017). Lo anterior, sucede también con otras especies vegetales, lo que ha llevado a subdividirlos en patogénicos (*formae speciales*) y endófitos benéficos, buscando de esta forma evitar perder valiosa información genética que ayude a entender la naturaleza del patógeno (Lecomte *et al.*, 2016).

Al no existir genotipos de vainilla resistentes al alcance de los productores mexicanos, éstos buscan alternativas para el control de la enfermedad, siendo el control químico mediante fungicidas el principal método utilizado, sobre todo en la principal región productora de Papantla, Veracruz (Hernández-Hernández, 2011), zona considerada como el centro de origen, domesticación y distribución de

Since there are no resistant vanilla genotypes available to Mexican producers, they seek alternatives to control the disease, the main one being chemical control based on the use of fungicides. The main vanilla-producing region is Papantla, in the state of Veracruz (Hernández-Hernández, 2011), an area considered to be the center of origin, domestication and distribution of vanilla (Lubinsky *et al.*, 2008). The chemical control of Fusarium wilt in vanilla is performed mainly with fungicides of the benzimidazole group (Hernández-Hernández, 2019). These fungicides directly affect the degradation of  $\beta$ -tubulin in microtubules, thus inhibiting fungal cell division (Zhang *et al.*, 2015). Other fungicides suggested for the control of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* are broad-spectrum ones, such as chlorothalonil, of the carbamate group, which have multiple sites of action in fungal cells, including the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), involved in glycolysis, which, when inactivated, causes the death of the fungus (Long and Siegel, 1975; Baćmaga *et al.*, 2018).

In the case of benzimidazoles, numerous cases of resistance have been reported in various *formae speciales* of *F. oxysporum* (Arie, 2019), which have previously been associated with a point mutation at position 200 of the encoding sequence of  $\beta$ -tubulin (Petkar *et al.*, 2017). For this reason, it is crucially important to determine the real susceptibility of *F. oxysporum* isolates to these fungicides, before using to control these pathogens. The present study aimed to evaluate the effect of three fungicides of the benzimidazole group and chlorothalonil on pathogenic and non-pathogenic strains of *F. oxysporum* associated with *Vanilla planifolia*. An additional aim was to determine whether resistance in strains of this *forma specialis* is related to point mutations in the sequences of the target proteins,  $\beta$ -tubulin and glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

la vainilla (Lubinsky *et al.*, 2008). El control químico de la fusariosis en la vainilla se lleva a cabo principalmente con fungicidas de la familia de los bencimidazoles (Hernández-Hernández, 2019). Estos fungicidas inciden directamente en la degradación de la  $\beta$ -tubulina de los microtúbulos, inhibiendo de esta forma la división celular fúngica (Zhang *et al.*, 2015). Otros sugeridos para el control de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* son los fungicidas de amplio espectro, como el clorotalonil, perteneciente a la familia de los carbamatos, los cuales tienen múltiples sitios de acción en las células del hongo, entre ellas la enzima glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa (GPDH) involucrada en la glucólisis, que al inactivarse ocasiona la muerte del hongo (Long y Siegel, 1975; Baćmaga *et al.*, 2018).

Sin embargo, en el caso de los bencimidazoles, se han reportado numerosos casos de generación de resistencia en diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* (Arie, 2019), la cual ha sido previamente asociada a una mutación puntual en la posición 200 de la secuencia codificante de la proteína  $\beta$ -tubulina (Petkar *et al.*, 2017), por tal razón es de suma importancia determinar la susceptibilidad real de aislados de *F. oxysporum* a estos fungicidas, antes de ser utilizados para el control de estos patógenos. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres fungicidas de la familia de los bencimidazoles y el clorotalonil en cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de *Vanilla planifolia*, además de determinar si la resistencia en cepas de esta *forma specialis* está relacionada con mutaciones puntuales en las secuencias de las proteínas blanco,  $\beta$ -tubulina y glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas de *F. oxysporum*.** Para el presente estudio se utilizaron 12 cepas de *F. oxysporum* aisladas de

## MATERIALS AND METHODS

**Strains of *F. oxysporum*.** Twelve strains of *F. oxysporum* isolated from vanilla were used in the present study: nine strains that are pathogenic for *V. planifolia* and three non-pathogenic ones (Table 1). Except for strains BC1, Chic3 and JF9, the identification (morphological and molecular) and pathogenic capacity of the other strains were reported in the works of Adame-García *et al.* (2015), Casillas-Isiordia *et al.* (2017) and Flores-de la Rosa *et al.* (2018). The morphological and genetic properties of the strains BC1, Chic3 and JF9, and pathogenic capacity against *V. planifolia*, were evaluated following the protocols described in the aforementioned references (data not shown). All the strains are preserved in the Laboratory of Genetic and Plants-Microorganisms Interactions of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Veracruzana. The vanilla plants from which the fungi were obtained were collected

vainilla: nueve patógenas de *V. planifolia* y tres no patógenas (Cuadro 1). Con excepción de las cepas BC1, Chic3 y JF9, la identificación (morfológica y molecular) y capacidad patogénica de las cepas restantes se encuentra publicada en los trabajos de Adame-García *et al.* (2015), Casillas-Isiordia *et al.* (2017) y Flores-de la Rosa *et al.* (2018). La evaluación morfológica, genética y capacidad patogénica en *V. planifolia* de las cepas BC1, Chic3 y JF9 fueron determinadas siguiendo los protocolos descritos en las referencias antes mencionadas (datos no mostrados). Todas las cepas están resguardadas en el Laboratorio de Genética e Interacciones Planta Microorganismos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Las plantas de vainilla de donde se obtuvieron los hongos fueron colectadas de acahuales, selva o plantaciones de vainilla, sin manejo con fungicidas químicos.

**Preparación de suspensión de esporas.** Las cepas se activaron y posteriormente se subcultivaron en

**Table 1. Origin and susceptibility to benzimidazoles and chlorothalonil of strains of *F. oxysporum* (pathogenic and non-pathogenic) isolated from *V. planifolia*.**  
**Cuadro 1. Procedencia y susceptibilidad a bencimidazoles y clorotalonil, de cepas de *Fusarium oxysporum* (patógenas y no patógenas) aisladas de *Vanilla planifolia*.**

ID Cepa	Procedencia	Carácter	Fuente	Benomilo	Carbendazim	Tiofanato metílico	Clorotalonil
H5	Veracruz	Patógeno	1	S	S	R	R
H9	Veracruz	Patógeno	1	S	S	R	R
JF5	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
A3	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
V6M2	Veracruz	Patógeno	3	S	S	R	R
JF9	Veracruz	No Patógeno	4	S	S	S	S
N12	Nayarit	Patógeno	2	S	S	R	R
N3	Nayarit	Patógeno	2	S	S	R	R
BC1	Nayarit	No Patógeno	4	S	S	R	R
Chic 2	Oaxaca	Patógeno	3	S	S	R	R
Chic 6	Oaxaca	No Patógeno	3	S	S	R	S
Chic 3	Oaxaca	No Patógeno	4	S	S	R	S

S= susceptible; R= resistant. Source: 1) Adame-García *et al.* 2015; 2) Casillas-Isiordia *et al.* 2017; 3) Flores de la Rosa *et al.* 2018; 4) Present study. / S= susceptible; R= resistente. Fuente: 1) Adame-García *et al.* 2015; 2) Casillas-Isiordia *et al.* 2017; 3) Flores de la Rosa *et al.* 2018; 4) este estudio.

from secondary forests (acahuales), jungle or vanilla plantation areas untreated with chemical fungicides.

**Preparation of spore suspension.** The strains were activated and subsequently subcultured on PDA for 10 days at 25 °C in a microbiological incubator (Felisa). At the end of the incubation period, 5 mL of sterile distilled water with three drops of Tween 20 were added to the culture medium. A suspension sample of mycelium and conidia was then transferred to 15 mL conical tubes and centrifuged at 1000 rpm for 2 min. Conidia suspensions of  $1 \times 10^9$  CFU were prepared by diluting the supernatant with sterile distilled water. The spore count was performed using a Neubauer chamber and microscopic observation.

**Fungicide resistance tests.** The present study evaluated the susceptibility of twelve strains of *F. oxysporum* to four commercial fungicides: thiophanate methyl (Cercobin M<sup>®</sup>), benomyl (Promyl<sup>®</sup>), carbendazim (Prozycar<sup>®</sup>), and chlorothalonil (Talonil 75<sup>®</sup>). The tests were carried out in Petri dishes using the hole-plate method, for which fungal cultures were prepared with 100 µL of the  $1 \times 10^9$  CFU spore suspension and 25 mL of PDA. For this, the spore suspension was placed directly on the base of the Petri dish. Subsequently, ~ 25 mL of culture medium were poured on top at a temperature of ~ 40 °C. The conidia were spread into the agar plate with circular movements before the solidification of the culture medium. After solidification of the agar, a sterile hollow metal rod (a hollow punch) was used to cut out four cylindrical blocks of agar from equidistantly distributed points. Three concentrations of each type of fungicide were then introduced into the remaining holes: one according to the recommendations of the manufacturer (1% P:V), a higher one (2.5% P:V)

PDA durante 10 días a 25 °C en incubadora microbiológica (Mca. Felisa). Concluido el periodo de incubación se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril con tres gotas de Tween 20 sobre el medio de cultivo para transferir una muestra de suspensión de micelio y conidias a tubos cónicos de 15 mL, para centrifugación a 1000 rpm durante 2 min. A partir del sobrenadante se prepararon suspensiones de conidias de  $1 \times 10^9$  UFC por dilución con agua destilada esterilizada. Para el conteo de esporas se utilizó una cámara de Neubauer y observación microscópica.

**Pruebas de resistencia a fungicidas.** Se evaluó la susceptibilidad de las 12 cepas de *F. oxysporum* a cuatro fungicidas comerciales: tiofanato metílico (Cercobin M<sup>®</sup>), benomilo (Promyl<sup>®</sup>), carbendazim (Prozycar<sup>®</sup>) y clorotalonil (Talonil 75<sup>®</sup>). Las pruebas se llevaron a cabo en cajas de Petri mediante la técnica de placa-orificio, para ello, se prepararon cultivos fúngicos con 100 µL de la suspensión de esporas  $1 \times 10^9$  UFC y 25 mL de PDA. Para ello, la suspensión de esporas se colocó directamente en la base de la caja de Petri y posteriormente, se vaciaron encima ~ 25 mL de medio de cultivo a una temperatura de ~ 40 °C. Las conidias fueron distribuidas en el agar con movimientos circulares a favor y en contra de las manecillas del reloj antes de la solidificación del medio de cultivo. Después de la solidificación del agar, con una varilla metálica hueca estéril (sacabocado) se removieron cuatro cilindros de agar distribuidos equidistantemente en la superficie de cada placa, donde se probaron tres concentraciones: una de acuerdo a la recomendación de uso del producto (1% P:V), una más alta (2.5% P:V) y una más diluida (0.5%), por cada tipo de fungicida. Para ello, en cada orificio se colocaron 10 µL de la solución del fungicida a la concentración evaluada. Como testigo, en uno de los orificios se colocaron 10 µL de agua destilada estéril.



and a more diluted one (0.5%). Ten microliters of the fungicide solution at the evaluated concentration were placed in each hole. As a control, 10 µL of sterile distilled water were placed in one of the holes. This test was repeated five times for each fungicide and for each strain of *F. oxysporum* under study. The cultures were incubated for five days at 25-26 °C in a microbiological incubator (Felisa). The diameter of the inhibition zone associated with each treatment was measured with a digital vernier. Resistant strains were identified by the absence of an inhibition halo around the hole into which the fungicide was placed.

#### **Determination of the relationship between the pathogenic/non-pathogenic character of the *F. oxysporum* strain and its response to fungicides.**

The possible relationship between the pathogenic or non-pathogenic character of the *F. oxysporum* strains and their susceptibility or resistance to fungicides, was determined using a Generalized Linear Model (Binomial Dist., Logit Link Function) based on a binary data matrix (0 resistant, 1 susceptible). A hierarchical and complete linkage cluster analysis was performed using Euclidean distance. All analyzes were performed using the statistical analysis software R 2.12.2.

**DNA extraction.** DNA was extracted, using a protocol based on the use of CTAB proposed by Adame-García et al. (2016a), from ~ 50 mg of mycelium of each isolate of *Fusarium oxysporum* after 10 to 14 days of growth in PDA medium. DNA was quantified with a compact UV-Visible spectrophotometer (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One).

**Design of primers for the GPDH gene.** It was necessary to design primers to amplify the GPDH gene since no reports were found in the literature.

Esta prueba se repitió cinco veces por cada fungicida y por cada cepa de *F. oxysporum* en estudio. Los cultivos se incubaron durante cinco días a 25 - 26 °C en incubadora microbiológica (Mca. Felisa). El diámetro del halo de inhibición de cada tratamiento se midió con un vernier digital. Las cepas resistentes fueron aquellas en las que no se observó un halo de inhibición alrededor del orificio donde se depositó el fungicida.

#### **Determinación de la relación entre el carácter patogénico/no patogénico de la cepa de *F. oxysporum*, con la respuesta a los fungicidas.**

Para determinar la posible relación entre el carácter patogénico y no patogénico con la susceptibilidad o resistencia a los fungicidas, se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (Dist. Binomial, Función de liga Logit) con base en una matriz de datos binarios (0 resistente, 1 susceptible). Asimismo, se realizó un análisis de conglomerados jerárquico y de ligamiento completo, empleando la distancia euclidiana. Los análisis se desarrollaron en el software para análisis estadísticos R 2.12.2.

**Extracción de ADN.** Para la extracción de ADN se empleó un protocolo basado en el uso de CTAB propuesto por Adame-García et al. (2016a) a partir de ~ 50 mg de micelio de cada aislado de *Fusarium oxysporum* de 10 a 14 días de crecimiento en medio PDA. El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro UV-Visible compacto (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One).

**Diseño de iniciadores para el gen GPDH.** Para la amplificación del gen GPDH fue necesario diseñar iniciadores por no encontrar reportes en la literatura. El diseño de los iniciadores consistió en buscar en NCBI, la secuencia de aminoácidos de la proteína GPDH entre las reportadas para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, posteriormente, convertir

The primers were designed by searching the NCBI database for the amino acid sequence of the GPDH protein among those reported for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The amino acid sequence was then converted into the corresponding nucleotide sequence using tBLASTn. The resulting sequence was searched for among the reported genomes of *F. oxysporum*. The sequences found were aligned using the Mega (Kumar *et al.*, 2018), Primer3 Plus (Untergasser *et al.*, 2007) and Primer-BLAST software packages, which yielded a total of 15 possible primer pairs (data not shown). Each primer pair was tested by *in silico* PCR on the NCBI platform. One of the selected primer pairs was P4f (5'-AAAGTCCACGCACTCCTCTG-3') and P4r (5'-AGAATGGCGACGGAAACCTT-3'), which was generated with the Primer3 Plus software and resulted in a sequence that extended from base 506 to 1146 of the total size of the gene. The other primer pair selected was P13f (5'-CCTGCACAAGTCAACAAGCC-3') and P13r (5'-GCGCAACTGTTGTCAACCAT-3'), generated with the Primers BLAST software and resulting in a sequence that extended from base 766 to 1710.

**Amplification and sequencing of the  $\beta$ -tubulin and GPDH genes.** The amplification of the  $\beta$ -tubulin gene was carried out with the primer set Tub1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and Tub22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') (Nosratabadi *et al.*, 2018) under the following thermal conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, alignment for 45 s at 60 °C, extension for 80 s at 72 °C; and final extension at 72 °C for 7 min. The primer pairs P13f - P13r and P4f - P4r, designed in this study, were used for the amplification of the GPDH gene under the following thermal conditions: initial denaturation at 94 °C for 2 min; 35 cycles

de la secuencia en nucleótidos utilizando tBLASTn y posteriormente, se buscó la secuencia resultante en los genomas reportados de *F. oxysporum*. Las secuencias encontradas se alinearon en el software Mega (Kumar *et al.*, 2018) y mediante los softwares Primer3 Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y Primer-BLAST que arrojaron un total 15 parejas de posibles iniciadores (datos no mostrados). Cada par de iniciadores arrojados se probaron mediante la realización de PCR *in silico* en la plataforma del NCBI. Se eligieron los pares de iniciadores P4f (5'-AAAGTCCACGCACTCCTCTG-3') y P4r (5'-AGAATGGCGACGGAAACCTT-3') generados con el software Primer3 Plus, cuya secuencia resultante abarcó desde la base 506 hasta la 1146 del tamaño total del gen, y los iniciadores P13f (5'-CCTGCACAAGTCAACAAGCC-3') y P13r (5'-GCGCAACTGTTGTCAACCAT-3') generados con el software Primers BLAST, que abarcaron desde la base 766 hasta la 1710.

**Amplificación y secuenciación de los genes de  $\beta$ -tubulina y GPDH.** La amplificación del gen  $\beta$ -tubulina se realizó con el juego de iniciadores Tub1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') y Tub22 (5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3') (Nosratabadi *et al.*, 2018), con las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización por 30 s a 94 °C, alineamiento de 45 s a 60 °C, extensión a 80 s a 72 °C; y extensión final a 72 °C por 7 min. Para la amplificación del gen GPDH se utilizaron los pares de iniciadores P13f - P13r y P4f - P4r diseñados en este estudio, bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, alineamiento por 60 °C, extensión a 72 °C por 60 s; extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación fueron analizados

of denaturation at 94 °C for 2 min, alignment at 60 °C, extension at 72 °C for 60 s; final extension at 72 °C for 7 min. The amplification products were analyzed by horizontal agarose gel (1.8%) electrophoresis and ethidium bromide staining, which confirmed that the amplification products of the  $\beta$ -tubulin and GPDH genes corresponded to 950 bp and 450 bp, respectively. After electrophoresis, the amplification products were purified following the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit protocol and sent to the Institute of Biotechnology (UNAM) for sequencing.

**Bioinformatic analysis.** The sequences were edited using the MEGA X software and the consensus sequences of each gene were obtained from the sequences generated with the sense and antisense primers for each strain under study. Each resulting sequence was analyzed using the BLAST algorithm. In order to make the 3D designs of the  $\beta$ -tubulin protein molecule and identify the motifs, the sequences were aligned and compared using the BioEdit software. To search for conserved domains of the  $\beta$ -tubulin gene in strains susceptible and resistant to thiophanate methyl, the sequences were translated into proteins and aligned with the MEGA X software (Kumar *et al.*, 2018). The sequences of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* Fon12105 (accession KX369333) and Fon53 (accession KX369332), used in the study by Petkar *et al.* (2017), were used for this purpose. Mutations were manually identified in the alignment, and the sequences of three resistant strains of *F. oxysporum* and the susceptible strain Fon12105 were compared. The EzMol software was used for the identification of protein motifs, and the Phyre2 software was used for the 3D modeling of the molecules.

por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.8 % y tinción con bromuro de etidio, donde se corroboró que los productos de amplificación de los genes  $\beta$ -tubulina y GPDH correspondieran a 950 pb y 450 pb, respectivamente. Después de la electroforesis, los productos de amplificación se purificaron siguiendo el protocolo del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología (UNAM).

**Análisis bioinformático.** Se editaron las secuencias mediante el software MEGA X y se obtuvieron las secuencias consenso de cada gen a partir de las secuencias generadas con los iniciadores “sentido” y “antisentido”, para cada cepa en estudio. Cada secuencia resultante se analizó mediante el algoritmo BLAST. Con el fin de hacer los diseños en 3D de la molécula de la proteína  $\beta$ -tubulina e identificar los motivos, las secuencias se alinearon y compararon en el software BioEdit. Para la búsqueda de dominios conservados en el gen  $\beta$ -tubulina en cepas susceptibles y resistentes a tiofanato metílico, las secuencias se tradujeron a proteínas y se alinearon con el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), para tal propósito se incluyeron las secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* Fon12105 (acceso KX369333) y Fon53 (acceso KX369332) usadas en el estudio de Petkar *et al.* (2017). En el alineamiento se identificaron de forma manual las mutaciones y se compararon las secuencias de tres cepas de *F. oxysporum* resistentes *versus* la cepa susceptible Fon12105. Para la identificación de motivos proteicos se utilizó el software EzMol, en tanto que, para la modelación 3D de las moléculas se empleó el software Phyre2.

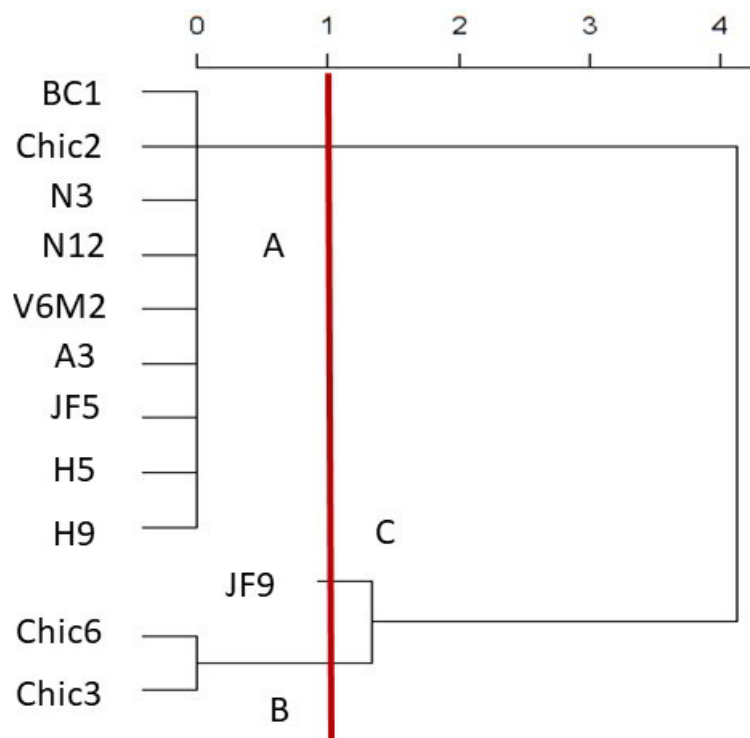


## RESULTS

**Fungicide resistance tests.** The cluster analysis identified three groups, according to the response of *F. oxysporum* strains from vanilla to the fungicides under study: A) strains susceptible to benomyl and carbendazim, but resistant to thiophanate methyl and chlorothalonil; B) strains susceptible to benomyl, carbendazim and chlorothalonil, and resistant to thiophanate methyl; C) strains susceptible to the four fungicides under study (Figure 1). Group A comprised nine strains from Veracruz, Nayarit and Oaxaca; group B comprised two strains from Oaxaca; group C comprised one strain from Veracruz (Table 1). No relationship

## RESULTADOS

**Ensayos de resistencia a fungicidas.** De acuerdo con la respuesta ante los fungicidas probados en cepas de *F. oxysporum* aisladas de vainilla, el análisis de conglomerados estableció tres grupos: A) cepas susceptibles a benomilo y carbendazim, pero resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil; B) cepas susceptibles a benomilo, carbendazim y clorotalonil, y resistentes a tiofanato metílico; y C) cepas susceptibles a los cuatro fungicidas (Figura 1). En el grupo A se encontraron nueve cepas provenientes de Veracruz, Nayarit y Oaxaca; en el grupo B, dos cepas de Oaxaca; y en el grupo C, una cepa de Veracruz (Cuadro 1). No se encontraron diferencias



**Figure 1.** Grouping of *F. oxysporum* strains according to their susceptibility to benzimidazoles and chlorothalonil. A) susceptibility to benomyl and carbendazim, resistance to thiophanate methyl and chlorothalonil; B) susceptibility to benomyl, carbendazim and chlorothalonil, resistance to thiophanate methyl; C) susceptibility to all fungicides.  
**Figura 1.** Agrupamiento de las cepas de *F. oxysporum* según su susceptibilidad a benzimidazoles y clorotalonil. A) susceptibilidad a benomilo y carbendazim, resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil; B) susceptibilidad a benomilo, carbendazim y clorotalonil, resistentes a tiofanato metílico; C) susceptible a todos los fungicidas.

was found between the pathogenic character or the provenance of the strains and their susceptibility to fungicides ( $P > 0.05$ ), according to the tests of the generalized linear model  $\text{susceptibilidad} \sim \text{patogenicidad} + \text{provenance}$ . It is important to note that no differences were observed in the response of the fungi due to the different concentrations of the fungicide used.

**Amplification of  $\beta$ -tubulin and GPDH genes.** In the 12 strains evaluated, the amplification produced a 950 bp fragment of the  $\beta$ -tubulin gene using the primers previously reported in the literature for this gene, and a 450 bp fragment of the GPDH gene using the P4F primers (Figure 3). No amplification product of the GPDH gene was obtained with the P13 primers.

**Bioinformatic analysis.** BLAST analysis confirmed that all the sequences obtained corresponded to the  $\beta$ -tubulin and GPDH genes, respectively (Table 2). The sequences of the pathogenic strains V6M2 and N3, and the non-pathogenic strains Chic6 and BC1, were used to find differences in the  $\beta$ -tubulin gene between the susceptible and resistant strains to the fungicides thiophanate methyl and chlorothalonil. The alignment analysis showed that the strain Fon12105 susceptible to thiophanate methyl (Petkar *et al.*, 2017) and the resistant strain Chic6 shared the thymine base at position 200, while adenine was found in the rest of the sequences (Figure 2). For the analysis of the GPDH gene, six sequences of strains resistant to chlorothalonil (N3, JF5, A3, V6M2, Chic2 and N12) and one susceptible strain (JF9) were considered. No mutations of the GPDH gene were found in these sequences, which suggests that the susceptibility or resistance response is not related to variations in the sequence of the analyzed region of this gene.

entre el carácter patogénico o la procedencia de las cepas en relación con la susceptibilidad a los fungicidas ( $P > 0.05$ ), según las pruebas del modelo lineal generalizado  $\text{susceptibilidad} \sim \text{patogenicidad} + \text{procedencia}$ . Es importante destacar que no se observó diferencia en la respuesta de los hongos por las diferentes concentraciones utilizadas del fungicida.

#### **Amplificación de los genes $\beta$ -tubulina y GPDH.**

En las 12 cepas evaluadas, la amplificación produjo un fragmento de 950 pb para el gen  $\beta$ -tubulina utilizando los iniciadores previamente reportados en la literatura para este gen y de 450 pb para el gen GPDH usando los iniciadores P4F (Figura 3). No se obtuvo amplificación con los iniciadores P13 para el gen GPDH.

**Análisis bioinformático.** El análisis BLAST confirmó que todas las secuencias obtenidas correspondieron a los genes  $\beta$ -tubulina y GPDH, respectivamente (Cuadro 2). Con el fin de encontrar diferencias en el gen  $\beta$ -tubulina entre las cepas susceptibles y resistentes a los fungicidas tiofanato metílico y clorotalonil se emplearon las secuencias de las cepas patógenas V6M2 y N3 y las cepas no patógenas Chic6 y BC1. El análisis de alineamiento evidenció que la cepa susceptible al tiofanato metílico Fon12105 (Petkar *et al.*, 2017) y la cepa resistente Chic6, compartieron la base timina en la posición 200, mientras que en el resto de las secuencias se encontró adenina (Figura 2). Para el análisis del gen GPDH se consideraron seis secuencias de cepas resistentes a clorotalonil (N3, JF5, A3, V6M2, Chic2 y N12) y una cepa susceptible (JF9), en éstas no se encontraron mutaciones del gen GPDH, lo que lleva a proponer que la respuesta de susceptibilidad o resistencia no está relacionada con variaciones en la secuencia de la región analizada de este gen.

**Table 2. Sequences of *Fusarium oxysporum* strains registered in the GenBank-NCBI database that had significant alignments by BLAST to the  $\beta$ -tubulin and GPDH gene sequences of *Fusarium oxysporum* strains isolated from *Vanilla planifolia*.**

**Cuadro 2. Secuencias de cepas de *Fusarium oxysporum* registradas en la base de datos del GenBank-NCBI, que produjeron alineamientos significativos mediante BLAST, a las secuencias de los genes  $\beta$ -tubulina y GPDH de cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de *Vanilla planifolia*.**

Secuencias de <i>F. oxysporum</i> en GenBank-NCBI	Porcentaje de similitud	ID cepa de <i>F. oxysporum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> strain ATCC 16612 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso KT323825.1)	98.72	BC1
<i>F. oxysporum</i> isolate TX85 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso MH827996.1)	97.85	V6M2
<i>F. oxysporum</i> isolate MS15 beta-tubulin (BTU) gene, complete cds (Clave de acceso MH827993.1)	96.91	N3
<i>F. solani</i> strain MICMW-30.1 beta-tubulin gene, partial cds (Clave de acceso KX912242.1)	94.34	Chic6
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase Mrna (Clave de acceso XM_018394006.1)	97.84	N3
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	95.60	JF5
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	95.32	JF9
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.29	A3
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.64	V6M2
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	100	Chic2
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287 glycerol-3-phosphate dehydrogenase mRNA (Clave de acceso XM_018394006.1)	99.82	N12

**Identification of motifs.** It was found that the sequences of the  $\beta$ -tubulin protein in the strains N3, BC1 and Fon53, which were resistant to thiophanate methyl, and the susceptible strain Fon 12105, share motifs 237537 and 335235. Strain N3 differs, as it has motifs 236152 and 279881, while the Fon 12105 strain was the only one to have the 237844 motif (Figure 3).

**3D structures of target proteins.** The three-dimensional structure of the  $\beta$ -tubulin protein showed differences between the susceptible strain and the strains resistant to thiophanate methyl. It

**Identificación de motivos.** Se encontró que las secuencias de la proteína  $\beta$ -tubulina de las cepas N3, BC1 y Fon53 resistentes a tiofanato metílico y la cepa susceptible Fon 12105, comparten los motivos 237537 y 335235. La cepa N3 se diferencia por presentar los motivos 236152 y 279881, en tanto que la cepa Fon 12105 fue la única en presentar el motivo 237844 (Figura 3).

**Estructuras 3D de las proteínas blanco.** La estructura tridimensional de la proteína  $\beta$ -tubulina mostró diferencias entre la cepa susceptible y las resistentes al tiofanato metílico, específicamente se

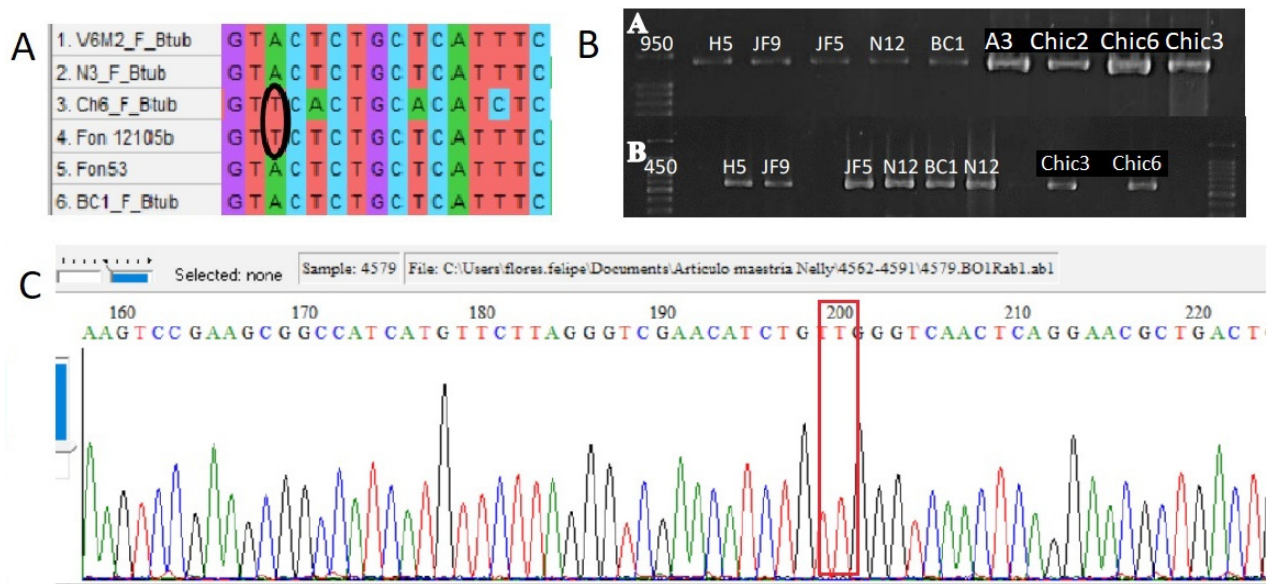


Figure 2. A) Fragment of the alignment of the  $\beta$ -tubulin gene sequences where it can be observed that the strains Ch6 (Chic6, present study) and Fon12105b (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*, Petkar *et al.*, 2017) share the thymine nucleotide at position 200 (framed in the rectangle). Chic6 is resistant to thiophanate methyl, while Fon12105b is susceptible. B) Amplification of PCR products in agarose gel of the  $\beta$ -tubulin gene (A) and GPDH gene (B) of some *Fusarium* strains under study. C) Electropherogram of the  $\beta$ -tubulin gene sequence of the Chic6 strain, resistant to thiophanate methyl, showing thymine at position 200.

Figura 2. A) Fragmento del alineamiento de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina donde se observa en la posición 200 (enmarcada en el rectángulo) que las cepas Ch6 (Chic6, este estudio) y Fon12105b (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*, Petkar *et al.*, 2017) comparten el nucleótido timina, siendo Chic6 resistente al tiofanato metílico, mientras que Fon12105b es susceptible. B) Amplificación de productos de PCR en gel de agarosa del gen  $\beta$ -tubulina (A) y gen GPDH (B) de algunas cepas de *Fusarium* en estudio. C) Electroferograma de la secuencia del gen  $\beta$ -tubulina de la cepa Chic6, resistente al tiofanato metílico, donde se muestra la timina en la posición 200.

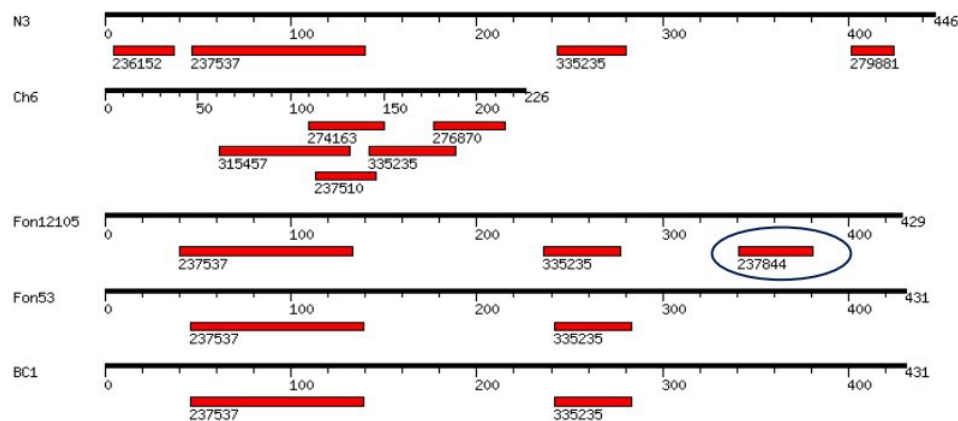


Figure 3. Search for conserved domains in the  $\beta$ -tubulin gene of strains of *F. oxysporum* that are susceptible and resistant to thiophanate methyl, isolated from *V. planifolia*. The 237844 motif in the susceptible strain Fon12105 (Petkar *et al.*, 2017) was found not to be present in the resistant strains Fon53 (Petkar *et al.*, 2017), N3 and BC1.

Figura 3. Búsqueda de dominios conservados en el gen  $\beta$ -tubulina en cepas de *F. oxysporum*, susceptibles y resistentes a tiofanato metílico, aisladas de *V. planifolia*. Se encontró que el motivo 237844 en la cepa Fon12105 susceptible (Petkar *et al.*, 2017) no está presente en las cepas resistentes Fon53 (Petkar *et al.*, 2017), N3 y BC1.

was found that the resistant strains V6M2, BC1 and Fon53 have the amino acid arrangement histidine-glycine-serine, while strain Fon12105 has, at the same position, cysteine-cysteine-proline (Figure 4a). The GPDH proteins of the JF5 (resistant to chlorothalonil) and JF9 (susceptible to chlorothalonil) strains showed a different structure than the proteins of the resistant strains A3, V6M2, Chic2 and N12 (Figure 4b).

encontró que las cepas resistentes V6M2, BC1 y Fon53 tienen el arreglo de aminoácidos histidina-glicina-serina, en tanto que, en la misma posición, la cepa Fon12105 tiene cisteína-cisteína-prolina (Figura 4a). Las proteínas GPDH de las cepas JF5 (resistente a clorotalonil) y JF9 (susceptible a clorotalonil) mostraron una estructura diferente a las proteínas de las cepas resistentes A3, V6M2, Chic2 y N12 (Figura 4b).

## DISCUSSION

The limited genetic variability of vanilla (*V. planifolia*) makes it highly vulnerable to various pathogens (Koyyappurath *et al.*, 2015). The fungus *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, causal agent of root and stem rot disease, poses an important phytosanitary

## DISCUSIÓN

La limitada variabilidad genética que tiene la vainilla (*V. planifolia*) la hace altamente vulnerable ante diversos patógenos (Koyyappurath *et al.*, 2015). El hongo *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, agente causal de la enfermedad de pudrición de raíz y

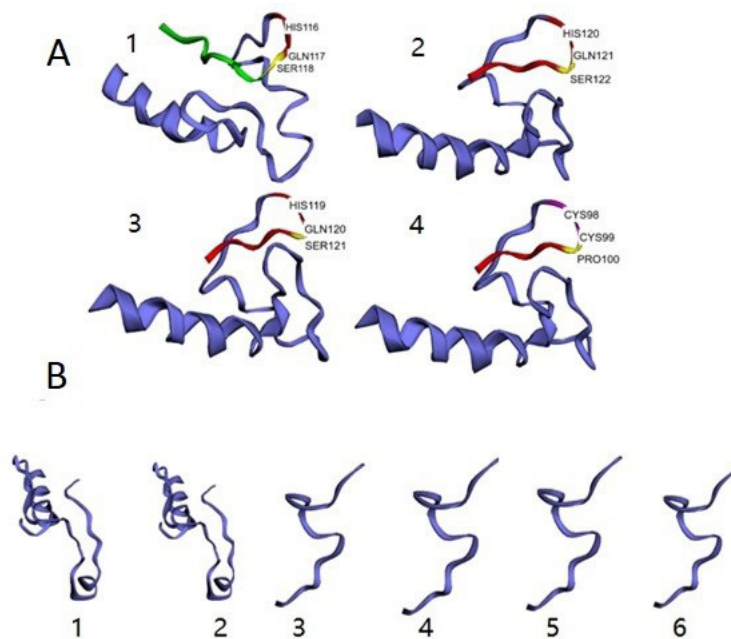


Figure 4. 3D models of the target proteins of: A) thiophanate methyl (1, strain V6M2; 2, strain Fon 53; 3, strain BC1; 4, strain Fon12105); B) chlorothalonil (1, strain JF5; 2, strain JF9; 3, strain A3; 4, strain V6M2; 5, strain Chic2; 6, strain N12). Structural differences are observed in both cases associated with resistance to fungicides.

Figura 4. Modelos 3D de las proteínas blanco de: A) tiofanato metílico (1, cepa V6M2; 2, cepa Fon 53; 3, cepa BC1; 4, cepa Fon12105); B) clorotalonil (1, cepa JF5; 2, cepa JF9; 3, cepa A3; 4, cepa V6M2; 5, cepa Chic2; 6, cepa N12). Se observan diferencias estructurales en ambos casos asociadas a la resistencia a los fungicidas.



problem for vanilla producers worldwide (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2016b; Casillas-Isiordia *et al.*, 2017).

Different types of control have been researched to combat this disease: genetic, cultural, biological and chemical. The latter is the most widely used by producers since it is cheap, effective and easily accessible. However, the excessive use of fungicides can lead to development of resistance to their active principles in fungi, as has happened with pathogens of other crops (Hobbelen *et al.*, 2011; Steinberg and Gurr, 2020). Some species of the genus *Fusarium*, such as *F. fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), *F. graminearum* (Duan *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), *F. asiaticum* (Suga *et al.*, 2011), among others, have been reported as resistant to some fungicides such as benomyl, thiophanate methyl and carbendazim. In the case of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, there are no previous reports of its resistance or susceptibility to fungicides.

In vanilla cultivation, the most used fungicides are from the benzimidazole group (Hernández-Hernández, 2019), such as benomyl, carbendazim and thiophanate methyl, which have systemic activity. Broad-spectrum multi-site contact fungicides such as chlorothalonil are widely recommended. When in contact with the fungus, benzimidazoles inhibit the assembly of microtubules through the degradation of  $\beta$ -tubulin, preventing the generation of the mitotic spindle, thus interrupting cell division (Chung *et al.*, 2009). Chlorothalonil inhibits the activity of the enzyme glycerol-3-phosphate-dehydrogenase (GPDH) that is part of the glycolysis pathway of the fungus (Long and Siegel, 1975).

Benzimidazoles are widely used in agricultural production, although the 2019 FRAC list describes resistance to benzimidazoles as a common feature among fungal species, including some special forms

tallos, representa un importante problema fitosanitario para los productores de vainilla a nivel mundial (Pinaria *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2016b; Casillas-Isiordia *et al.*, 2017).

Para combatir esta enfermedad se tienen avances en la investigación o la aplicación de varios tipos de control: genético, cultural, biológico y químico. Este último es el más utilizado por los productores, ya que su costo es bajo, efectivo y de fácil acceso; no obstante, el uso excesivo de los fungicidas puede provocar que los hongos generen resistencia a los principios activos de estos, como ha sucedido en patógenos de otros cultivos (Hobbelen *et al.*, 2011; Steinberg y Gurr, 2020). Algunas especies del género *Fusarium*, como *F. fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), *F. graminearum* (Duan *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018), *F. asiaticum* (Suga *et al.*, 2011), entre otras, han sido reportadas como resistentes a algunos fungicidas como el benomilo, el tiofanato metílico y el carbendazim. En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* no existen reportes previos acerca de su resistencia o susceptibilidad a fungicidas.

En el cultivo de la vainilla, los fungicidas más utilizados son de la familia de los bencimidazoles (Hernández-Hernández, 2019), como el benomilo, carbendazim y el tiofanato metílico, que tienen actividad sistémica; así mismo, fungicidas de contacto multisitio de amplio espectro, como el clorotalonil, son ampliamente recomendados. Los bencimidazoles en contacto con el hongo inhiben el ensamblaje de los microtúbulos mediante la degradación de la  $\beta$ -tubulina, impidiendo la generación del huso mitótico, interrumpiéndose así la división celular (Chung *et al.*, 2009). En tanto que, el clorotalonil inhibe la función de la enzima glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPDH) que forma parte de la ruta de la glucólisis del hongo (Long y Siegel, 1975).

El uso de los bencimidazoles está ampliamente extendido en la producción agrícola, aunque, en

of *F. oxysporum*, including *lilii*, *gladioli* (Chung *et al.*, 2009), *lycopersici* (Amini and Sidovich, 2010) and *niveum* (Petkar *et al.*, 2017). In the present study, all strains of *F. oxysporum* (pathogenic and non-pathogenic to vanilla) were susceptible to benomyl and carbendazim, while nine strains were resistant to thiophanate methyl regardless of their pathogenic character.

Petkar *et al.* (2017) proposed that the substitution of thymine (T) for adenine (A) in position 200 of the  $\beta$ -tubulin gene encodes two different amino acids, phenylalanine (TTC) and tyrosine (TAC), which are probably what determines the quality of susceptibility or resistance to thiophanate methyl, respectively. The comparison of the sequences of the pathogenic and non-pathogenic *F. oxysporum* strains of vanilla that are resistant to thiophanate methyl against the sequence of the susceptible (Fon12105) and resistant (Fon53) strains of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* used in the study by Petkar *et al.* (2017) showed that the strains Fon12105 (susceptible strain) and Chic6 (resistant strain of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*) have a thymine (T) at position 200, while the rest of the resistant strains have an adenine (A) at the same position. The hypothesis that resistance to this fungicide is explained by a substitution in this specific position of the coding sequence of this gene is ruled out. It has previously been proposed that in *Fusarium fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), as well as in other *formae speciales* of *F. oxysporum* (Chung *et al.*, 2009; Amini and Sidovich, 2010), phenylalanine is found at position 200 of the gene, independently of the resistance or susceptibility to thiophanate methyl. Other studies attribute the resistance to benzimidazoles of *Sclerotinia homoeocarpa* to the mutation from phenylalanine to tyrosine (Dowling *et al.*, 2017), and indicate that the reverse mutation tyrosine-phenylalanine is responsible for resistance in *Colletotrichum musae* (dos Santos-Vieira *et al.*, 2017).

la lista 2019 del FRAC se describe la resistencia a los bencimidazoles como una característica común entre las especies fúngicas, entre ellas algunas formas especiales de *F. oxysporum*, por ejemplo, *lilii*, *gladioli* (Chung *et al.*, 2009), *lycopersici* (Amini y Sidovich, 2010) y *niveum* (Petkar *et al.*, 2017). En este estudio, todas las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de vainilla, presentaron susceptibilidad a benomilo y a carbendazim, en tanto que, nueve cepas fueron resistentes a tiofanato metílico, sin distinción de su carácter patogénico.

Petkar *et al.* (2017) plantearon que el cambio de timina (T) por adenina (A) en la posición 200 del gen  $\beta$ -tubulina codifica dos aminoácidos distintos, fenilalanina (TTC) y tirosina (TAC), lo que daría la cualidad de susceptibilidad o resistencia al tiofanato metílico, respectivamente. Partiendo del hecho de que la comparación de las secuencias de las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de vainilla, resistentes al tiofanato metílico, contra la secuencia de la cepa susceptible (Fon12105) y la resistente (Fon53) de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* empleadas en el estudio de Petkar *et al.* (2017) mostró que las cepas Fon12105 (cepa susceptible) y Chic6 (cepa resistente de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*) tienen en la posición 200 una timina (T), y que el resto de las cepas resistentes poseen una adenina (A), se descarta la hipótesis de que la resistencia a este fungicida está explicada por un cambio en esta posición específica de la secuencia codificante de este gen. Con anterioridad se ha propuesto que en *Fusarium fujikuroi* (Chen *et al.*, 2014), así como en otras *formae speciales* de *F. oxysporum* (Chung *et al.*, 2009; Amini y Sidovich, 2010), se encuentra la fenilalanina en la posición 200 del gen, independiente a la resistencia o susceptibilidad hacia el tiofanato metílico. Otros estudios confieren la resistencia a los bencimidazoles en *Sclerotinia homoeocarpa* a la mutación de fenilalanina a tirosina (Dowling *et al.*, 2017), así como, que la mutación inversa (tirosina-fenilalanina) es la responsable de

Due to the controversy regarding the mutation in codon 200 as the one responsible for the resistance or susceptibility of the fungus to the fungicide, the present study searched for conserved motifs in the gene sequences. It was found that the motif 237844 (Pfam) was only present in the susceptible strain, which suggests that in strains that are resistance to thiophanate methyl, the site of binding and action of the fungicide does not include the codon residue, as proposed by Vela-Corcía *et al.* (2018) in a study of the coupling between the action site of benzimidazoles and the protein  $\beta$ -tubulin. No further biological information was found for motif 237844 (Pfam).

Benzimidazoles interfere with certain sites associated with the polymerization of  $\alpha$ 1-tubulin,  $\alpha$ 2-tubulin and  $\beta$ 2-tubulin monomers. However, once microtubule polymerization is complete, it is can no longer be reversed (Zhou *et al.*, 2016). Polymerization inhibition depends on the active ingredient; thus, benomyl and carbendazim act on the  $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 and  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2 subunits, while thiabendazole shows a lower capacity to inhibit  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2 (Zhou *et al.*, 2016), which could be related to a greater probability of resistance. Regarding thiophanate methyl, there are no data on how it affects these polymerization processes, and it may behave in a similar way to thiabendazole. Further studies are needed on the mode of action of thiophanate methyl to determine if this is the resistance mechanism of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Chlorothalonil inhibits the fungal enzymatic activity of dehydrogenases, catalases, and acid phosphatases (Baćmaga *et al.*, 2018); it specifically inhibits the activity of the GPDH enzyme (Long and Siegel, 1975). The high levels of resistance to chlorothalonil found in pathogenic and non-pathogenic strains of *F. oxysporum* associated with the root of *V. planifolia* contradict the annotations of FRAC (2019), which considers chlorothalonil as

la resistencia en *Colletotrichum musae* (dos Santos-Vieira *et al.*, 2017).

Debido a la contraposición encontrada, respecto a la mutación en el codón 200 como la responsable de la resistencia o susceptibilidad del hongo al fungicida, el estudio se condujo hacia la búsqueda de motivos conservados en las secuencias del gen, encontrándose que el motivo 237844 (Pfam) únicamente se presentó en la cepa susceptible, lo que sugiere que en la resistencia al tiofanato metílico, el sitio de unión y acción del fungicida podría no incluir al residuo del codón, como lo propuso Vela-Corsía *et al.* (2018) al estudiar el acoplamiento entre el sitio de acción de los bencimidazoles con la proteína  $\beta$ -tubulina. No se encontró mayor información biológica para el motivo 237844 (Pfam).

Los bencimidazoles interfieren en ciertos sitios de la polimerización de los monómeros de  $\alpha$ 1-tubulina,  $\alpha$ 2-tubulina y  $\beta$ 2-tubulina, sin embargo, una vez realizada la polimerización de los microtubulos, ésta ya no se revierte (Zhou *et al.*, 2016). La inhibición de la polimerización depende del principio activo, así, el benomilo y carbendazim actúa en las subunidades  $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 y  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2, mientras que en el caso del tiabendazol se ha observado una menor capacidad de inhibir  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2 (Zhou *et al.*, 2016), lo que estaría relacionado con una mayor probabilidad de resistencia. Para el tiofanato metílico no se tienen datos sobre cómo afecta estos procesos de polimerización, siendo posible que se comporte de manera similar al tiabendazol. Son necesarios más estudios acerca del modo de acción del tiofanato metílico para determinar si es éste el mecanismo de resistencia en *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

El clorotalonil inhibe la actividad enzimática fúngica de deshidrogenasas, catalasas y fosfatasa ácidas (Baćmaga *et al.*, 2018); de manera específica, inhibe la actividad de la enzima GPDH (Long y Siegel, 1975). Los altos niveles de resistencia al clorotalonil encontrados en cepas patógenas y no

part of a group of fungicides with a low level of risk in the generation of resistance due to its multisite action. However, this fungicide has shown high effectiveness against other *formae speciales* of *F. oxysporum* such as *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (Dahal and Shrestha, 2018).

Although the strains of *F. oxysporum* associated with vanilla did not present variations in the GPDH gene that explain the difference in the response to chlorothalonil, some characteristics of the conserved motifs of the enzyme could be associated with susceptibility. To determine the resistance mechanism, it is necessary to study other target enzyme systems for this and other fungicides, since *Fusarium* strains associated with vanilla have shown a high variation in enzymatic activity (Adame-García *et al.*, 2011) as well as high genetic variability (Flores-de la Rosa *et al.*, 2018), which explains the variability in their response to the fungicides under study. Regarding other multisite fungicides, such as mancozeb, a substantial reduction in susceptibility has been recorded in many pathogen species. This has been associated with genes involved in the formation of transcriptional machinery, regulation of cellular pH, and transporters of multiple drugs (Yang *et al.* 2019).

## CONCLUSIONS

Pathogenic and non-pathogenic *F. oxysporum* strains of *V. planifolia* were highly susceptible to the fungicides benomyl and carbendazim, and highly resistant to thiophanate methyl and chlorothalonil. The point mutation from adenine to thymine in codon 200 of the  $\beta$ -tubulin gene, encoding phenylalanine/tyrosine, respectively, is not responsible for resistance to thiophanate methyl, as has been proposed by other authors.

patógenas de *F. oxysporum* asociadas a la raíz de *V. planifolia* contradice a las anotaciones del FRAC (2019), que considera al clorotalonil como parte de un grupo con bajo nivel de riesgo en la generación de resistencia por su naturaleza multisitio de acción. No obstante, este fungicida ha mostrado alta efectividad contra otras *formae speciales* de *F. oxysporum* como *F. oxysporum* f. sp. *lentis* (Dahal y Shrestha, 2018).

Si bien, las cepas de *F. oxysporum* asociado a vainilla no presentaron variaciones en el gen GPDH que expliquen la diferencia en la respuesta al clorotalonil, hay indicios dentro de los motivos conservados de la enzima que podrían estar asociados a la susceptibilidad. Para determinar el mecanismo de resistencia es necesario enfocar investigaciones que involucren de manera integral otros sistemas enzimáticos blanco reportados para este y otros fungicidas, toda vez que las cepas de *Fusarium* asociadas a vainilla han revelado alta variación en la actividad enzimática (Adame-García *et al.*, 2011) y alta variabilidad genética (Flores-de la Rosa *et al.*, 2018), que explica su respuesta variable ante los fungicidas probados. Para otros fungicidas multisitio, como el mancozeb, se ha documentado una reducción sustancial de la sensibilidad en muchas especies de patógenos, la cual ha sido asociada con los genes que involucran la formación de la maquinaria transcripcional, la regulación del pH celular y los transportadores de múltiples fármacos (Yang *et al.* 2019).

## CONCLUSIONES

Las cepas de *F. oxysporum*, patógenas y no patógenas de *V. planifolia*, fueron altamente susceptibles a los fungicidas benomilo y carbendazim, y altamente resistentes a tiofanato metílico y clorotalonil. La mutación puntual de adenina a timina en

The presence of conserved motifs may be related to the susceptibility of the fungus to this fungicide. No evidence was found that the variability in the analyzed sequence of the GPDH gene is related to the response of susceptibility or resistance to chlorothalonil.

#### ACKNOWLEDGMENTS

N. A. González-Oviedo wishes to thank CONACYT for the scholarship for master studies number 629405.

#### CITED LITERATURE

- Adame-García J, Trigos-Landa A, Iglesias-Andreu LG, Flores-Estevez N and Luna-Rodríguez M. 2011. Isozymic and pathogenic variations of *Fusarium* spp. associated with vanilla stem and root rotting. Tropical and Subtropical Agroecosystems 13:299-306. <https://www.revista.criba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1330/663>
- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu LG, Ramos-Prado JM and Luna-Rodríguez M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. Botanical Sciences 93:669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Adame-García J, Flores-de la Rosa FR, Ricaño-Rodríguez J and Luna-Rodríguez M. 2016a. Adequacy of a protocol for amplification of EF-1 $\alpha$  gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science 11:236-241. [http://www.arpnjournals.org/jabs/research\\_papers/rp\\_2016/jabs\\_0616\\_804.pdf](http://www.arpnjournals.org/jabs/research_papers/rp_2016/jabs_0616_804.pdf)
- Adame-García J, Luna-Rodríguez M and Iglesias-Andreu LG. 2016b. Vanilla rhizobacteria as antagonists against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. International Journal of Agriculture and Biology 18:23-30. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0053>
- Amini J and Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research 50:172-178. <http://www.plantprotection.pl/pdf-91523-25801?filename=The%20effects%20of%20fungicides.pdf>
- Arie T. 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular genetic studies. Journal of Pesticide Sciences 44(4): 275 - 281. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>
- Baćmaga M, Wyszowska J and Kucharski J. 2018. The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes. Ecotoxicology 27. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1968-7>
- Casillas-Isiordia R, Flores-de la Rosa FR, Can-Chulim Á, Luna Esquivel G, Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Guerrero LG, Luna-Rodríguez M and Aguirre Beltrán G. 2017.

el codón 200 del gen  $\beta$ -tubulina, que codifican fenilalanina/tirosina, respectivamente, no es la responsable de la resistencia al tiofanato metílico, como ha sido propuesto por otros autores, no obstante, se encontraron indicios de que la presencia de motivos conservados pueda estar relacionada con la susceptibilidad del hongo a este fungicida. No se encontró evidencia de que la variabilidad en la secuencia analizada del gen GPDH esté relacionada con la respuesta de susceptibilidad o resistencia al clorotalonil.

#### AGRADECIMIENTOS

N. A. González-Oviedo agradece al CONACYT por la beca número 629405 para estudios de maestría.

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

- Fusarium* sp. associated with *Vanilla* sp. rot in Nayarit, Mexico. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 12:43-50. [http://www.arpnjournals.org/jabs/research\\_papers/rp\\_2017/jabs\\_0217\\_844.pdf](http://www.arpnjournals.org/jabs/research_papers/rp_2017/jabs_0217_844.pdf)
- Chen Z, Gao T, Liang S, Liu K, Zhou M and Chen C. 2014. Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. FEMS Microbiology Letters 357:77-84. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12504>
- Chung WH, Chung WC, Ting PF, Ru CC, Huang HC and Huang JW. 2009. Nature of resistance to methyl benzimidazole carbamate fungicides in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* in Taiwan. Journal of Phytopathology 157:742-747. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01545.x>
- Dahal N and Shrestha R. 2018. Evaluation of efficacy of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis in vitro* at Lamjung, Nepal. Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science 35:105-112. <https://doi.org/10.3126/jiaas.v35i1.22520>
- dos Santos Vieira WA, Guerreiro Lima W, Souza Nascimento E, Michereff S, Doyle VA and Saraiva Camara M. 2017. Thiophanate-methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. Plant Disease 101:1659-1665. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1594-RE>
- Dowling ME, Hu MJ and Schnabel G. 2017. Fungicide resistance in *Botrytis fragariae* and species prevalence in the Mid-Atlantic United States. Plant Disease 102:964-969. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1615-RE>



- Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J and Zhou M. 2014. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports* 4:7094 <https://doi.org/10.1038/srep07094>
- Flores-de la Rosa FR, De Luna E, Adame-García J, Iglesias-Andreu LG and Luna-Rodríguez M. 2018. Phylogenetic position and nucleotide diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* worldwide based on translation elongation factor 1a sequences. *Plant Pathology* 67:1278–1285. <https://doi.org/10.1111/ppa.12847>
- Hernández-Hernández J. 2019. Mexican vanilla production. Pp: 3–38. In: Havkin-Frenkel D and Belanger FC (eds.). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Second edition. Hoboken, Wiley Blackwell, New Jersey, USA. 500p <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Vanilla+Science+and+Technology%2C+2nd+Edition-p-9781119377276>
- Hobbelen P, Paveley N and Bosch F. 2011. Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: a modeling analysis. *Phytopathology* 101:1224–1233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-10-0290>
- Koyyappurath S, Conejero G, Dijoux JB, Lapeyre-Montes F, Jade K, Chiroleu F, Gatineau F, Verdeil JL, Besse P and Grisoni M. 2015. Differential responses of vanilla accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. *Frontiers in Plant Science* 6: 1125. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lecomte C, Edel-Hermann V, Cannesan MA, Gautheron N, Langlois A, Alabouvette C, Robert F and Steinberg C. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity. *European Journal of Plant Pathology* 145(2): 421–431. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0856-3>
- Long JW and Siegel MR. 1975. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems. *Chemico-biological Interactions* 10(6): 383–394. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(75\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(75)90069-1)
- Lubinsky P, Bory S, Hernández-Hernández J, Kim SC and Gómez-Pompa A. 2008. Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany* 62(2): 127–138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Nosratabadi M, Kachuei R, Rezaie S and Harchegani AB. 2018. Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *Le Infezioni in Medicina*, 26(1): 52–60. [https://www.infezmed.it/media/journal/Vol\\_26\\_1\\_2018\\_7.pdf](https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_26_1_2018_7.pdf)
- Petkar A, Langston DB, Buck JW, Stevenson KL and Ji P. 2017. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. *Plant Disease* 101:366–371. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1236-RE>
- Pinaria A, Liew ECY and Burgess L. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology* 39:176–183. <https://doi.org/10.1071/AP09079>
- Steinberg G and Gurr SJ. 2020. Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genetics and Biology* 144: 103476. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>
- Suga H, Nakajima T, Kageyama K and Hyakumachi M. 2011. The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. *Fungal Biology* 115:1244–1250. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.009>
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R and Leunissen JA. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acid Research* 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A and Pérez-García A. 2018. Analysis of  $\beta$ -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Scientific Reports* 8:7161. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>
- Yang LN, He MH, Ouyang HB, Zhu W, Pan ZC, Sui QJ, Shang LP and Zhan J. 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology* 19:205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Zhang X, Chen X, Jiang J, Yu M, Yin Y and Ma Z. 2015. The tubulin cofactor A is involved in hyphal growth, conidiation and cold sensitivity in *Fusarium asiaticum*. *BMC Microbiology* 15:35. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0374-z>
- Zhou Y, Xu J, Zhu Y, Duan Y and Zhou M. 2016. Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. *Phytopathology* 106(8):807–813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0186-R>
- Zhu Y, Liang X, Li Y, Duan Y, Zheng Z, Wang J and Zhou M. 2018. F240 of  $\beta$  2- Tubulin explains why *Fusarium graminearum* is less sensitive to carbendazim than *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 108:352–361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0295-R>