

***In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides**

Sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* aislado de caña de azúcar a cinco fungicidas

Fabiola Medina-Osti*, **Adriana Gutiérrez-Díez**, ¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa s/n Colonia Ex Hacienda El Canadá, Gral. Escobedo, Nuevo León CP 66059, México; **Salvador Ochoa-Ascencio**, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Paseo General Lázaro Cárdenas 2290, Colonia Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, CP 60170, México; ¹**Sugey Ramona Sinagawa-García**.

*Corresponding author: fameos9@gmail.com

Received: June 02, 2022.

Accepted: July 22, 2022.

Medina-Osti F, Gutiérrez-Díez A, Ochoa-Ascencio S and Sinagawa-García SR. 2022. *In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 447-457.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-1>

First DOI publication: August 26, 2022.

Primera publicación DOI: 26 de Agosto, 2022.

Abstract. The present study had the objective of evaluating the *in vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* to five fungicides of different chemical groups. An isolate of *F. sacchari* obtained from sugarcane plants (*Saccharum officinarum*) with wilt symptoms and identified morphologically and molecularly by the characteristics of the genus *Fusarium* and amplification of the ITS and TEF regions, respectively, was used to evaluate the fungicides azoxystrobin, difenoconazole,

Resumen. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos. Un aislado de *F. sacchari* obtenido de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con síntomas de marchitez e identificado morfológica y molecularmente por las características del género *Fusarium* y amplificación de las regiones ITS y TEF, respectivamente, se utilizó para evaluar los fungicidas azoxystrobin, difenoconazol, hymexazol, cyprodinil y tiabendazol, a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, empleando la técnica de la placa envenenada. El efecto de los fungicidas y las EC_{50} se determinaron por el porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. sacchari* respecto a su crecimiento en las placas sin fungicida. Los fungicidas difenoconazol a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y tiabendazol a 100, 1000 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron estadísticamente iguales y presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (93.5% y 92.1, 91.4 y 89.8%, respectivamente). Los valores EC_{50}

hymexazole, cyprodinil and thiabendazole, at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, using the poison plate technique. The effect of the fungicides and EC_{50} was determined by the percentage inhibition of *F. sacchari* growth with respect to the growth on the plates without fungicide. The fungicides difenoconazole at 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and thiabendazole at 100, 1000 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were statistically equal and presented the highest mycelial growth inhibition percentages (93.5 and 92.1, 91.4 and 89.8 %, respectively). The lowest EC_{50} values were presented by difenoconazole (9.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), thiabendazole (9.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and cyprodinil (10.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In conclusion, *F. sacchari* presented higher *in vitro* sensitivity to the fungicides difenoconazole (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and thiabendazole (100, 1000 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Keywords: Pokkah boeng, sugarcane, inhibition, EC_{50} .

Sugar cane (*Saccharum officinarum*) is one of the most important industrial crops in Mexico with a national annual production of 5.7 million tons of sugar. Sugarcane fields are distributed in seven strategic regions. The state of San Luis Potosí belongs to the Northwest region, which produces 1156265 tons each year (CONADESUCA, 2021). In 2021, in the municipality of Tamasopo, which belongs to the Huasteca Potosina, 653028 tons of sugar were produced (SIAP, 2022).

Sugarcane wilt or pokkah boeng (PB) is a serious disease that affects the stem of sugarcane plants. The initial symptoms appear in young leaves, which develop chlorotic areas at the base (Vishwakarma *et al.*, 2013). If the infection is limited to the leaves, the plant recovers slowly. In advanced and severe stages, the disease penetrates the stem through a growth point causing upper rot,

más bajos los presentaron difenoconazol (9.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), tiabendazol (9.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y cyprodinil (10.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). En conclusión, *F. sacchari* presentó mayor sensibilidad *in vitro* a los fungicidas difenoconazol (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y tiabendazol (100, 1000 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Palabras clave: Pokkah boeng, caña de azúcar, inhibición, EC_{50} .

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los principales cultivos industriales en México con una producción nacional de 5.7 millones de toneladas de azúcar. Los campos cañeros se encuentran distribuidos en siete regiones estratégicas; San Luis Potosí pertenece a la región Noroeste que cuenta con una producción de 1,156,265 t (CONADESUCA, 2021). En 2021, en el municipio de Tamasopo perteneciente a la Huasteca Potosina, se produjeron 653,028 t (SIAP, 2022).

La marchitez de la caña de azúcar o pokkah boeng (PB) es una enfermedad grave que afecta el tallo, los síntomas iniciales se observan en hojas jóvenes que desarrollan zonas cloróticas en la base (Vishwakarma *et al.*, 2013). Si la infección queda limitada a las hojas la planta se recupera lentamente, en etapa avanzada y grave la enfermedad penetra el tallo a través de un punto de crecimiento causando pudrición superior, las hojas jóvenes mueren y se desarrollan en el tejido áreas necróticas asimétricas rojizas (Jeyakumar y Zhang, 2020). Esta enfermedad produce pérdidas de 45.2 a 51.2% en la producción del cultivo y de 42.8 a 59.2% en el contenido de jugo de los tallos (Kumar *et al.*, 2015). La calidad del jugo se reduce (Viswanathan, 2020).

Varias especies del género *Fusarium* como *F. sacchari*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Lin *et al.*, 2014; Zhang y Jeyakumar, 2018) han sido identificadas como el agente causal de la enfermedad de

the young leaves die, and reddish asymmetrical necrotic areas appear in the tissue (Jeyakumar and Zhang, 2020). This disease causes losses of 45.2 to 51.2% in crop production and 42.8 to 59.2% in the juice content of the stems (Kumar *et al.*, 2015). The quality of the juice is reduced (Viswanathan, 2020).

Several species of the genus *Fusarium* such as *F. sacchari*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Lin *et al.*, 2014; Zhang and Jeyakumar, 2018) have been identified as causal agents of PB disease (Viswanathan, 2020). They can grow on a wide variety of substrates and have an efficient dissemination mechanism that allows them to spread globally. *Fusarium sacchari* is the main causative agent of PB in India (Viswanathan *et al.*, 2017). According to pathogenicity studies, once it enters the host it causes severe damage to the plant, but its entry mechanism has not been studied in detail (Viswanathan, 2020).

The roots of sugarcane plants become infected in the early stages of crop growth. However, the way in which *F. sacchari* spreads from the roots to the stem is still unknown. Environmental and soil factors probably play a vital role in the development and severity of the disease (Viswanathan, 2020). Species of the genus *Fusarium* inactivate toxic defense substances produced by the host and produce their own toxins, such as enniatins and fusaric acid, which increase their virulence (Agrios, 2005). The present work evaluated the *in vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugarcane with PB symptoms to five fungicides from different chemical groups. The mean effective concentration (EC_{50}) of each fungicide was determined.

Using zigzag sampling, 1 m tall sugarcane plants in maturation stage with wilting symptoms were collected between February and April 2019 in nine sugarcane fields (four plants per field) located in Tamasopo (22° 09' 41.0" N 99° 19' 30.4" S) in the Huasteca Potosina region. The 36

PB (Viswanathan, 2020). Estas pueden crecer en una gran variedad de sustratos y tienen un eficiente mecanismo de diseminación que les permite distribuirse globalmente. *Fusarium sacchari* es el principal agente causante de PB en la India (Viswanathan *et al.*, 2017), de acuerdo con estudios de patogenicidad una vez que ingresa al hospedante causa daños severos al cultivo, su mecanismo de entrada al mismo no se ha estudiado en detalle (Viswanathan, 2020).

Las raíces de las plantas de caña de azúcar se infectan en las primeras etapas de crecimiento del cultivo; sin embargo, se desconoce la forma de avance de *F. sacchari* desde las raíces hasta el tallo, probablemente los factores ambientales y de suelo juegan un papel vital en el desarrollo de la enfermedad en los tallos y la severidad con que se presenta (Viswanathan, 2020). Las especies del género *Fusarium* inactivan sustancias tóxicas de defensa producidas por el hospedante, producen toxinas propias que aumentan su virulencia como eniatinas y ácido fusárico (Agrios, 2005). En este trabajo se evaluó la sensibilidad *in vitro* de *Fusarium sacchari* aislado de caña de azúcar con síntomas de PB, a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos y se determinó la concentración media efectiva (EC_{50}) para cada uno de los fungicidas.

En febrero y abril de 2019 con base en un muestreo en zigzag se colectaron plantas de caña de azúcar de 1 m de altura en etapa de maduración con síntomas de marchitez en nueve campos cañeros (cuatro plantas por campo) de Tamasopo (22° 09' 41.0" N 99° 19' 30.4" S) en la Huasteca Potosina. Las 36 muestras obtenidas fueron trasladadas en bolsas de papel al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su análisis. Fragmentos de tejido con síntomas de necrosis fueron desinfectados con NaClO al 2% por tres minutos, enjuagados tres veces con agua destilada estéril y secados

samples obtained were transported in paper bags to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Nuevo León for analysis. Tissue fragments with necrosis symptoms were disinfected with NaClO (2%) for three minutes, rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile absorbent paper. The tissue was placed in Petri dishes with potato dextrose agar culture medium (PDA-Difco®), which were then incubated at 25±1 °C in the dark for seven days. Two representative isolates (HP1 and HP2) were selected, transferred to PDA culture medium and incubated at 25±1 °C in the dark until spores were formed. Conidia suspensions at a concentration of 1x10³ were prepared with sterile distilled water and streaked on Petri dishes with PDA culture medium. Isolates from the germinated conidia were purified using the monosporic culture technique.

The monosporic isolates of HP1 and HP2 were morphologically characterized by the color and pigmentation of the colonies. The conidia, phialides and hyphae of *Fusarium* in temporary mounts of lactophenol were characterized using a compound microscope at 40 and 100X (Leslie and Summerell, 2006).

The pathogenicity of the isolates was determined by inoculating a suspension of conidia (1×10⁶ mL⁻¹) in stems of sugarcane plants (varieties My 55-14 and Mex 79-431) at harvest stage. The phytopathogen was re-isolated on PDA culture medium from the necrotic tissue of the inoculated stems. For the molecular identification of both isolates, DNA was extracted following the protocol of Cenis (1992), and the ITS (internal transcribed spacer) (White *et al.*, 1990) and TEF (translation elongation factor) regions (O'Donnell *et al.*, 1998; Carbone and Kohn, 1999) were amplified and sequenced for comparison with GenBank sequences and subsequent deposit therein.

en papel absorbente estéril. El tejido fue sembrado en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA-Difco®) que fueron incubadas a 25 ± 1 °C en oscuridad por siete días. Dos aislados representativos (HP1 y HP2) fueron seleccionados y transferidos a medio de cultivo PDA e incubados a 25 ± 1 °C en oscuridad hasta la formación de esporas. Suspensiones de conidios a concentración de 1 x 10³ fueron preparadas con agua destilada estéril para su siembra por estriado en cajas Petri con medio de cultivo PDA, y a partir de los conidios germinados los aislados se purificaron con la técnica de cultivo monospórico.

La caracterización morfológica de los aislados monospóricos de HP1 y HP2 se realizó por el color y pigmentación de las colonias, así como las características de los conidios, fiálides e hifas en montajes temporales en lactofenol observados a 40 y 100X en microscopio compuesto, de acuerdo con las características del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

La patogenicidad de los aislados se determinó mediante la inoculación de una suspensión de conidios 1×10⁶ mL⁻¹ en tallos de plantas de caña de azúcar de las variedades My 55-14 y Mex 79-431 en etapa de cosecha, del tejido necrosado de los tallos inoculados se re-aisló el fitopatógeno en medio de cultivo PDA. Para la identificación molecular de ambos aislados se extrajo ADN de acuerdo con el protocolo de Cenis (1992) y se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS (internal transcriber spacer) (White *et al.*, 1990) y TEF (translation elongation factor) (O'Donnell *et al.*, 1998; Carbone y Kohn, 1999) para su comparación con secuencias del GenBank y posterior depósito en el mismo.

El aislado monospórico de HP1 se utilizó para determinar la sensibilidad de *F. sacchari* a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos. Concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg mL⁻¹ de i.a. fueron evaluadas empleando la técnica de placa

The monosporic isolate of HP1 was used to determine the sensitivity of *F. sacchari* to five fungicides from different chemical groups. Concentrations of 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of a.i. were evaluated using the poisoned plate technique (Dahal and Shrestha, 2018) under a completely randomized experimental design with five replications. Five Petri dishes with PDA culture medium without fungicide (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were used as control. The fungicides evaluated, and the chemical groups to which they belong, were: azoxystrobin (strobilurin, Bankit[®], Syngenta), difenoconazole (thiazoles, Score[®], Syngenta), hymexazol (isoxazoles, Tachigaren[®], Summit Agro), cyprodinil (anilino-pyrimidines, Switch[®], Syngenta), and thiabendazole (benzimidazoles, Tecto 60[®]).

Mycelium discs (7 mm in diameter) of the isolate HP1 were placed in Petri dishes with modified culture media and control medium for incubation in the dark for seven days at 25 ± 1 °C. During this time, the control treatment filled the dish. Mycelial growth was measured in two perpendicular directions from the center of the colony using a 0.01 mm precision digital caliper (Truper[®]). The percentage of inhibition of radial growth was determined (Dahal and Shrestha, 2018) and a two-way analysis of variance was performed on the results using a linear model, with the linearized values of percentage of inhibition as the dependent variable. The comparison of means was performed by the Tukey test ($\alpha=0.05$). The EC_{50} for each fungicide was determined by linear regression of the logarithm of fungicide concentration and the Probit value of growth inhibition (Finney, 1952). All analyzes were performed using the statistical program R version 4.0.1 (R Core Team, 2020).

The morphological characteristics of the colonies, conidia and conidiophores of the MHP1 and MHP2 isolates corresponded to *F. sacchari*,

envenenada (Dahal y Shrestha, 2018) bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Como testigo se utilizaron cinco cajas Petri con medio de cultivo PDA sin fungicida (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los fungicidas evaluados y grupo químico al que pertenecen fueron: azoxystrobin (estrobilurina, Bankit[®], Syngenta), difenoconazol (tiazoles, Score[®], Syngenta), hymexazol (isoxazoles, Tachigaren[®], Summit Agro), cyprodinil (anilino-pirimidinas, Switch[®], Syngenta) y tiabendazol (benzimidazoles, Tecto 60[®]).

Discos de micelio de 7 mm de diámetro del aislado HP1 se sembraron en las cajas Petri con los medios de cultivo modificados y el testigo para su incubación en oscuridad por siete días a 25 ± 1 °C, en este tiempo el tratamiento testigo llenó la placa. El crecimiento micelial fue medido en dos direcciones perpendiculares a partir del centro de la colonia empleando un calibrador digital de precisión 0.01 mm (Truper[®]). Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (Dahal y Shrestha, 2018) y se realizó el análisis de varianza de dos vías de los resultados utilizando el modelo lineal aplicando como variable dependiente los valores linealizados del porcentaje de inhibición, la comparación de medias se realizó por el método Tukey ($\alpha=0.05$). Para cada fungicida se determinó la EC_{50} por regresión lineal del logaritmo de la concentración de fungicida y el valor Probit de inhibición de crecimiento (Finney, 1952). Los análisis se realizaron con el programa estadístico R versión 4.0.1 (R Core Team, 2020).

Las características morfológicas de las colonias, conidios y conidióforos de los aislados MHP1 y MHP2 correspondieron a *F. sacchari* de acuerdo con Leslie y Summerell (2006); la colonia presentó micelio abundante, elevado, blanco pálido, que tornó a violeta a los 14 días de la siembra. Se observaron macroconidios alargados con célula apical curvada y célula basal poco desarrollada con

according to Leslie and Summerell (2006). The colonies presented abundant, aerial, pale white mycelium, which turned purple 14 days after sowing. Elongated macroconidia with curved apical cell and poorly developed basal cell with three septa were observed, as well as abundant microconidia in false heads on monophialides or polyphialides, ovoid and single cell. The sequences obtained in GenBank ON924470 and ON924471 (ITS) showed a similarity of 100% with the sequence of *F. sacchari* with access number MT882327.1, while the sequence ON932086 of (TEF) showed a similarity of 99% with the sequence of *F. sacchari* with access number MT010988.1.

The response of *F. sacchari* to the fungicides and concentrations evaluated showed significant differences (Figure 1). The analysis of variance showed highly significant differences ($p \leq 0.01$) between fungicides and concentrations. The multiple comparison of means of the percentage of growth inhibition formed 12 groups (Table 1). The highest percentage of inhibition was obtained with difenoconazole 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (93.5%) and thiabendazole 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (92.1%), 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (91.4%) and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (89.8%). The rest of the treatments showed percentages of inhibition that ranged from 75.8 to 0%. Various *in vitro* control studies of *Fusarium* species reported that these fungicides had significant growth inhibition effects. Alburqueque and Gusqui (2018) obtained 100% inhibition in *F. oxysporum* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and treated with azoxystrobin, carbendazim, copper phosphite and thiabendazole. Dahal and Shrestha (2018) also reported 100% inhibition in *F. oxysporum* treated with carbendazim at 150 and 200 ppm. Madhavi and Bhattiprolu (2011) obtained 92 and 91% inhibition in *F. solani* isolated from chili (*Capsicum annuum*) with the fungicides carbendazim and benomyl, respectively.

tres septos, así como microconidios abundantes en falsas cabezas en monofialides o polifialides, ovoides de una célula. Las secuencias obtenidas en GenBank ON924470 y ON924471 (ITS) presentaron una similitud del 100% con el número de acceso MT882327.1 de *F. sacchari* mientras que la secuencia ON932086 (TEF) mostró similitud del 99% con el número de acceso MT010988.1 de *F. sacchari*.

F. sacchari exhibió diferencias significativas a todos los fungicidas y concentraciones evaluados (Figura 1). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre los fungicidas y concentraciones. La comparación múltiple de medias del porcentaje de inhibición de crecimiento formó 12 grupos (Cuadro 1). El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con difenoconazol 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (93.5%) y tiabendazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (92.1%), 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (91.4%) y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (89.8%). El resto de los tratamientos presentaron porcentajes de inhibición de 75.8 a 0%. Diversos estudios de control *in vitro* de especies de *Fusarium* reportan efectos significativos de inhibición de crecimiento con estos fungicidas. Alburqueque y Gusqui (2018) obtuvieron un 100% de inhibición en *F. oxysporum* aislado de jitomate (*Solanum lycopersicum*) tratado con azoxystrobin, carbendazim, fosfito de cobre y tiabendazol, de manera similar Dahal y Shrestha (2018) reportan un 100% de inhibición en *F. oxysporum* tratado con carbendazim a 150 y 200 ppm; mientras que Madhavi y Bhattiprolu (2011) obtuvieron con los fungicidas carbendazim y benomil un 92 y 91% de inhibición en *F. solani* aislado de chile (*Capsicum annuum*), respectivamente.

De acuerdo con los resultados de la presente investigación, se observó que los fungicidas con código G1 (difenoconazol) cuyo modo de acción es de inhibición en la biosíntesis de esteroides con punto de acción en la inhibición de la desmetilación

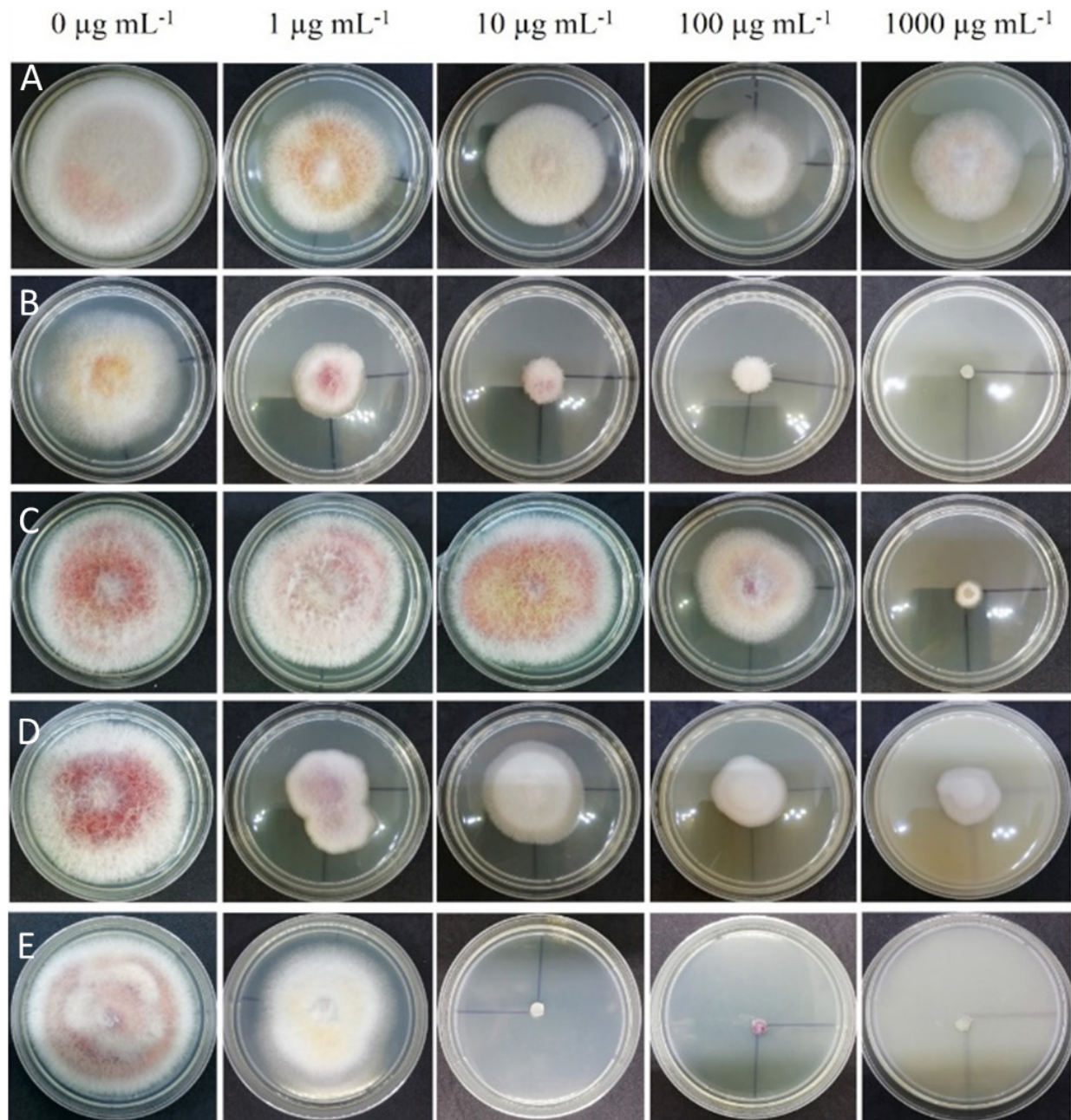


Figure 1. Growth of *Fusarium sacchari* after seven days of exposure to concentrations of 0, 1, 10, 100 and 1000 µg mL⁻¹ of azoxystrobin A), difenoconazole B), hymexazol C), cyprodinil D), and thiabendazole E).

Figura 1. Crecimiento de *Fusarium sacchari* a los siete días de exposición a concentraciones de 0, 1, 10, 100 y 1000 µg mL⁻¹ de azoxystrobin A), difenoconazol B), hymexazol C), cyprodinil D) y tiabendazol E).

Table 1. Mean comparison by Tukey (0.05) of the percentage of inhibition of mycelial growth of *F. sacchari* by the effect of five fungicides at four concentrations.
Cuadro 1. Comparación de medias Tukey (0.05) del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *F. sacchari* por efecto de cinco fungicidas a cuatro concentraciones.

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Difenoconazol 1000 µg mL ⁻¹	93.5 A ^z	Cyprodinil 1 µg mL ⁻¹	47.3 E
Tiabendazol 100 µg mL ⁻¹	92.1 A	Azoxystrobin 100 µg mL ⁻¹	31.1 F
Tiabendazol 1000 µg mL ⁻¹	91.4 A	Hymexazol 100 µg mL ⁻¹	28.3 FG
Tiabendazol 10 µg mL ⁻¹	89.8 A	Cyprodinil 10 µg mL ⁻¹	27.4 FG
Hymexazol 1000 µg mL ⁻¹	75.8 B	Azoxystrobin 1000 µg mL ⁻¹	26.0 FG
Difenoconazol 100 µg mL ⁻¹	75.1 B	Azoxystrobin 10 µg mL ⁻¹	18.7 GH
Difenoconazol 10 µg mL ⁻¹	74.7 B	Azoxystrobin 1 µg mL ⁻¹	13.7 H
Cyprodinil 1000 µg mL ⁻¹	61.8 C	Tiabendazol 1 µg mL ⁻¹	8.0 HI
Cyprodinil 100 µg mL ⁻¹	60.1 CD	Hymexazol 1 µg mL ⁻¹	0.3 I
Difenoconazol 1 µg mL ⁻¹	49.3 DE	Hymexazol 10 µg mL ⁻¹	0.0 I

^zPercentages with the same letter are statistically equal, p≤0.01. / ^zPorcentajes con la misma letra son estadísticamente iguales, p≤0.01.

The results of the present study showed that the fungicides with code G1 (difenoconazole), whose mode of action is inhibition of the biosynthesis of sterols, with point of action in the inhibition of demethylation (FRAC, 2020), and the fungicides with code B1 (thiabendazole), whose mode of action is the inhibition of motor and cytoskeleton proteins, with point of action in the assembly of β-tubulins in mitosis (FRAC, 2020), were the ones that showed the highest inhibition percentage of mycelial growth of *F. sacchari*.

Regarding the EC₅₀, the lowest values corresponded to difenoconazole with 1.5 µg mL⁻¹ (standard error 2.1) and thiabendazole with 7.2 µg mL⁻¹ (standard error 1.3). Cyprodinil had a value of 36.7 µg mL⁻¹ (standard error 2.2) and hymexazol a value of 371.0 µg mL⁻¹ (standard error 1.3), but the highest value corresponded to azoxystrobin, with 18420 µg mL⁻¹ (standard error 5.2). *F. sacchari* showed growth with all the concentrations of azoxystrobin. Similar results were obtained by Gutierrez *et al.* (2006), who reported that there were no significant differences in inhibition percentage and that isolates of *Fusarium* spp. obtained from

(FRAC, 2020), y código B1 (tiabendazol) cuyo modo de acción es de inhibición de proteínas motoras y del citoesqueleto con punto de acción en el ensamblaje de las β-tubulinas en la mitosis (FRAC, 2020), fueron los que inhibieron en mayor porcentaje el crecimiento micelial de *F. sacchari*.

Respecto a la EC₅₀ los valores bajos correspondieron a difenoconazol con 1.5 µg mL⁻¹ (error estándar 2.1) y tiabendazol con 7.2 µg mL⁻¹ (error estándar 1.3). Cyprodinil presentó un valor de 36.7 µg mL⁻¹ (error estándar 2.2) e hymexazol un valor de 371.0 µg mL⁻¹ (error estándar 1.3), mientras que el valor más alto fue para azoxystrobin 18420 µg mL⁻¹ (error estándar 5.2). *F. sacchari* presentó crecimiento en todas las concentraciones evaluadas con azoxystrobin; resultados similares han sido obtenidos por Gutierrez *et al.* (2006) en donde no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición, así como baja sensibilidad de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de frutos de jitomate hacia dosis de azoxystrobin (3.3, 9.9 y 27.7 µL L⁻¹ de Quadris, Syngenta).

El tipo de cultivo y enfermedad ocasionada por el fitopatógeno contra el cual se aplica un fungicida

tomato fruits showed low sensitivity to different doses of azoxystrobin (3.3, 9.9 and 27.7 $\mu\text{L L}^{-1}$ from Quadris, Syngenta).

The type of crop and disease caused by a phytopathogen against which a fungicide is applied influences the ability of the latter to inhibit growth. Avonazi *et al.* (2014) obtained an average EC_{50} of 0.2 mg L^{-1} in an assay with *F. graminearum* isolated from wheat (*Triticum aestivum*) exposed to azoxystrobin. This was the most effective fungicide in inhibiting spore germination. In the present study, hymexazol, whose mode of action (A3) plays a role in the metabolism of nucleic acids, affecting DNA/RNA synthesis, and cyprodinil, whose mode of action (D1) affects amino acid and protein synthesis by inhibiting methionine biosynthesis. (FRAC, 2020), showed low percentages of inhibition of the mycelial growth of *F. sacchari* at all the concentrations evaluated, with efficacy values of less than 76%.

Thiabendazole showed an inhibition range of 7.9 to 91.4% and an EC_{50} of 7.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results demonstrate the antifungal effect of thiabendazole derived from its direct effect on mitosis, preventing the development of the mycelium (Melgarejo and Abella, 2011). Thiabendazole inhibited the mycelial growth of *F. sacchari* at a concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This result coincides with that of Kawchuk *et al.* (1994), who performed an *in vitro* study of isolates of *Fusarium* spp. obtained from potato tubers with dry rot symptoms and reported that mycelial growth was inhibited with an EC_{50} of 10 mg L^{-1} . Gachango *et al.* (2012) obtained an EC_{50} of 3.7 mg L^{-1} with isolates of *Fusarium* spp. also obtained from potato tubers with dry rot. Difenoconazole had an inhibition range of 49.3 to 93.5% with an EC_{50} of 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These results coincide with those reported by Gachango *et al.* (2012), who reported 50% mycelial inhibition with an EC_{50} of 1.8 mg L^{-1} . Anderson *et al.* (2020) conducted a

tiene efecto sobre su capacidad para realizar la inhibición en el crecimiento. Avonazi *et al.* (2014) obtuvieron un EC_{50} promedio de 0.2 mg L^{-1} en su ensayo con *F. graminearum* aislado de trigo (*Triticum aestivum*) expuesto a azoxystrobin, siendo este el fungicida con mayor eficacia en la inhibición de la germinación de esporas. En esta investigación el hymexazol cuyo modo de acción (A3) tiene implicación en el metabolismo de ácidos nucleicos afectando la síntesis de ADN/ARN y el cyprodinil cuyo modo de acción (D1) afecta la síntesis de aminoácidos y proteínas al inhibir la biosíntesis de metionina (FRAC, 2020), presentaron bajos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *F. sacchari* en todas las concentraciones evaluadas, teniendo valores de eficacia menores a 76%.

El tiabendazol presentó un rango de inhibición de 7.9 a 91.4% y una EC_{50} de 7.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estos resultados demuestran el efecto antifúngico del tiabendazol derivado de su efecto directo sobre la mitosis, lo que impide el desarrollo del micelio (Melgarejo y Abella, 2011). Tiabendazol inhibió el crecimiento micelial de *F. sacchari* a partir de la concentración 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, este resultado coincide con lo reportado por Kawchuk *et al.* (1994) en donde en su estudio *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de pudrición seca, el crecimiento micelial fue inhibido con una EC_{50} de 10 mg L^{-1} ; por su parte Gachango *et al.* (2012) obtuvieron una EC_{50} de 3.7 mg L^{-1} con aislados de *Fusarium* spp. obtenidos también de tubérculos de papa con pudrición seca. Con difenoconazol se obtuvo un rango de inhibición de 49.3 a 93.5% con una EC_{50} de 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estos resultados coinciden con los reportados por Gachango *et al.* (2012) quienes obtuvieron una inhibición micelial del 50% con una EC_{50} de 1.8 mg L^{-1} . Anderson *et al.* (2020) en el estudio de sensibilidad de *F. graminearum* aislado de trigo (*Triticum aestivum*) a fungicidas del grupo de triazoles,

sensitivity study of *F. graminearum* isolated from wheat (*Triticum aestivum*) to fungicides of the triazole group. They obtained an EC_{50} lower than $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for both tebuconazole and ketoconazole, which confirmed that the fungicides of the chemical group Triazole are effective in decreasing mycelial growth in *Fusarium* species.

The results obtained in the present study coincide with those of previous works where it was shown that fungicides from various chemical groups such as carbendazim (benzimidazoles, B1), thiophanate methyl (thiophanates, B1), copper oxychloride (inorganic, M01) and mancozeb (dithio carbamates, M03) can be used to control the PB disease (Vishwakarma *et al.*, 2013; Jeyakumar and Zhang, 2020; TNAU, 2020). The first two fungicides have a mode of action similar to thiabendazole with respect to the inhibition of motor and cytoskeleton proteins. The other two fungicides have multisite activity (FRAC, 2020).

F. sacchari has been reported as the causal agent of PB disease in different parts of the world (Lin *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Bao *et al.* 2020; Paul *et al.* 2022). In the present study, it was isolated from sugarcane plants found in sugarcane fields of the Huasteca Potosina region. Although the PB disease has not had an economic impact in this region yet, it is a phytosanitary threat. Therefore, it is recommended that future assays include pathogen isolates from different production fields.

obtuvieron una EC_{50} inferior a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto para tebuconazol como metoconazol, lo cual confirma que los fungicidas del grupo químico de triazoles son eficaces en la disminución del crecimiento del micelio en especies de *Fusarium*.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con trabajos previos en donde se demuestra que fungicidas de diversos grupos químicos como carbendazim (benzimidazoles, B1), metil tiofanato (tiofanatos, B1), oxiclóruo de cobre (inorgánicos, M01) y mancozeb (ditio carbamatos, M03) ejercen control para combatir la enfermedad de PB (Vishwakarma *et al.*, 2013; Jeyakumar y Zhang, 2020; TNAU, 2020), teniendo los dos primeros fungicidas modo de acción similar a tiabendazol en la inhibición de proteínas motoras y del citoesqueleto y los dos restantes productos químicos con actividad multisitio (FRAC, 2020).

F. sacchari ha sido reportada como agente causal de la enfermedad PB en diferentes partes de mundo (Lin *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Bao *et al.* 2020; Paul *et al.* 2022), en esta investigación se aisló de plantas de caña de azúcar de campos cañeros de la Huasteca Potosina; a pesar de que la enfermedad de PB todavía no presenta impactos económicos en esta región, resulta ser una amenaza fitosanitaria, es por ello recomendable para futuros ensayos incluir aislados del patógeno de diferentes campos de producción.

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

## CITED LITERATURE

- Agrios GN. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. México. 952p.
- Albuquerque AD y Guisqui MR. 2018. Eficiencia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa* 25:489-498. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Anderson NR, Freije AN, Bergstrom GC, Bradley CA, Cowger C, Faske T, Hollier C, Kleczewski N, Padgett GB, Paul P, Price T and Wise KA. 2020. Sensitivity of *Fusarium graminearum* to metconazole and tebuconazole fungicides

- before and after widespread use in wheat in the United States. *Plant Health Progress* 21:85-90. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-11-19-0083-RS>
- Avonazi A, Tonin RB, Reis EM, Camera J and Ranzi C. 2014. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides. *Summa Phytopathologica* 40:231-247. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1891>
- Bao Y, Xu Y, Wang S, Yao Z and Rao GP. 2020. First report of *Fusarium sacchari* that causes sugarcane wilt disease in China. *Plant Disease* 104:2289-2289. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0229-PDN>

- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20: 2380.
- CONADESUCA. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. 2021. 8to Informe Estadístico del Sector Agroindustrial de la Caña de Azúcar en México zafras 2011-2012/2020-2021. [http://conadesuca.gob.mx/documentosexternos/8vo\\_Informe\\_estadistico.pdf](http://conadesuca.gob.mx/documentosexternos/8vo_Informe_estadistico.pdf) (consulta, julio 2022).
- Dahal N and Shrestha RK. 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* 25:105-112. <http://dx.doi.org/10.3126/jiaas.v35i1.22520>
- Finney DJ. 1952. *Probit Analysis*. Second Edition. Cambridge University Press. New York, USA. 318p.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2020. [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2020v2.pdf?sfvrsn=a48499a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2020v2.pdf?sfvrsn=a48499a_2) (consulta, agosto 2021).
- Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao JJ and Kirk WW. 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. *Plant Disease* 96:1767-1774. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0932-RE>
- Gutierrez CLJ, Wang Y, Lutton E and McSpadden GBB. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. *Plant Disease* 90:397-403. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0397>
- Jeyakumar MJM and Zhang M. 2020. Symptoms and their assessment of sugarcane pokkah boeng. *International Journal of Environmental and Agriculture Research* 6(12):50-54.
- Kawchuk LM, Holley JD, Lynch DR and Clear RM. 1994. Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyl in Canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal* 71:185-192.
- Kumar S, Chand G, Mandal D, Kumar A and Kumar S. 2015. Deterioration in sugarcane due to wilt disease. *Ecology, Environment and Conservation Journal* 21:AS145-AS148.
- Leslie JF and Summerell, BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. First Edition. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- Lin Z, Xu S, Que Y, Wang J, Comstock JC, Wei J, McCord PH, Chen B, Chen R and Zhang M. 2014. Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. *PLoS One* 9:e104195.
- Madhavi GB and Bhattiprolu SL. 2011. Evaluation of fungicides, soil amendment practices and bioagents against *Fusarium solani*-causal agent of wilt disease in chilli. *Journal of Horticultural Sciences* 6:141-144. <https://jhs.iahr.res.in/index.php/jhs/article/view/423>
- Melgarejo GJ y Abella PF. 2011. Fungicidas: mecanismos de acción de los fungicidas. *Revista Ventana al Campo Andino*. (15):193-202. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19031>
- O'Donnell K, Kistler H, Cigelnik E and Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Paul SK, Mahmud NU, Gupta DR, Alam MN, Chakraborty M and Islam MT. 2022. First report of *Fusarium sacchari* causing sugarcane wilt in Bangladesch. *Plant Disease* 106:319-319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0681-PDN>
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/SIAP>. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. Anuario estadístico de la producción agrícola 2021. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, julio 2022).
- TNAU. Tamil Nadu Agricultural University. 2020. Agritech Portal. Sugarcane. [https://agritech.tnau.ac.in/crop\\_protection/sugarcane\\_diseases/sugarcane\\_d4.html](https://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/sugarcane_diseases/sugarcane_d4.html) (consulta, agosto 2020).
- Vishwakarma SK, Kumar P, Nigam A, Singh A and Kumar A. 2013. Pokkah boeng: an emerging disease of sugarcane. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4:1-5. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000170>
- Viswanathan R, Balaji CG, Selvakumar R, Malathi P, Ramesh Sundar SA, Naveen Prasanth C, Chabra ML and Parameswari B. 2017. Epidemiology of *Fusarium* diseases in sugarcane: a new discovery of same *Fusarium sacchari* causing two distinct diseases, wilt and pokkah boeng. *Sugar Tech* 19:638-646. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12355-017-0552-4>
- Viswanathan R. 2020. *Fusarium* diseases affecting sugarcane production in India. *Indian Phytopathology* 73:415-424. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00241-y>
- White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW. 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. New York, USA. 482p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang M and Jeyakumar MJM. 2018. *Fusarium* species complex causing pokkah boeng in China. *Fusarium: plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers* 139-154. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73133>.