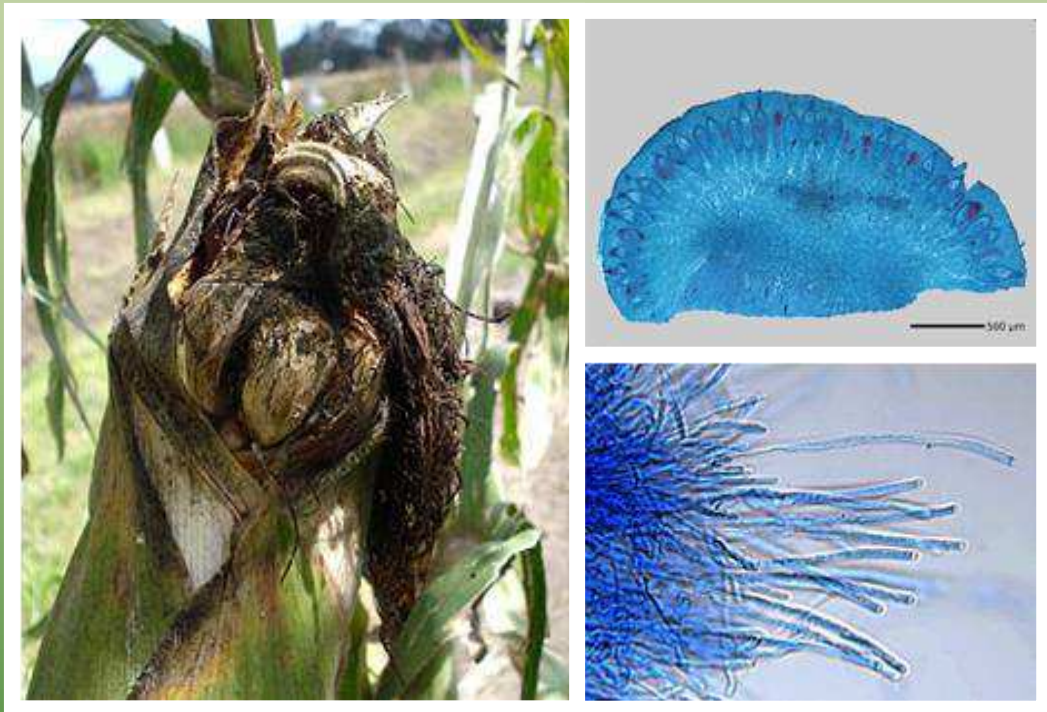


# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

**VOLUMEN 34, NUMERO 3, Septiembre 2016**



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

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

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados.

**Editor Técnico \* Technical Editor**

Lic. Ma. Yunuén López Muratalla, RMF.

**Composición Web \* Web Composition**

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, Colegio de Postgraduados

**Editoras(es) Adjuntos \* Senior Editors**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dr. Ángel Rebollar Alviter, Universidad Autónoma Chapingo.

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

Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana, Auburn University, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Br.

Dr. Miguel Dita Rodríguez, Embrapa, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

**Editoras(es) Asociados \* Associate Editors**

Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, CIATEJ

Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, Colegio de Postgraduados

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, Colegio de Postgraduados

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Yuridia Mercado Flores,

Dr. Jesús Sánchez Pale, UAEM

Dr. Rodrigo Valverde Kábana, Auburn University, USA

---

**Portada:** Mazorca de maíz infectadas con *Claviceps gigantea* y estructuras sexuales resultado germinación de esclerocios.

**Original:** Carlos De León García de Alba

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS \* SCIENTIFIC ARTICLES

- Bacillus* spp. in the Control of Wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*** \* *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense* 203  
Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristobal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC, Pacheco-Aguilar JR.
- Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez** \* Germinación de esclerocios y formación de ascoporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez 223  
Moreno-Manzano CE, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Sánchez-Pale R.
- Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico** \* Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas y viveros de ornamentales en Culiacán, México 242  
Álvarez-Rodríguez B, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R. and Santos-Cervantes ME.
- Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum*** \* Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum* 258  
Robledo-Leal E, Elizondo-Zertuche M, Treviño-Rangel RJ, Hernández-Luna C, Huerta-González N.
- Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle** \* Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica 270  
Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martinez DL, Hernández-Ruiz J.

ARTICULOS DE REVISION \* REVIEW ARTICLES

- Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants** \* Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas 286  
García-Ruiz H, García-Ruiz MT, Gabriel-Peralta SM, Miravel-Gabriel CB, El-Mounadi K.

NOTAS FITOPATOLOGICAS \* PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Detection of Iris yellow spot virus in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico** \* Detección de Iris yellow spot virus en cebolla cultivada en Tepalcingo, Morelos, México 308  
Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez FJ, Bartolo-Reyes JC, Varela-Loza V, Hernández-Romano J, Ochoa-Martínez DL.
- Histopathology of the infection process of *Colletotrichum truncatum* in papaya and pea leaves** \* Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo 316  
Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Felix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R.

# ***Bacillus* spp. in the Control of Wilt Caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense***

## ***Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense***

Miguel Ángel Mejía-Bautista, Arturo Reyes-Ramírez\*, Jairo Cristóbal-Alejo, José María Tun-Suárez, Lizette del Carmen Borges-Gómez, Instituto Tecnológico de Conkal, km 16.3, Avenida Tecnológico s/n, CP. 97345 Conkal, Yucatán. México. Teléfono: (999) 9124135; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las campanas s/n, Colonia las Campanas, 76010. Querétaro, Querétaro. Teléfono: 01 (442) 192-1200 Extensión: 5531; Fax: 01 (442) 192-1304. \*Autor para correspondencia (areyes.itconkal@gmail.com)

Recibido: 17 de Marzo, 2016

Aceptado: 15 de Junio, 2016

Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC y Pacheco-Aguilar JR. 2016. *Bacillus* spp. in the Control of Wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología 34:208-222.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1603-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1)

Primera publicación DOI: 20 de Junio, 2016

Firts DOI publication: June 20, 2015.

**Resumen.** El género *Fusarium* es un patógeno asociado al marchitamiento del chile y con reducción del rendimiento del cultivo. Las rizobacterias son una alternativa para mejorar la producción agrícola y protección contra fitopatógenos. En el presente estudio se evaluó el antagonismo *in vitro* de diez cepas de *Bacillus* contra *Fusarium equiseti* ITCF1 y *F. solani* ITCF2, todas las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento micelial entre 21.28 y 71.70 %, adicionalmente las cepas CBMT2 y CBMT51 presentaron halos de inhibición contra

**Abstract.** The genus *Fusarium* is a pathogen associated with chili wilt and reduced crop yield. Rhizobacterias are an alternative to improve agricultural production and protection against plant pathogens. In this work the *in vitro* antagonism of ten *Bacillus* strains against *Fusarium solani* ITCF1 and *F. equiseti* ITCF2 were evaluated. Our results showed that all the bacterial strains inhibited mycelial growth between 21.28 and 71.70 %, additionally the CBMT2 and CBMT51 strains showed inhibition halos against *F. equiseti* with halos of 3.76 and 6.37 mm. The two pathogens showed 100 % incidence of disease in seedlings habanero chili and severity of 90.0 % by *F. solani* and 77.5 % by *F. equiseti*. In resistance tests wilt four strains of *Bacillus* based on the antagonistic activity were used, three inoculations were made in base of stem 15, 28 and 35 days after germination, we found that *B. subtilis* CBMT51 and *B. cereus* BL18 reduced the severity disease caused by *F. equiseti* and BL18 strain for *F. solani*, in 47.7, 37.8 and 50.9 % respectively at 28 days of evaluation.

*F. equiseti* con halos de 3.76 y 6.37 mm. Los dos patógenos mostraron 100 % de incidencia de la enfermedad en plántulas de chile habanero y severidad de 90.0 % por *F. solani* y 77.5 % por *F. equiseti*. En pruebas de resistencia a la marchitez se utilizaron cuatro cepas de *Bacillus* con base en la actividad antagónica mostrada, se realizaron tres inoculaciones en la base del tallo a los 15, 28 y 35 días después de la germinación, se obtuvo que *B. subtilis* CBMT51 y *B. cereus* BL18 redujeron la severidad de la enfermedad ocasionada por *F. equiseti* y la cepa BL18 para *F. solani*, en un 47.7, 37.8 y 50.9 % respectivamente a los 28 días de la evaluación.

**Palabras clave adicionales:** Rizobacteria, antagonismo, incidencia, severidad, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*.

En México los estados con mayor superficie de producción de *Capsicum chinense* Jacq. son Yucatán, Tabasco, Campeche y Quintana Roo, siendo Yucatán la entidad federativa con más superficie de producción con 170 hectáreas y una producción de 1,826 toneladas (SIAP, 2013). Además debido a sus características organolépticas, de mayor vida de anaquel y picor el chile habanero producido en la Península de Yucatán se considera de calidad superior a los cultivados en otras partes del mundo (Medina *et al.*, 2008). La reducción del rendimiento del cultivo de chile está asociada a la presencia de fitopatógenos. El género *Fusarium* es uno de los fitopatógenos más importantes asociados al marchitamiento y a la reducción del rendimiento de chile. *Fusarium* spp. y *F. oxysporum* fueron los hongos con mayor frecuencia asociados a marchitez en un 100 % de muestras de *Capsicum annuum* L. de diferentes tipos de chile como serrano y jalapeño (Albañil *et al.*, 2015). En *C. annuum* L., se

**Additional keywords:** Rhizobacteria, antagonism, incidence, severity, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*.

In Mexico, the states with the highest surface dedicated to the production of *Capsicum chinense* Jacq. are Yucatán, Tabasco, Campeche, and Quintana Roo, Yucatán being the state with the greatest surface of production, with 170 hectares, and a production of 1,826 tons (SIAP, 2013). Also, due to its organoleptic characteristics of a longer shelf life and spiciness, the habanero chili produced in the Yucatan is considered of a higher quality than those grown in other areas of the world (Medina *et al.*, 2008). The reduction of the chili crop yield is related to the presence of plant pathogens. The genus *Fusarium* is one of the most important plant pathogens related to the wilting and yield reduction of the chili plant. *Fusarium* spp. and *F. oxysporum* were the most frequent fungi related to wilting in 100 % of *Capsicum annuum* L. samples of different types of chilies, such as serrano and jalapeño (Albañil *et al.*, 2015). In *C. annuum* L., *F. oxysporum*, *F. solani*, and *F. equiseti* have been identified to affect the crop and reducing yield significantly (Martínez *et al.*, 2011). The most common methods of control of these pathogens is the use of synthetic fungicides that pollute the environment. Therefore, an alternative for biological control is the use of antagonistic rhizobacterias, capable of exerting control over pathogens (Guillén *et al.*, 2006). This antagonism is attributed in part to the production of chitinases (Chang *et al.*, 2010) and lipopeptides such as: iturin, surfactin, fengycin, and bacillomycin (Ramarathnam *et al.*, 2007). The most commonly used rhizobacterias belong to the genus *Bacillus*. The species of *B. megaterium* and *B. licheniformis* not only promote growth and

han identificado *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti* afectando al cultivo y reduciendo significativamente el rendimiento (Martínez *et al.*, 2011). El método de control más común de estos patógenos es el uso de fungicidas sintéticos que contaminan el ambiente. Por ello una alternativa de control biológico es el empleo de rizobacterias antagonistas, capaces de ejercer un control de patógenos (Guillén *et al.*, 2006). Este antagonismo se atribuye en parte a la producción de quitinasas (Chang *et al.*, 2010) y lipopéptidos como: iturina, surfactina, fengicina y bacilomicina (Ramarathnam *et al.*, 2007). Las rizobacterias más utilizadas son del género *Bacillus*. Las especies de *B. megaterium* y *B. licheniformis*, además de promover el crecimiento e inducir un mayor rendimiento de *C. annuum* L., están relacionadas con la reducción de la incidencia de fitopatógenos (Amaresan *et al.*, 2014). La aplicación de *B. megaterium* en *C. annuum* infectadas con *Phytophthora capsici* Leonian redujo la severidad de la enfermedad en un 50.4 % (Akgül y Mirik, 2008). Las rizobacterias activan mecanismos de defensa de las plantas contra fitopatógenos (Ahemad y Khan, 2011). En rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal, se ha observado la reducción de algunas enfermedades en las plantas, y están relacionadas con la capacidad de inducir enzimas de defensa, como peroxidasa, polifenol oxidasa, fenilalanina amonio liasa, quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasa, que pueden tener efecto en la reducción de la incidencia y severidad de las enfermedades (Saravanakumar *et al.*, 2007). Guillén *et al.* (2006), aplicaron *B. amyloliquefaciens* B1, *B. licheniformis* B3, y *B. subtilis* B9 y B13 sobre *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *P. capsici* Leonian, patógenos causantes de pudriciones de raíz de chile (*C. annuum* L.); la aplicación de las bacterias redujo la incidencia en 80 % y severidad de pudrición de raíz en 39 % respecto al testigo. En este estudio se evaluaron cepas de *Bacillus* spp. con actividad antifúngica *in vitro* y su efecto en la respuesta de

induce a higher yield of *C. annuum* L., but are also related to the reduction of the incidence of plant pathogens (Amaresan *et al.*, 2014). Applying *B. megaterium* in *C. annuum* infected with *Phytophthora capsici* Leonian reduced the severity of the disease by 50.4 % (Akgül and Mirik, 2008). The rhizobacterias activate defense mechanisms in plants against pathogens (Ahemad and Khan, 2011). In rhizobacterias that promote plant growth, a reduction has been observed of some diseases in plants, and they are related to the capacity of inducing defense enzymes, such asperoxidases, polyphenol oxidase, phenylalanin amonia lyase, chitinases and  $\beta$ -1,3 glucanase, which can have an effect on the reduction of disease incidence and severity (Saravanakumar *et al.*, 2007). Guillén *et al.* (2006), applied *Bacillus amyloliquefaciens* B1, *B. licheniformis* B3, and *B. subtilis* B9 and B13 on *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn and *P. capsici* Leonian, pathogens that cause rotting of roots in chili plants (*C. annuum* L.); applying bacteria reduced the incidence by 80 %, and root rotting severity by 39 % in comparison to the control. This study evaluated strains of *Bacillus* spp. with antifungal activity *in vitro* and its effect on the response of resistance to wilting in *C. chinense*, induced by *F. equiseti* and *F. solani*.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms used and preparation of inoculants.

Ten strains were used of *Bacillus*, isolated, and characterized in earlier works, nine strains with activity *in vitro* against different pathogenic fungi (Sosa *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016) and one strain (*Bacillus cereus* BL18) reported with properties in the growth enhancement

resistencia a la marchitez en *C. chinense*, inducida por *F. equiseti* y *F. solani*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos utilizados y preparación de inóculos.

Se utilizaron 10 cepas de *Bacillus*, aisladas y caracterizadas en trabajos previos, nueve cepas con actividad *in vitro* contra diferentes hongos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016) y una cepa (*B. cereus* BL18) reportada con propiedades en la promoción de crecimiento en *C. annuum* L. (Peña *et al.*, 2016). Los inóculos bacterianos se obtuvieron de cultivos en caldo nutritivo® (CN), de siete días en agitación a 200 rpm a 29 °C, el tiempo utilizado fue para permitir la formación de esporas, lo cual fue verificado con ayuda de un microscopio óptico. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8,000 x g por 10 min, al paquete celular se le realizó un lavado con solución 0.9 % de NaCl, y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> con la ayuda de una cámara de Neubauer (Luna *et al.*, 2013). Las cepas de *Fusarium solani* y *F. equiseti* fueron previamente aisladas de *C. chinense*. Los fitopatógenos fueron reactivados en medio de agar de papa dextrosa (PDA). Para su multiplicación se usaron hojuelas de avena esterilizadas en autoclave; para ello se depositaron 100 g de hojuelas en matraces de 250 mL de capacidad y se adicionó 40 mL de extracto de papa (300 g de papa cruda en 1 L de agua hirviendo por 15 min), posteriormente se depositaron dos discos de 0.5 cm del micelio en crecimiento activo de cada hongo fitopatógeno y fueron incubados en cámara de cultivo a 30 °C durante diez días (Bruna, 1991), esto se utilizó como inóculo para pruebas posteriores.

### Inhibición de crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium* spp. por *Bacillus* spp.

in *Capsicum annuum* L. (Peña *et al.*, 2016). The bacterial inoculants were obtained from broths in a nutrient broth® (CN) stirred for seven days at 200 rpm at 29 °C. The time used was to allow the formation of spores, which was verified with a light microscope. Later, samples were centrifuged at 8,000 x g for 10 min; the cellular package was washed with a 0.9 % NaCl solution, and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> using a Neubauer camera (Luna *et al.*, 2013). *Fusarium solani* and *F. equiseti* strains were previously isolated from *C. chinense*. The pathogens were reactivated in a potato dextrose agar (PDA) medium. For their multiplication, we used oat flakes sterilized in autoclave; for this, 100 g of flakes were placed in 250 mL flasks and 40 mL potato extract were added (300 g of raw potato in 1 L of boiling water for 15 min). Later, we deposited two discs of 0.5 cm of the mycelium in active growth of every pathogenic fungus and they were incubated in a growth chamber at 30 °C for ten days (Bruna, 1991). This was used as an inoculant for later tests.

### Inhibition of mycelial growth *in vitro* of *Fusarium* spp. by *Bacillus* spp.

The biotests were carried out by direct confrontation with the widely used dual planting (Li *et al.*, 2011; Essghaier *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2016). In the center of 90 x 15 mm Petri dished with potato dextrose agar (PDA) medium, we placed a disc, 0.5 cm in diameter, of mycelium of the pathogen with 10 d of active growth, and inoculated 6 µL of a  $1 \times 10^8$  UFC bacterial solution in four equidistant points around the mycelial growth at a distance of 2 cm. The dishes were incubated at 28 °C for 7 d. The radial growth was measured, and using this data, the percentage of mycelial inhibition was calculated, taking the fungal growth in PDA in the absence of bacteria as a control.

Los bioensayos se realizaron por confrontación directa con la técnica de cultivo dual ampliamente utilizada (Li *et al.*, 2011; Essghaier *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2016); en cajas Petri de 90 x 15 mm con medio agar de papa y dextrosa (PDA), se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio del fitopatógeno de crecimiento activo de 10 d en el centro de la caja y se inocularon 6  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC, en cuatro puntos equidistantes alrededor del crecimiento micelial a una distancia de 2 cm, las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 d. Se midió el crecimiento radial y con los datos se calculó el porcentaje de inhibición micelial, tomando como testigo el crecimiento del hongo en PDA sin la presencia de bacterias.

#### **Pruebas de patogenicidad de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en chile habanero.**

Se utilizaron semillas de chile habanero cv. criollo desinfectadas con 2 % de hipoclorito de sodio y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Se realizó la siembra en charolas de plástico de 98 cavidades con sustrato estéril comercial Cosmopeat®, esterilizado en una autoclave a 120 °C por 15 min. Se obtuvieron plántulas de 28 días después de la germinación (DDG) a las cuales se les realizó pruebas de patogenicidad para determinar la virulencia por acción de los hongos fitopatógenos. Se prepararon macetas en vasos de poliestireno expandido (unicel) de 32 oz, con 600 g de sustrato de una mezcla de suelo K'ancab (nomenclatura regional Maya) del tipo Luvisol y bovinaza (1:1) (Soria *et al.*, 2002), el tipo Luvisol son suelos arcillosos de color pardo rojizo ligeramente ácido (Bautista, 2005). El sustrato fue esterilizado a 120 °C por 15 min. A este sustrato se le adicionó 10 g de avena con el crecimiento de los fitopatógenos de  $1 \times 10^6$  conidios por gramos de avena; el cual se cuantificó

#### **Pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili.**

Habanero chili cv. native seeds were used after being disinfected with 2 % sodium hypochlorite and washed 3 times with sterile distilled water. They were planted in plastic trays with 98 holes with the commercial sterile substrate Cosmopeat®, sterilized in an autoclave at 120 °C for 15 min. Plantlets were obtained 28 days after germination (DDG) and pathogenicity tests were run on them in order to determine the virulence by action of the pathogenic fungi. Pots were prepared using 32 oz styrofoam cups, with 600 g of substrate of a mixture of the soil K'ancab (regional Mayan name) of the type Luvisol and cow manure (1:1) (Soria *et al.*, 2002). Luvisol soils are reddish brown clay soil and slightly acidic (Bautista, 2005). The substrate was sterilized at 120 °C for 15 min. It was added 10 g of oats with the growth of the pathogens of  $1 \times 10^6$  conids per grams of oats, which was quantified by taking a gram of oats with inoculant and adding 9 mL of sterilized distilled water. It was counted with the help of a Neubauer camera, one plantlet was placed in each pot, and in order to allow the pathogen to enter the plant, a 1 cm cut was performed on the apex of the root, in order to determine its virulence (Herrera *et al.*, 2011).

#### **Evaluation of the resistance to wilting by *Fusarium* spp. in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.**

The disinfected habanero chili seeds were planted in plastic trays with 98 holes with the commercial sterile substrate Cosmopeat®. Fifteen days after germination (DDG) an inoculation was carried out, of 1 mL of bacterial suspension of  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> on the base of the stems of the



tomando un gramo de avena con inóculo y adicionando 9 mL de agua destilada estéril, se realizó el conteo con la ayuda de una cámara de Neubauer, se depositó una plántula por maceta, y con el fin de permitir la entrada del patógeno a la planta, se le hizo un corte de 1 cm al ápice de la raíz, para determinar su virulencia (Herrera *et al.*, 2011).

### **Evaluación de la resistencia a la marchitez por *Fusarium* spp. en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.**

Las semillas de chile habanero desinfectadas se sembraron en charolas de plástico de 98 cavidades con sustrato estéril comercial Cosmopeat®. A los 15 días después de la germinación (DDG) se realizó una inoculación de 1 mL de suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> en la base del tallo de las plántulas, al testigo se le aplicó 1 mL de 0.9 % de NaCl. A los 28 DDG se realizó el trasplante en vasos de unicele de 32 oz con 600 g de sustrato (mezcla Luvisol y bovinaza), previamente inoculados con 10 g de avena que contenían  $1 \times 10^6$  conidios·g<sup>-1</sup>. Se aplicaron 3 mL de la solución bacteriana a los 28 y 35 DDG. La fertilización fue con la fórmula 125-100-150 de N-P-K (Soria *et al.*, 2002). Se estableció el experimento bajo condiciones de un invernadero tipo macrotúnel del Instituto Tecnológico de Conkal (21° 04' N y 89° 31' O), con seis tratamientos para cada fitopatógeno evaluado; cuatro cepas bacterianas, un tratamiento que consistió sin la inoculación bacteriana pero con la presencia de los hongos fitopatógenos y un testigo que consistió en plántulas sin inoculación de fitopatógenos ni de cepas bacterianas. Se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones para cada tratamiento, cada maceta representó una unidad experimental. Para asociar la resistencia inducida por la inoculación de las bacterias; cada cuatro días después de que aparecieron los síntomas, se estimó

plantlets. The control was applied 1 mL of 0.9 % of NaCl. At 28 DDG, the transplant was carried out in 32 oz styrofoam cups with 600 g of substrate (mixture of Luvisol and cow manure), previously inoculated with 10 g of oats that contained  $1 \times 10^6$  conids·g<sup>-1</sup>. After 28 and 35 DDG, 3 mL of the bacterial solution were added. Fertilization took place with the formula 125-100-150 of N-P-K (Soria *et al.*, 2002). The experiment was established under macrotunnel-type greenhouse conditions in the Instituto Tecnológico de Conkal (21° 04' N and 89° 31' O), with six treatments for each pathogen evaluated, four bacterial strains, a treatment that consisted of no bacterial inoculation, but with the presence of the pathogenic fungi, and a control that consisted in plantlets with no inoculation of pathogens of bacterial strains. It was established in a completely random design with 10 repetitions for each treatment; each pot represented an experimental unit. To associate the resistance induced by the bacterial inoculation, every four days after the appearance of the symptoms, the severity was estimated using a scale of five classes: 1=0 %, 3=10 %, 5=25 %, 7=50 %, and 9=100 % damage (CIAT, 1987). Using the severity data, progress curves of the disease were made, and the model of the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was used to calculate the intensity of the disease. On the 28th day after inoculation with the pathogens, the final severity of the disease was calculated with the arcsin instruction;  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ , using the parameter of  $Y_{\text{final}}$  (Campbell and Madden, 1990). Finally, using the Abbott procedure (1925), the efficiency of the bacterial strains as resistance inducers was validated. Averages were compared when the significance between treatments was determined using Tukey ( $p \leq 0.05$ ). To verify result reproducibility, the experiments were repeated in two periods (December, 2014 and February, 2015);

la severidad con apoyo de una escala de cinco clases: 1=0 %, 3=10 %, 5=25 %, 7=50 % y 9=100 % de daño (CIAT, 1987). Con los datos de severidad, se construyeron curvas del progreso de la enfermedad, y con el modelo del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se calculó la intensidad de la enfermedad. A los 28 días después de la inoculación con los fitopatógenos, se calculó la severidad final de la enfermedad con la instrucción de arcoseno;  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ , mediante el parámetro de  $Y_{final}$  (Campbell y Madden, 1990). Finalmente mediante el procedimiento de Abbott (1925) se validó la eficacia de las cepas bacterianas como inductoras de resistencia. Se aplicó el comparador de medias cuando se determinó significancia entre tratamientos con Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Con el propósito de verificar la reproducibilidad de resultados, los experimentos se repitieron en dos periodos (diciembre de 2014 y febrero de 2015), para el análisis se utilizaron los promedios de las dos evaluaciones. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SAS versión 9.3 para Windows (SAS Institute Inc. 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp.

Todas las cepas mostraron inhibir el crecimiento micelial de los patógenos, los porcentajes de inhibición en *F. equiseti* fueron de 21.28 a 71.70 % y para el caso de *F. solani* fue de 37.4 a 69.92 % (Cuadro 1) el mayor efecto fue observado con *B. subtilis* CBMT51 sobre el crecimiento de *F. equiseti*, y la cepa CBRF8 mostró el mayor efecto contra ambos patógenos con valores arriba del 63 %. La cepa *B. cereus* BL8, reportada como promotora de crecimiento, mostro porcentajes de inhibición

for the analysis, the averages of both evaluations were used. The statistical analyses were carried out using the program SAS version 9.3 for Windows (SAS Institute Inc. 2010).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *In vitro* activity of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp.

All strains showed inhibition of the mycelial growth of the pathogens; the percentages of inhibition in *F. equiseti* were between 21.28 and 71.70 %, and for *F. solani*, it was 37.4 to 69.92 % (Table 1). The greatest effect was observed with *B. subtilis* CBMT51 on the growth of *F. equiseti*, and strain CBRF8 showed the greatest effect against both pathogens with values of over 63 %. The strain *B. cereus* BL8, reported as a growth enhancer, showed percentages of inhibition significantly lower than the two strains mentioned above. The range of inhibition reported by several authors is broad, percentages of inhibition of 90 % are reported for *B. subtilis* strains against *Fusarium* sp. (Badía *et al.*, 2011), and, on the other hand, percentages of inhibition of 29.4 % were reported for *F. avenacum* (Essghaier *et al.*, 2012), and for *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens* against *F. oxysporum* of 42.0 and 51.5 % (Rios *et al.*, 2016); the latter are within the range obtained in this study. Strains CBMT2 and CBMT51 were the only ones to present halos of inhibition of mycelial growth in confrontation with *F. equiseti* with halos measuring 3.76 and 6.37 mm, respectively, which correspond to 18.3 and 31.5 % of inhibition (Figure 1). The antagonistic activity of *Bacillus* is due to several mechanisms, such as competition for the colonization of the rhizosphere (Compant *et al.*, 2005), production of lipopeptides such as Iturin,

**Cuadro 1.** Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp. a los siete días de confrontación.  
**Table 1.** Activity *in vitro* of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp. after seven days of confrontation.

Cepas de	Inhibición del crecimiento micelial (%)	
	<i>F. equiseti</i> ITCF1	<i>F. solani</i> ITCF2
<i>B. subtilis</i> CBRF4	52.29±2.24 c <sup>o</sup>	47.81±4.15 e
<i>Bacillus</i> sp. CBRF5	58.76±0.26 bc	61.60±1.05 b
<i>B. subtilis</i> CBRF8	63.89±0.26 abc	69.92±0.47 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> CBRF11	58.05±0.62 bc	58.37±0.45 bcd
<i>Bacillus</i> sp. CBRM9	60.15±0.55 abc	60.75±0.22 bc
<i>B. subtilis</i> CBMT2	65.08±0.58 ab	53.43±0.39 cde
<i>B. subtilis</i> CBMT51	71.70±0.35 a	56.81±1.30 bcd
<i>Bacillus</i> sp. CBCC58	21.28±5.08 e	22.34±1.14 g
<i>Bacillus</i> sp. CBCK44	61.99±0.50 abc	46.36±1.28 e
<i>B. cereus</i> BL18	37.34±632 d	37.40±2.59 f
Testigo	0.00±0.0 f	0.00±0.0 h

<sup>o</sup>Medias con letra distinta son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) / <sup>o</sup>Averages with different letters are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

significativamente menores a las dos cepas mencionadas. El rango de inhibición reportados por varios autores es amplio, porcentajes de inhibición de 90 % son reportados por cepas de *B. subtilis* contra *Fusarium* sp. (Badía *et al.*, 2011), por el contrario porcentajes de inhibición de 29.4 % fue reportado para *F. avenacum* (Essghaier *et al.*, 2012), y para *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* contra *F. oxysporum* de 42.0 y 51.5 % (Rios *et al.*, 2016), estos últimos se encuentran dentro del rango obtenido en el presente estudio. Las cepas CBMT2 y CBMT51, fueron las únicas que presentaron halos de inhibición del crecimiento micelial en confrontación contra *F. equiseti* con halos de 3.76 y 6.37 mm, respectivamente, que corresponden al 18.3 y 31.5 % de inhibición (Figura 1). La actividad antagónica de *Bacillus* se debe a varios mecanismos como competencia por la colonización de la rizosfera (Compant *et al.*, 2005), producción de lipopéptidos como Iturina, Fengicina y Surfactina (Kim *et al.*, 2010), y producción de enzimas líticas (Pleban *et al.*, 1997; Chang *et al.* 2010). La cepa *B. subtilis* Pla10 produce antibióticos de la familia Iturina A

Fengycin, and Surfactin (Kim *et al.*, 2010), and the production of lytic enzymes (Pleban *et al.*, 1997; Chang *et al.* 2010). The strain *B. subtilis* Pla10 produces antibiotics of the family Iturin A and Surfactin; the purified fractions showed that only Iturin A presented fungicidal activity (Ragazzo *et al.*, 2011). The purified chitinase from *Bacillus cereus* YQ 308 inhibits the elongation of *F. oxysporum* and *F. solani* hyphae, reducing the biomass of fungi in comparison with the control (Chang *et al.*, 2003). According to the results, four *Bacillus* strains were selected for the wilting control tests in habanero chili plants based on its antifungal activity; the strain CBRF8, which showed the highest percentage of mycelial inhibition in *F. solani*, the strain CBMT51, which showed the highest percentage of inhibition and halo of inhibition in *F. equiseti*, strain CBMT2, with antifungal activity against both pathogens and the presence of inhibition halo in *F. equiseti*, and the strain BL18 was included, with a moderate antifungal activity, although reported as having plant growth enhancing properties.



**Figura 1.** Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* CBMT51 contra *Fusarium equiseti* a los siete días de confrontación, en comparación con el testigo.

**Figure 1.** Antagonism *in vitro* of *Bacillus subtilis* CBMT51 against *Fusarium equiseti* after seven days of confrontation, compared to the witness.

y Surfactina, las fracciones purificadas mostraron que solo Iturina A es la que presentó actividad fungicida (Ragazzo *et al.*, 2011). La quitinasa purificada de *Bacillus cereus* YQ 308 inhibe la elongación de hifas de *F. oxysporum* y *F. solani*, disminuyendo la biomasa de los hongos en comparación al testigo (Chang *et al.*, 2003). De acuerdo con los resultados se seleccionaron cuatro cepas de *Bacillus* para los ensayos de control de la marchitez en chile habanero con base en su actividad antifúngica; la cepa CBRF8 que mostró el mayor porcentaje de inhibición micelial en *F. solani*, la cepa CBMT51 que mostró el mayor porcentaje de inhibición y halo de inhibición en *F. equiseti*, la cepa CBMT2, con actividad antifúngica contra ambos patógenos y presencia de halo de inhibición en *F. equiseti*, y se incluyó a la cepa BL18 con moderada actividad antifúngica pero reportada con propiedades de promoción de crecimiento vegetal.

#### **Pruebas de patogenicidad de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en chile habanero.**

#### **Pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili.**

The pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* ITCF1 and *F. solani* ITCF2 inoculated in habanero chili plants, showed virulence, since they induced characteristic symptoms such as chlorosis, flaccidity, and partial defoliation partial rotting of roots and neck, which occasionally rose to 3 to 7 cm above the base of the stem. Despite records of 100 % incidence with both species of fungus, severity was greater with *F. solani* ITCF2, where it recorded 90.0 %, and lower with *F. equiseti* ITCF1 with 77.5 %, without representing a statistical difference (Table 2). The symptoms of the disease began to manifest themselves after two weeks of inoculation with the pathogen. These results, in terms of incidence and severity, were similar to those obtained in other studies on *Capsicum annuum* L. and *Solanum lycopersicum* L., obtaining an incidence of 100 % and severity of 80 to 100 % with two strains of *F. oxysporum* (Apodaca *et al.*,

Las pruebas de patogenicidad por *Fusarium equiseti* ITCF1 y *F. solani* ITCF2 inoculadas en planta de chile habanero, mostraron virulencia, al inducir síntomas característicos como: clorosis, flacidez y defoliación parcial, pudrición de raíces y cuello, que en ocasiones ascendió de 3 a 7 cm de la base del tallo. A pesar de registrarse el 100 % de incidencia con las dos especies de hongos, la severidad fue mayor con *F. solani* ITCF2 donde registró 90.0 % y menor con *F. equiseti* ITCF1 con 77.5 %, sin que represente diferencia estadística (Cuadro 2). Los síntomas de la enfermedad se empezaron a manifestar a la segunda semana de inoculación con el patógeno. Estos resultados en cuanto a la incidencia y severidad fueron similares a los obtenidos en otros estudios en *Capsicum annuum* L. y *Solanum lycopersicum* L., obteniendo un 100 % de incidencia y severidad de 80 a 100 % con dos cepas de *F. oxysporum* (Apodaca *et al.*, 2004). En pruebas de patogenicidad en plantas de *Thevetia peruviana* inoculadas con especies de *Fusarium*, encontraron a *F. solani* provocando síntomas como: necrosis en el tallo, hojas cloróticas y marchitez, determinando a esta especie como la más virulenta (Herrera *et al.*, 2011), resultados que concuerdan con las del presente estudio. Se realizó un análisis de varianza con el modelo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para poder determinar la patogenicidad y agresividad de los dos hongos, se

2004). In pathogenicity tests on *Thevetia peruviana* plants inoculated with *Fusarium* species, *F. solani* was found to cause symptoms such as necrosis in the stem, chlorotic leaves, and wilting, determining this species as the most virulent (Herrera *et al.*, 2011), results which agree with those in this study. An analysis of variance was carried out with the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) model to determine the pathogenicity and aggressiveness of the two fungi, and for *F. equiseti* and *F. solani*, 1120.0 and 1201.0 units day<sup>-1</sup> were obtained, respectively. There was no significant difference in the virulence of the fungi (Table 2), although a greater unit can be observed of plants diseased with *F. solani*. For the control, without the presence of fungi, there were 0.0 diseased units, keeping the plants healthy and vigorous until the end of the experiment.

#### Evaluation of the resistance to wilting by *Fusarium* spp. in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

The appearance of symptoms in plants inoculated with *F. equiseti* and *F. solani* were observed eight days after inoculation. In general, in inoculated plants, *F. solani* displayed more virulence than *F. equiseti* when inducing greater severity during the progress of the disease; in control plants,

**Cuadro 2.** Incidencia y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de *F. equiseti* y *F. solani* en plantas de chile habanero.

**Table 2.** Incidence and area under the disease progress curve (AUDPC) for *F. equiseti* and *F. solani* in habanero chili plants

Tratamiento	Incidencia final (%)	(%) Y <sub>final</sub>	ABCPE (Unidad.día <sup>-1</sup> )
<i>F. equiseti</i>	100±0.0 a	77.5±12.0 a	1120.0±5.45 a°
<i>F. solani</i>	100±0.0 a	90.0± 6.6 a	1201.0±5.13 a
Testigo	0.0 b	0± 0.0 b	0.0±0.0 b

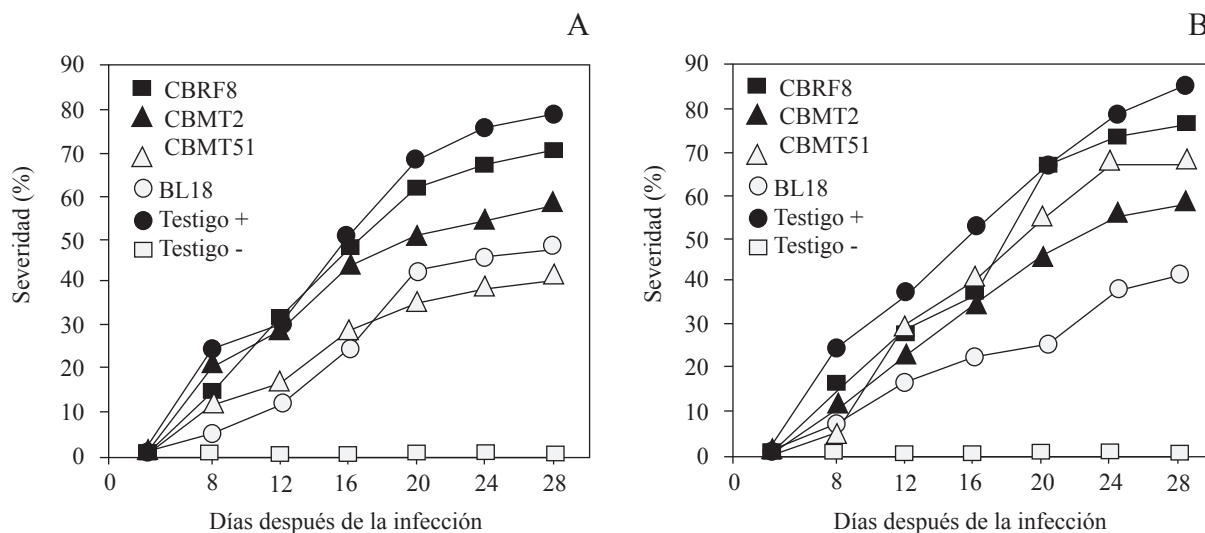
°Medias con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05) / ° Averages with different letters in each column are statistically different (Tukey 0.05).

obtuvo para *F. equiseti* y *F. solani* 1120.0 y 1201.0 unidades.día<sup>-1</sup>, respectivamente, no hubo diferencia significativa en la virulencia de los hongos (Cuadro 2), sin embargo, se puede observar una mayor unidad de plantas enfermas por *F. solani*. Para el testigo sin la presencia de hongos hubo 0.0 unidades enfermas manteniéndose las plantas sanas y vigorosas hasta el final del experimento.

### Evaluación de la resistencia a la marchitez por *Fusarium* spp. en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

La aparición de síntomas en plantas inoculadas con *F. equiseti* y *F. solani* se observaron a los ocho días posteriores a la inoculación. En general, en las plantas inoculadas, *F. solani* mostró mayor virulencia que *F. equiseti*; al inducir mayor severidad durante el progreso de la enfermedad; en plantas testigo sin la inoculación de patógenos, no se presentó la enfermedad (Figura 2). El análisis de la intensidad

without the inoculation of pathogens, the disease was not present (Figure 2). The analysis of the intensity of the disease showed less AUDPC with the inoculations of the strains CBMT51 and BL18 against *F. equiseti*, although only BL18 allowed less severity in plants infected with *F. solani*. At the end of the experiment, the parameter  $Y_{final}$  displayed, with CBMT51, a severity of 39.7 % in *F. equiseti*, while BL18 against *F. solani* gave 41.7 %. This helped calculate the higher levels of disease control with 47.8 and 50.9 % efficiency, respectively (Table 3). In trials with *B. subtilis* CAS15 applications on *C. annuum*, it reduced the severity of the disease caused by *F. oxysporum*, with a control efficiency of 56.9 %. Similar to that obtained in this study, this efficiency was attributed to a systemic resistance induction (SRI) (Yu *et al.*, 2011). The SRI has been observed in *C. annuum* against *Phytophthora capsici* when *B. megaterium* was used, when reducing the severity of the disease between 18.3 and 33.3 %, and a



**Figura 2.** Curvas del progreso de la enfermedad de la severidad por marchitez inducida por *Fusarium equiseti* (A) y *F. solani* (B) a los 28 días después de la infección en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

**Figure 2.** Disease progress curves of the severity by wilting induced by *Fusarium equiseti* (A) and *F. solani* (B) 28 days after the infection in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

de la enfermedad, mostró menor ABCPE con la inoculación de las cepas CBMT51 y BL18 contra *F. equiseti*, sin embargo, solo la BL18 permitió menor severidad en las plantas infectadas con *F. solani*. Al final del experimento, el parámetro de  $Y_{final}$ , registró con CBMT51 una severidad del 39.7 % en *F. equiseti*, mientras que con BL18 se obtuvo contra *F. solani* un 41.7 %. Esto permitió calcular los mayores niveles de control de la enfermedad con 47.8 y 50.9 % de eficacia, respectivamente (Cuadro 3). En ensayos con aplicaciones de *B. subtilis* CAS15 en *C. annuum* redujo la severidad de la enfermedad causada por *F. oxysporum*, con eficiencia de control del 56.9 %, similares a los obtenidos en este estudio, esta eficacia se atribuyó a una inducción de resistencia sistémica (IRS) (Yu *et al.*, 2011). La IRS se ha evidenciado en *C. annuum* contra *Phytophthora capsici* cuando se utilizó *B. megaterium* al reducir la severidad de la enfermedad del 18.3-33.3 %, y una eficiencia de control del 23.1-57.7 % (Akgül y Mirik, 2008). En el cultivo de *Cucumis sativus* con problemas de *F. oxysporum*, evaluaciones con *Bacillus* B068150, redujo la severidad en un 49.32 %

control efficiency of 23.1 to 57.7 % (Akgül and Mirik, 2008). In the *Cucumis sativus* crop with *F. oxysporum* problems, evaluations with *Bacillus* B068150, reduced the severity by 49.32 %, which meant a control of 50.68 % (Li *et al.*, 2011). In *S. lycopersicum*, resistance was conferred against *Ralstonia solanacearum* when using *B. subtilis* (CYBS-5) with a control efficiency of over 50 % (Chen *et al.*, 2012). Likewise, in *S. lycopersicum* L. affected by *F. oxysporum*, the implementation of *Pseudomonas fluorescens* significantly reduced the incidence and severity of wilting between 4.86 and 74.49 %, where the preinoculation with bacteria tends to improve the activation of the SRI (Yu *et al.*, 2011). Some rhizobacteria are capable of producing salicylic acid, responsible for SRI, as shown with *P. aeruginosa* TNSK2 against *Botrytis cinerea* (De Meyer and Hofte, 1997). These attributes can be used for the biological control of pathogens that originate in the soil, which can reduce the use of synthetic pesticides.

## CONCLUSIONS

**Cuadro 3.** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), severidad y eficiencia del control de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

**Table 3.** Area under the disease progress curve (AUDPC), severity and control efficiency for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

Tratamientos	<i>F. equiseti</i>			<i>F. solani</i>		
	ABCPE (% Unidad·día <sup>1</sup> )	$Y_{final}$ (%)	Efic. (%)	ABCPE (% Unidad·día <sup>1</sup> )	$Y_{final}$ (%)	Efic. (%)
CBRF8	1073.0 ab <sup>o</sup>	68.0 ab	10.8	1068.0 ab	76.2 ab	10.3
CBMT2	956.0 ab	56.7 ab	25.5	829.0 ab	58.5 ab	31.2
CBMT51	629.0 b	39.7 b	47.8	1064.5 ab	67.2 ab	20.9
BL18	630.0 b	47.7 ab	37.8	587.5 b	41.7 b	50.9
Testigo +	1198.0 a	76.3 a	0	1260.0 a	85.0 a	0
Testigo -	0.0 c	0.0 c	0	0.0 c	0.0 c	0
DMS	529.0	32.1		740.5	36.4	

<sup>o</sup>Medias con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ). DMS = diferencia mínima significativa; Testigo + con presencia del patógeno; Testigo - sin patógenos ni bacterias / <sup>o</sup> Averages with different letters in each column are statistically different (Tukey  $P \leq 0.05$ ). DMS = minimum significant difference; Control + with presence of the pathogen; Control - without pathogens or bacterias.

lo que significó un control del 50.68 % (Li *et al.*, 2011). En *S. lycopersicum* se confirió resistencia contra *Ralstonia solanacearum* al utilizar *B. subtilis* (CYBS-5) con una eficacia de control mayor al 50 % (Chen *et al.*, 2012). También en *S. lycopersicum* L. afectados por *F. oxysporum* la implementación de *Pseudomonas fluorescens* redujo significativamente la incidencia y severidad de la marchitez del 4.86-74.49 %, donde la pre-inoculación con las bacterias tiende a mejorar la activación de IRS (Yu *et al.*, 2011). Algunas rizobacterias tienen la capacidad de producir ácido salicílico; responsable de la IRS, como se demostró con *P. aeruginosa* 7NSK2 contra *Botrytis cinerea* (De Meyer y Hofte, 1997). Estos atributos pueden ser aprovechados para el control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo reduciendo, lo que puede disminuir el uso de plaguicidas sintéticos.

## CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas en estudio presentaron propiedades antagónicas *in vitro* contra *F. solani* y *F. equiseti*, estos patógenos presentaron virulencia en *C. chinense* al provocar marchitez a las plantas. Para la resistencia a la marchitez en *C. chinense*, la inoculación de las cepas *B. subtilis* CBMT51 y *B. cereus* BL18 redujeron la severidad provocada por *F. equiseti*, sin embargo, sólo la BL18 la redujo en *F. solani*. Se observó que la capacidad de control de la enfermedad está asociada con el tipo de cepa bacteriana y por la especie del fitopatógeno. Las cepas CBMT51 y BL18 mostraron propiedades en el biocontrol de marchitez ocasionadas por *Fusarium*, por lo que pueden ser utilizadas en la protección del cultivo de chile habanero.

### AGRADECIMIENTOS

Proyecto parcialmente financiado por TecNM, los autores

The bacterial strains in this study presented antagonistic properties *in vitro* against *Fusarium solani* and *F. equiseti*, both of which displayed virulence in *Capsicum chinense*, causing wilting in plants. For the resistance to wilting in *C. chinense*, the inoculation of the strains *Bacillus subtilis* CBMT51 and *B. cereus* BL18 reduced the severity caused by *F. equiseti*, although only BL18 decreased it in *F. solani*. The capacity to control the disease was observed to be related to the type of bacterial strain and the species of the pathogen. Strains CBMT51 and BL18 displayed properties in the biocontrol of wilting caused by *Fusarium*, therefore they can be used to protect habanero chili crops.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Project partially funded by TecNM, the authors wish to thank Alejandro García Ramírez for his technical support.

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

agradecen a Alejandro García Ramírez por su apoyo técnico.

## LITERATURA CITADA

- Albañil-Juárez J A, Mariscal-Amaro LA, Martínez-Martínez TO, Anaya-López JL, Cisneros-López HC y Pérez-Ramírez HA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11: 2191-2197. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/Agricolas/article/view/4044/3378>
- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ahemad M and Khan MS. 2011. Functional Aspects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Recent Advancements. Insight Microbiology 1: 39-54. <http://dx.doi.org/10.5567/IMICRO-IK.2011.39.54>
- Akgül DS and Mirik M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* stra-



- ins. Journal of Plant Pathology 90: 29-34. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v90i1.588>
- Amarasan N, Jayakumar V and Thajuddin N. 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. Indian Journal of Biotechnology 13: 247-255. Disponible en línea: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/29149/1/IJBT%2013%282%29%20247-255.pdf>
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, Osada-Kawasoe S, García-Espinosa R y Valenzuela-Ureta JG. 2004. Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 22-29. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222104>.
- Badía RMM, Hernández TB, Murrel LJA, Mahillon J y Pérez M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Brasileira de Agroecología 6: 90-99. Disponible en línea: <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/9924/6778>
- Bautista F, Palma-López D y Huchim-Malta W. 2005. Actualización de la clasificación de los suelos del estado de Yucatán. p. 105-222. En: F. Bautista y G. Palacios (Eds.) Caracterización y Manejo de los Suelos de la Península de Yucatán. Implicaciones Agropecuarias, Forestales y Ambientales. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de Yucatán. 282.
- Bruna A. 1991. Marchitez y pudrición de corona y raíces de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht. sp. *asparagi* Cohen. Agricultura Técnica (Chile) 51: 52-54. Disponible en línea: [http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08\\_es.pdf](http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08_es.pdf)
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to plant epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 532 p.
- Chang WT, Chen CS and Wang SL. 2003. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. Current Microbiology 47: 102-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-002-3955-7>
- Chang WT, Chen ML and Wang SL. 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 945-950. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0244-7>
- Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R and Guo J. 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology 10: 1-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x>
- CIAT. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Art van Schoonhoven y Marcial Pastor-Corrales (comp). Cali, Colombia. 42 p. Disponible en línea: [https://books.google.com.mx/books?id=mpgIE\\_jDedMC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=Sistema+estándar+para+la+evaluación+de+germoplasma+de+fr%C3%ADjol.&source=bl&ots=CLo9IQyb3M&sig=PA4zRe7HGCi9C5rNeK55kwA8XU&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi5wrGr9\\_KAhW1h4KHJeA\\_4Q6AEIzAC#v=onepage&q=Sistema%20estándar%20para%20la%20evaluación%20de%20germoplasma%20de%20fr%C3%ADjol.&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=mpgIE_jDedMC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=Sistema+estándar+para+la+evaluación+de+germoplasma+de+fr%C3%ADjol.&source=bl&ots=CLo9IQyb3M&sig=PA4zRe7HGCi9C5rNeK55kwA8XU&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi5wrGr9_KAhW1h4KHJeA_4Q6AEIzAC#v=onepage&q=Sistema%20estándar%20para%20la%20evaluación%20de%20germoplasma%20de%20fr%C3%ADjol.&f=false)
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA. 2005. Use of growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71: 4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- De Meyer G and Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. Phytopathology 87: 588-593. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.588>
- Essghaier B, Hedi A, Hajlaoui MR, Boudabous A, and Sadfi-Zouaoui N. 2012. *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. African Journal of Microbiology Research 6: 4073-4083. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.403>
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo, FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E y Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24: 105-114. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224204>
- Herrera-Parra E, Bacab-Pérez IM, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, y Ruiz-Sánchez E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. Fitosanidad 15: 231-236. Disponible en línea: <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/139>
- Kim PI, Ryu J, Kim YH and Chi YT. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 138-145. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Li L, Ma J, Li Y, Wang Z, Gao T and Wang Q. 2011. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. Crop Protection 35: 29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.004>
- Luna ML, Martínez PRA, Hernández IM, Arvizu MSM y Pacheco AJR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana 36: 63-69. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61025678008>
- Medina-Lara F, Echeverría-Machado I, Pacheco-Arjona R, Ruiz-Lau N, Guzmán-Antonio A and Martínez-Estévez M. 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience 43: 1549-1554. Disponible en: <http://hortsci.ashspublishations.org/content/43/5/1549.full>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A y José Tun-Suárez JM. 2013. Actividad antagonista de cepas nativas de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* sp. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Oaxaca de Juárez, Oaxaca,

- México. Resumen, p. 26-29.
- Martínez MA, Martínez MC, Bielza P, Tello J and Lacasa A. 2011. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* densities in pepper crops. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* 38: 3-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0826-2>.
- Peña-Yam LP, Ruiz-Sánchez E, Barboza-Corona JE and Reyes-Ramírez A. 2016. Isolation of Mexican *Bacillus* Species and Their Effects in Promoting Growth of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L. cv Jalapeño). *Indian Journal of Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-016-0582-8>.
- Pleban S, Chernin L and Chet I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25: 284-288. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00224.x>
- Ragazzo-Sánchez JA, Robles-Cabrera A, Lomeli-González L, Luna-Solano G y Calderón-Santoyo ML. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 17: 5-11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60920104001>
- Ramarathnam R, Bo S, Chen Y, Fernando WG, Xuewen G and De Kievit T. 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 901-911. <http://dx.doi.org/10.1139/W07-049>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Ruiz-Sanchez E, Mejia-Bautista MA, Serrato-Diaz M, Reyes-Ramirez A, Estrada-Giron Y y Valencia-Botin AJ. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia* 50: 133-148. Disponible en línea: <http://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2016/feb-mar/art-1.pdf>
- Saravanakumara D, Vijayakumar C, Kumar N and Samiyappan R. 2007. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection* 26: 556-565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.007>
- SAS Institute. 2010. User's Guide: Statistics, version 9.3. SAS Inst. Inc., Cary, North Caroline, USA.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Anuarios estadísticos. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. <http://www.siap.gob.mx/>
- Soria FM, Tun SJ, Trejo RA y Terán SR. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). SEP. DGTA. ITA-2 Conkal, Yuc, México. 75 p.
- Sosa-Pech M, Ruiz-Sánchez E., Mejía-Bautista M, Reyes-Ramírez A., Cristóbal-Alejo J, Valencia-Botín A y Gutiérrez-Alonzo O. 2012. Actividad antagonista *in vitro* de aislados de la clase Bacilli de la península de yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. *Universidad y Ciencia* 28:279-284. Disponible en <http://132.248.10.25/era/index.php/rera/article/view/16>
- Yu X, Ai C and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>.

# Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez

## Germinación de esclerocios y formación de ascoporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez

Moreno-Manzano, Celeste E<sup>1</sup>., De León-García de Alba, Carlos<sup>1\*</sup>, Nava-Díaz, Cristian<sup>1</sup> y Sánchez-Pale, Ricardo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

\*Autor de correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Recibido: Marzo 22, 2016.

Aceptado: Junio 24, 2016.

Moreno-Manzano CE, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Sánchez-Pale R. 2016. Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 223-241.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1603-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-2)

Primera publicación DOI: Junio 28, 2016.

First DOI publication: June 28, 2016.

**Resúmen.** La enfermedad “diente de caballo” del maíz (*Claviceps gigantea*) afecta hasta 90 % del grano. Se estudiaron condiciones para germinación de esclerocios, formación de estructuras sexuales y se describe parte del ciclo del hongo en laboratorio y campo. Se estableció un diseño con sustrato y tiempo de incubación a 4 °C. Se evaluaron porcentaje de esclerocios germinados, tiempo de germinación y formación de cabezuelas estromáticas. En laboratorio, los esclerocios germinaron solamente en carbón residual después de 3 meses a 4 °C y 2 meses a 22-24 °C de incubación re-

**Abstract.** The disease known as “horse’s tooth” in maize (*Claviceps gigantea*) can affect grain yield up to 90 %. In this research, the time of sclerotial germination and the development of the sexual structures were studied in field and laboratory. A design was implemented with substrate and time of incubation at 4 °C as factors. Percent of germinated sclerotia, time of germination, and formation of stromatic heads were evaluated. In laboratory, sclerotia germinated only when on residual charcoal, incubated for 3 months at 4 °C followed by 2 months at 22.24 °C, resulting in 55 % germination. Sclerotia germinated produced an average of five heads per sclerotium 15 d after primordial were produced. In field conditions, the primordial appeared after the sclerotia were incubated for 3 months at 4 °C and 64 d at an average temperature of 14.07 °C. In both types of sclerotia, primordia released thin, elongated ascospores after 23 d, showing that the appearance of primordia and maturity did not occur at the same time. Ascospores release from the stromatic heads was documented.

sultando en 55 % de germinación. Esclerocios germinados producen en promedio cinco cabezuelas por esclerocio 15 d después de la aparición de los primordios. En campo, los primordios aparecieron cuando los esclerocios se incubaron 3 meses a 4 °C y 64 d a temperatura promedio de 14.07 °C. En campo y laboratorio, la liberación de ascosporas se observó 23 d después de aparecer de los primordios. La aparición de cabezuelas estromáticas, su desarrollo y maduración en el mismo esclerocio no fué sincronizado. Se documentó la liberación de ascosporas largas y delgadas emergiendo de cabezuelas estromáticas. El patógeno se identificó morfológica y molecularmente como *Claviceps gigantea*.

**Palabras clave:** Diente de caballo en maíz, clavicipitales, identificación-morfológica, biología de patógenos.

El maíz continúa siendo el alimento básico de los mexicanos. Del total de 23.3 Mt que se producen en el país, aproximadamente 20 % de éste se produce en el altiplano, incluyendo los estados de México, Puebla y Michoacán (SAGARPA-SIAP, 2014), localidades en donde se presentan baja temperatura y alta humedad, condiciones idóneas para que se presente la enfermedad causada por el hongo *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* (anamorfo *Sphacelia* sp.) conocida por los agricultores como “diente de caballo”, debido a la forma que toman los granos infectados. Recientemente, la enfermedad ha aumentado su incidencia y distribución limitando la calidad del grano producido, afectando hasta 90 % de la cosecha, especialmente en híbridos comerciales. Además del daño al grano, el hongo produce toxinas alucinógenas del grupo del ácido lisérgico.

El primer reporte de la enfermedad diente de caballo en maíz (*Zea mays L.*), causada por *C. gigantea* lo realizaron Fuentes y De la Isla (1961) y

The pathogen was identified morphologically and molecularly as *Claviceps gigantea*.

**Key words:** Horses's tooth disease, maize, claviceps, morphological identification, pathogens biology

Maize continues to be a staple food for Mexicans. From a total domestic production of 23.3 metric tons, about 20 % is sown in the highlands, including the State of Mexico, Puebla and Michoacán (SAGARPA-SIAP, 2014), where low temperature and high humidity prevail and favor the development of a disease caused by the *Claviceps gigantea* fungus (anamorph *Sphacelia* sp.) (Fuentes *et al.*). This disease is known by farmers as “horse's tooth” because of the shape of the infected grains. Recently, the increased incidence and distribution of the disease has lowered the grain quality and affected up to 90 % of harvests, especially of commercial hybrids. In addition to grain damage, *Claviceps gigantea* produces hallucinogenic toxins of the lysergic acid group.

The first to report horse's tooth in maize (*Zea mays L.*) caused by *C. gigantea* were Fuentes and De la Isla (1961) and Fuentes *et al.* (1964), who described the disease-causing agent. The authors reported the disease both in the highlands, including Toluca and Amecameca, State of Mexico, and the Tarascan mountains in Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964). These two states produce around 17 % of the maize grain in the whole country (SAGARPA-SIAP, 2014). Characteristic symptoms of the disease are observed at the end of the crop cycle. At the tip of the ear, the husk opens to reveal brown fungal structures called sclerotia (Figure 1A) that have replaced the grains. (Fuentes and De la Isla, 1961; Osada *et al.*, 1986).

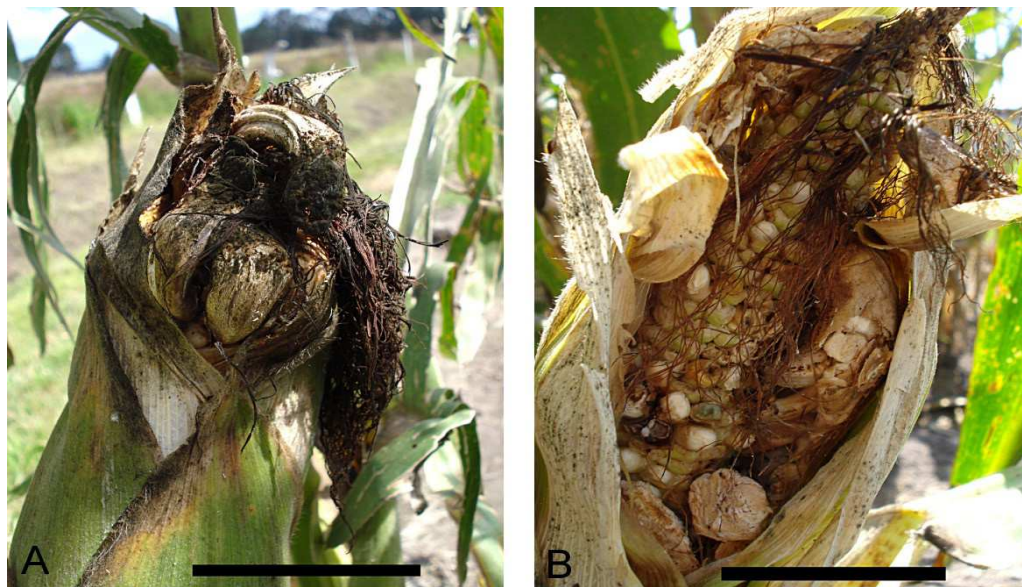
In the Toluca valley, Moreno and Fucikovski

Fuentes *et al.* (1964), quienes describieron el agente causal. Esos autores reportaron la enfermedad en los valles altos de Toluca y Amecameca en el estado de México y en la sierra Tarasca de Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964); en estos dos estados se produce aproximadamente 17 % del maíz para grano de todo el país (SAGARPA-SIAP, 2014). Los síntomas característicos de la enfermedad se observan al final del ciclo del cultivo, en el ápice de las mazorcas las brácteas se abren y dejan al descubierto estructuras fungosas de color castaño que corresponden a los esclerocios (Figura 1A), que remplazan a los granos (Fuentes y De la Isla, 1961; Osada *et al.*, 1986).

En el Valle de Toluca, Moreno y Fucikovski (1972) documentaron incidencia de 42.3 a 61.5 % en tres híbridos comerciales de maíz. En cuantificaciones de pérdidas en grano causadas por la enfermedad en las zonas productoras de maíz en Metepec y Calimaya, México, los agricultores

(1972) documented an incidence of 42.3 to 61.5 % in three maize commercial hybrids. Regarding quantifications of grain losses caused by horse's tooth in Metepec and Calimaya, Mexico, maize growing zones, farmers Alfredo Vásquez and Juan Manuel Pereyra reported grain losses of 70 and 90 % in the 2012 crop cycle using Aspros 910 (Aspros) and Quetzal (De Kalb) commercial hybrids, respectively (Figure 2).

According to Fucikovsky and Moreno (1971), this disease can significantly reduce crop production for the fungus replaces the grain and affects the appearance and germination of grains next to sclerotia (Figure 1B). Furthermore, sclerotia-contaminated grain fetches a lower price because it contains toxic alkaloids, just as other *Claviceps* species do (Osada *et al.*, 1986). Little is known of the life cycle of *C. gigantea* and of the environment conditions that affect it. De la Isla and Fuentes (1963), Fuentes *et al.* (1964), Agurell *et al.*



**Figura 1.** Mazorcas de maíz infectadas con *Claviceps gigantea*, en el municipio de Almoloya de Juárez, México. A) parte apical de la mazorca con esclerocios que emergen rompiendo las brácteas y, B) daño en granos adyacentes a los esclerocios.

**Figure 1.** Maize ears infected by *Claviceps gigantea* in the municipality of Almoloya de Juárez, México. A) cob apex affected by sclerotia, which is observed when the husk is removed, and B) damaged grains next to sclerotia.

Sres. Alfredo Vásquez y Juan Manuel Pereyra, informaron que en sus parcelas, en el ciclo de cultivo de 2012, se registraron pérdidas de grano del 70 y 90 % en siembras con los híbridos comerciales Aspros 910 (Aspros) y Quetzal (De Kalb), respectivamente (Figura 2).

Según Fucikovsky y Moreno (1971), ésta enfermedad puede reducir significativamente la producción ya que el hongo reemplaza al grano afectando el aspecto y germinación de los granos cercanos al esclerocio (Figura 1B). Además, la contaminación del grano con esclerocios penaliza el precio del grano durante su comercialización pues contiene alcaloides tóxicos, como otras especies de *Claviceps* (Osada *et al.*, 1986). Poco se sabe del ciclo biológico de *C. gigantea* y de las condiciones ambientales que lo afectan. De la Isla y Fuentes (1963), Fuentes *et al.* (1964), Agurell *et al.* (1963) y Osada (1984)

(1963) and Osada (1984) reported germination of *C. gigantea* sclerotia after they were disinfected, incubated at high and low temperature and light-darkness periods that simulated field conditions, using sterile and wet sand as substrate. However, the pathogen life cycle has not yet been documented nor the time required for each development phase, and this has important implications for the pathogen integrated management. The objectives of this study were: 1) determine the time of sclerotia germination and formation of perithecia and asci, as well as *C. gigantea* ascospore release under laboratory and field conditions; 2) ascospore development in a culture medium; and 3) confirm the pathogen identity through morphological and molecular techniques.

## MATERIALS AND METHODS



**Figura 2.** Incidencia de diente de caballo en mazorcas de maíz producidas en lotes de agricultores sembradas con híbridos comerciales susceptibles durante el ciclo de cultivo 2012. Se ha recomendado a los agricultores recoger y quemar las mazorcas afectadas para evitar la diseminación del inóculo en sus terrenos.

**Figure 2.** Incidence of horse's tooth in maize cobs harvested in farmers' plots sown to susceptible commercial hybrids in the 2012 crop cycle. Farmers were advised to collect and burn the infected cobs to prevent inoculum dissemination in their fields.

reportaron la germinación de los esclerocios de *C. gigantea* después de haberlos sometido a desinfección, incubación a altas y bajas temperaturas y períodos de luz-oscuridad simulando condiciones de campo, y utilizando como sustrato arena estéril, húmeda. Sin embargo, aun no se ha documentado el ciclo biológico del patógeno y el tiempo que requiere cada fase de desarrollo, lo que tiene importantes repercusiones en el manejo integrado del patógeno. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar el tiempo de germinación de los esclerocios y la formación de peritecios, ascas y liberación de ascosporas de *C. gigantea* en condiciones de laboratorio y en campo, 2) crecimiento de ascosporas en medio de cultivo y, 3) confirmar la identidad del patógeno mediante morfología y técnicas moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de esclerocios

Para inducir la germinación de esclerocios en laboratorio se usaron esclerocios colectados en los municipios de Almoloya de Juárez (19° 33' 01" N - 99° 56' 13" O), Calimaya (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O) y Villa Victoria (19° 26' 00" N - 100° 00' 00" O), en el estado de México, durante noviembre - diciembre del 2012. Los esclerocios colectados se almacenaron a 4 °C durante tres meses. Los esclerocios se clasificaron por tamaño, se lavaron con detergente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) 1.5 % por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron sobre papel absorbente durante 24 h (CMI, 1974).

### Germinación de esclerocios en laboratorio

Se desinfectaron botellas de polietileno tereftalato glicol (PET, producido por Amacor Plastic Containers de México, S. A. de C. V) de 500 mL

### Sclerotia collection

Sclerotia collected in the municipalities of Almoloya de Juárez (19° 33' 01" N - 99° 56' 13" O), Calimaya (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O) and Villa Victoria (19° 26' 00" N - 100° 00' 00" O), State of Mexico, during November and December 2012, were used to induce germination of sclerotia in the lab. Sclerotia collected were stored at 4 °C for three months. They were classified by size, washed with detergent, disinfected with a 1.5 % sodium hypochlorite (NaClO) solution for 2 minutes, rinsed three times with distilled water, and dried on paper towels for 24 hours (CMI, 1974).

### Sclerotia germination in the lab

Polyethylene terephthalate glycol 500 mL bottles (PET, manufactured by Amacor Plastic Containers de México, S. A. de C. V) were disinfected with 96 % ethyl alcohol. 20, 35 and 70 g of the following substrates were added to the bottles: 1) soil from Almoloya, Calimaya or Villa Victoria, 2) commercial charcoal, 3) residual charcoal, 4) oat flakes, and 5) a witness without substrate. To all bottles, 75 ml of sterile distilled water was added. Three sclerotia were placed in each bottle. The bottles were stored in a cold room at 4 °C for 1, 2, 3, 4 and 6 months. Then they were incubated at room temperature (22-24 °C) for 2 months and all the variables were daily monitored.

The assessed variables were time to stipes emergency (germination), time for stipes to develop and time for heads to form. Ascospore discharge was monitored following three methods: 1. Direct observation every 2 h using a stereoscopic microscope (Olympus SL2 ILST); 2. Observation of ascospores captured on a slide (Corning 75x25 mm) and covered with lactophenol cotton blue stain placed in PET bottle caps every 8 h; and

con alcohol etílico 96 %. A éstos frascos se agregaron 20, 35, 40 y 70 g de cada uno de los siguientes sustratos: 1) suelo de Almoloya, Calimaya o Villa Victoria, 2) carbón comercial, 3) carbón residual, 4) avena, y 5) testigo sin sustrato. A todos los frascos se adicionaron 75 ml de agua destilada estéril. En cada frasco se colocaron tres esclerocios. Los frascos se colocaron en un cuarto frío a 4 °C durante 1, 2, 3, 4 y 6 meses. Después, se incubaron a temperatura ambiente (22-24 °C) por 2 meses y todas las variables se monitorearon diariamente.

Las variables evaluadas fueron el tiempo a la emisión de los estípites (germinación), tiempo para desarrollo de los estípites y tiempo para la formación de cabezuelas. La descarga de ascosporas se monitoreó mediante tres métodos: 1. Observación directa cada 2 h utilizando un microscopio este-reoscópico (Olympus SL2 ILST), 2. Observación cada 8 h de ascosporas capturadas en un portaobjetos (Corning 75x25 mm) cubiertos de azul de lactofenol colocados en la tapa de frascos PET y, 3. Observación cada 24 h de esporas capturadas en 6 ml de agua destilada estéril contenida en la tapa de una caja Petri (6 cm de diametro) colocada en el fondo de los frascos PET invertidos fijando los esclerocios en la base usando paraplást.

El diseño experimental fue de un ensayo factorial 5x3 con sustratos y tiempos de incubación a 4 °C como los factores. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. La unidad experimental fue un frasco cilíndrico con el sustrato y tres esclerocios. El experimento completo se repitió dos veces.

### **Germinación de esclerocios en campo**

En junio de 2013, los esclerocios almacenados a 4°C durante tres meses, se colocaron sobre suelo de cultivo del rancho El Rosedal (Km 13.5 carretera Toluca-Atla-comulco, municipio de Atla-comulco, estado de México. (19° 24' 19.28" N y 99° 43' 12.84" O), cuando el cultivo de maíz (Aspros HC8)

3. Observation of spores captured in 6 ml of sterile distilled water in a Petri dish cap every 24 h (6 cm diameter); spores were placed at the bottom of inverted PET bottles and sclerotia were fixed to the base using paraplást.

The experimental design was a factorial trial 5x3 with substrates and incubation periods at 4 °C as factors. Three replications were used for each treatment. The experiment unit was a cylindrical bottle with substrate and three sclerotia. The whole experiment was repeated twice.

### **Sclerotia germination in the field**

In June 2013, sclerotia that had been stored at 4 °C for three months were placed on cultivated soil at El Rosedal Ranch (Km 13.5 carretera Toluca-Atla-comulco, Atla-comulco Municipality, State of Mexico. (19° 24' 19.28" N and 99° 43' 12.84" W), three weeks after maize (Aspros HC8) was sown. Four 40x40x40 cm frames with wire mesh (1 cm<sup>2</sup>) were randomly distributed within the field. Each frame contained 30 sclerotia (Pedroza-Sandoval, 2010). Variables of the sclerotia placed in the field were monitored on a weekly basis. Germinated sclerotia were transferred to a 2 L PET bottle containing 3 cm of soil at the bottom; variables were observed every day. Climate data were obtained from the Arroyo station, one of the INIFAP's National Stations Network, located in the municipality of Almoloya de Juárez, Mexico (19° 24' 34.92" N, 99° 44' 12.12" O). The variables observed daily were time to stipes emergence, full development of stipes, heads and perithecia, and ascospores discharge, using the methods previously mentioned.

### **Histological cuts of stromatic heads**

To observe the sexual structures (perithecia, asci and ascospores) formed on the heads obtained, histological sections were made manually using a



tenía tres semanas de siembra. Cuatro armazones de 40x40x40 cm con paredes de malla de alambre (1 cm<sup>2</sup>) se distribuyeron al azar en la parcela. Cada armazón contenía 30 esclerocios (Pedroza-Sandoval, 2010). Las variables en los esclerocios colocados en el campo se monitorearon semanalmente. Una vez germinados, los esclerocios se transfirieron a un frasco de PET de 2 L que contenía 3 cm de suelo en la base del frasco donde las variables se observaron diariamente. Los datos climatológicos se obtuvieron de la estación Arroyo, municipio Almoloya de Juárez, México (19° 24' 34.92" N, 99° 44' 12.12" O) perteneciente a la Red Nacional de Estaciones del INIFAP. Las variables evaluadas diariamente fueron tiempo de emisión de estípites, desarrollo completo de los estípites, formación de cabezuelas y peritecios y descarga de ascosporas con los métodos descritos anteriormente.

### Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas

Con la finalidad de observar las estructuras sexuales (peritecios, ascas y ascosporas) formadas en las cabezuelas obtenidas se realizaron cortes histológicos a mano con navaja de afeitar. Los cortes obtenidos se colocaron en un portaobjetos con azul de lactofenol para ser documentados utilizando un fotomicroscopio III Carl Zeiss adaptado con una cámara digital PAXcam3. Adicionalmente, las cabezuelas se fijaron en FAA (formaldehído : ácido acético glacial : alcohol, 1:1:1) por 24 h (Kulkarni, 1963). Las muestras se enjuagaron con agua corriente por 20 min para eliminar el fijador y se deshidrataron en una serie de concentraciones de etanol (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) durante 3 h en cada concentración. Para la deshidratación e inclusión en parafina se siguió el protocolo descrito por López *et al.* (2005). Los cortes de tejido se realizaron con un micrótopo de rotación (American Optical Mod. 820) a 10 µm de

razor blade. The cuts were placed on a slide with lactophenol cotton blue stain to be documented using a photomicroscope III Carl Zeiss adapted with a PAXcam3 digital camera. Additionally, the heads were fixed to FAA (formaldehyde : glacial acetic acid : alcohol, 1:1:1) during 24 h (Kulkarni, 1963). The samples were rinsed with running water during 20 min to remove the fixative and dehydrated in ethanol concentrations (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % and 100 %) for 3 h in each concentration. For dehydration and immersion in paraffin, the protocol described by López *et al.* (2005) was followed. Tissue cuts were made using a rotation microtome (American Optical Mod. 820) at 10 µm thickness. The sections were fixed to glass slides, the paraffin was removed and the sections were stained with fast-green safranin (López *et al.*, 2005). Sections were observed and measured using an optical microscope (VELAB model: VE-B6) equipped with a Moticam 2300 digital camera (3.0 M Pixel USB 2.0) and image processing software Motic MC Camera 1.1. The length and width of asci, ascospores and perithechia were evaluated in a sample of 30 individuals (Pedroza-Sandoval, 2010), and both length and width were compared to the ones reported in literature (Fuentes *et al.*, 1964).

### Growth in a culture medium

To evaluate the *in vitro* growth of the fungus, and stromatic heads while discharging ascospores were washed with powder detergent, rinsed with sterile water, disinfected with 1.5% sodium hypochlorite during 2 min, and rinsed with sterile distilled water. The heads were cut with a razor blade and the sections were placed in 5 mL of sterile distilled water. To observe the effect of the thermal treatment on ascospores germination, once their presence was confirmed, the sample was divided

grosor. Las secciones fueron fijadas en los portaobjetos, se removió la parafina y se tiñeron con safranina-verde rápido (López *et al.*, 2005). Los cortes se documentaron y midieron usando un microscopio óptico (VELAB modelo: VE-B6) equipado con una cámara digital Moticom 2300 (3.0 M Pixel USB 2.0) y el software de procesamiento de imágenes Moticom MC Camara 1.1. Las medidas del largo y ancho de las ascas, ascosporas y peritecios se evaluaron en una muestra de 30 individuos (Pedroza-Sandoval, 2010) y las dimensiones fueron comparadas con las reportadas en la literatura (Fuentes *et al.*, 1964).

### Crecimiento en medio de cultivo

Para evaluar el crecimiento *in vitro* del hongo, las cabezuelas estromáticas en plena descarga de ascosporas se lavaron con detergente en polvo, se enjuagaron con agua destilada estéril, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1.5 % por 2 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las cabezuelas se cortaron con navaja de afeitar esterilizada y las secciones se colocaron en 5 mL de agua destilada estéril. Con el propósito de observar el efecto de tratamiento térmico en la germinación de las ascosporas, una vez verificada su presencia, la muestra se dividió en dos partes iguales utilizando una pipeta Pasteur esterilizada, una parte se sometió a calor (50°C por 3 min), mientras que la otra no tuvo tratamiento térmico. Se tomaron 100 µL de la suspensión de ascosporas de cada tratamiento, y se dispersaron en los siguientes medios de cultivo: 1) papa dextrosa agar (PDA; Bioxon®), 2) agar harina de maíz (AHM; Bioxon®), 3) extracto de malta agar (EMA; Difco®), 4) agar-agar (Difco®), 5) agar-agar con dextrosa (Difco®) y 6) agar (Difco®) con una mezcla de granos de maíz frescos y estigmas. Las cajas se incubaron a 22 °C y se revisaron diariamente para determinar el efecto de los tratamien-

in two equal portions using a sterilized Pasteur pipette. Only one of the portions was thermally treated (50 °C during 3 min). 100 µL of ascospore suspension of each treatment were taken and poured on Petri dishes with the following culture media: 1) potato dextrose agar (PDA; Bioxon®), 2) corn meal agar (AHM; Bioxon®), 3) malt extract agar (EMA; Difco®), 4) agar-agar (Difco®), 5) agar-agar with dextrose (Difco®) and 6) agar (Difco®) with a mixture of fresh maize grains and silks. The dishes were incubated at 22 °C and observed daily to determine the effect of the treatments on *in vitro* fungus germination and development. The experiment was performed under lab conditions based on a factorial design 6x2 (culture medium and thermal treatment) with three replications.

### Morphological-molecular identification

Extraction of total fungal DNA was done using heads and stipes and a QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) extraction kit, according to the manufacturer's protocol (DNeasy® Plant Handbook, 2012). Sequenced DNA samples were KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) and KJ543567 (onesi2). To ensure the quality of the DNA extracted, the samples were placed in 1 % agarose gel and electrophoresed at 88 volts for 30 min. All the DNA extracted was delivered to Macrogen Inc., Korea, for ITS region amplification and simultaneous sequencing with ITS1 primers (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), according to the protocol described by White *et al.* (1990), Glass and Donaldson (1995), and Pazoutová (2001). The amplified fragments were sequenced, and the sequences obtained were stored at NCBI (National Center for Biotechnology Information) to be subsequently compared with sequences available in the data bank with the "Nucleotide

tos en la germinación y el desarrollo del hongo *in vitro*. El experimento se estableció en condiciones de laboratorio siguiendo un diseño factorial 6x2 (medios de cultivo y tratamiento térmico), con tres repeticiones.

### Identificación morfológico-molecular

La extracción del ADN total del hongo se obtuvo de cabezuelas y estípites utilizando el kit de extracción QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Dneasy® Plant Handbook, 2012). Las muestras de ADN secuenciadas fueron KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2). Para verificar la calidad del ADN total, las muestras se colocaron en un gel de agarosa 1 % y se sometieron a electroforesis a 88 volts por 30 min. El ADN total extraído se envió a Macrogen Inc., Korea, para la amplificación de la región del ITS y su secuenciación simultánea utilizando los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGACCTGCGG 3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') de acuerdo con el protocolo descrito por White *et al.* (1990), Glass y Donaldson (1995) y Pazoutová (2001). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se depositaron en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para posteriormente compararlas con las disponibles en el banco de datos, utilizando la herramienta "Nucleotide BLAST". Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas en este estudio fueron comparadas con las reportadas por Pazoutová para *Claviceps gigantea* y *C. sorghi* utilizando el programa Mega 7 y el procedimiento UPGMA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLAST" tool. For the phylogenetic analysis, the sequences obtained in this study were compared with the sequences reported by Pazoutová for *Claviceps gigantea* and *C. sorghi* using the Mega 7 program and according to the UPGMA procedure.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sclerotia germination in the lab

Sclerotia germination was observed only in the treatment containing residual charcoal during a three-month incubation period at 4 °C and a two-month period at 22-24 °C (Figure 3C); for this reason no statistical analysis were performed. The only sclerotia that germinated were the ones which had received the treatment containing residual charcoal during a three-month incubation period at 4 °C and a two-month period at 22-24 °C (Figure 2C); for this reason, no statistical analysis was performed. Under this treatment 55.5 % of sclerotia germinated. Osada (1984) obtained only 47 and 48 primordia of stipes from sclerotia placed at 18 °C that were pre-treated at 4 °C for 8 and 16 d, respectively. Regarding *C. purpurea*, Hadley (1968) reported 50 % germination mostly due to low soil moisture during sclerotia germination. A three-month cold treatment (4°C), residual charcoal moisture and temperature change to 22-24 °C during two months simulated natural field conditions where the sclerotia are found, to facilitate their germination.

For the laboratory experiment, the only substrate that facilitated sclerotia germination was residual charcoal. According to Villamagua *et al.* (2008), in greenhouse tomato experiments (*Solanum lycopersicum* L.), vegetal charcoal added to the soil increased production of tomatoes due to increased soil porosity and structure, as well as N, P, K, Zn,

### Germinación de esclerocios en laboratorio

La germinación de esclerocios se observó únicamente en el tratamiento que contenía carbón residual, con un período de incubación de tres meses a 4 °C y dos meses a 22-24 °C (Figura 3C), por lo que no se realizó análisis estadístico. El 55.5 % de los esclerocios germinaron en este tratamiento. Osada (1984) indica que solamente obtuvo 47 y 48 yemas preformadoras de estípites a partir de esclerocios colocados a 18°C con pretratamiento de 4 °C por 8 y 16 d, respectivamente. En *C. purpurea*, Hadley (1968) reportó una germinación de

Ca, Mg, Mn and Cu availability. These elements may act as nutrients during seed germination and plant nutrition, so they probably had the same effect on sclerotia used in this study.

### Sclerotia germination in the field

From the sample placed in El Rosedal Ranch to determine sclerotia germination in the field, 46 % germination was reported. These germination averages are low but they are similar to those reported by Pazoutová *et al.* (2011), who stated that germination for stromatic heads formation is



**Figura 3.** *Claviceps gigantea*: A) inicio de la germinación donde se observan primordios de las cabezuelas estromáticas 64 d después del establecimiento en campo, B) estípites y cabezuelas estromáticas, C) esclerocios con estípites completamente desarrollados, D) esclerocios con estípites y cabezuelas delgadas y marchitas después de la liberación de ascosporas (Escala 1 cm).

**Figure 3.** *Claviceps gigantea*: A) Germination begins where primordia of stromatic heads are visible 64 days after field establishment; B) stipe and stromatic heads; C) fully developed stipes of sclerotia; D) sclerotia with thin and wilt stipes and heads after ascospores release (1 cm scale).

50%, limitado principalmente por baja humedad en la tierra durante la germinación del esclerocio. El tratamiento en frío (4°C) durante 3 meses, la humedad del carbón residual y el cambio de temperatura a 22 – 24°C por 2 meses simulan las condiciones naturales del campo donde se encuentran los esclerocios, facilitando su germinación.

En el presente experimento en laboratorio, el único sustrato que facilitó la germinación de esclerocios fue el carbón residual. Según Villamagua *et al.* (2008), en trabajos en invernadero con jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), el carbón vegetal añadido al suelo mostró un incremento en la producción de frutos debido al incremento en la porosidad y la estructura del suelo y en la disponibilidad de N, P, K, Zn, Ca, Mg, Mn y Cu, que pueden actuar como nutrientes en la germinación de las semillas y nutrición de la planta, los que probablemente tuvieron el mismo efecto sobre los esclerocios en el presente estudio.

### Germinación de esclerocios en campo

En la muestra colocada en el Rancho El Rosedal para determinar la germinación de esclerocios en campo, se determinó un porcentaje de germinación de 46.6 %. Estos promedios de germinación son bajos, pero coinciden con lo señalado por Pazoutová *et al.* (2011), quienes mencionaron que la germinación para la formación de cabezuelas estromáticas es difícil en la mayoría de las especies de *Claviceps*, ya que requieren diferentes tratamientos para eliminar la dormancia (Kunfer and Seckring, 1977). Entre los tratamientos se observó que las temperaturas bajas tienen efectos importantes en los procesos fisiológicos del esclerocio al aumentar: 1) la absorción del agua proveniente del medio ambiente, 2) aumentar la tasa de respiración y, 3) incrementar el metabolismo de los lípidos almacenados. La presencia de lípidos en el esclerocio

difficult in most of the *Claviceps* species given that different treatments to stop dormancy are required (Kunfer and Seckring, 1977). The study showed that, among treatments, low temperatures have important effects on the physiological processes of sclerotia because they increase 1) absorption of water from the environment; 2) respiration rate, and 3) metabolism of stored lipids. The presence of lipids in sclerotia suggests that just after, or during, the cold activation treatment, enzymes are activated that hydrolyze lipids probably to convert them into manitol (Mitchell and Cooke, 1968).

In the field, emergence of primordia in sclerotia was observed after 3 months of incubation at 4 °C and 64 d after sclerotia were placed in the field at 14 °C average temperature, 76 % relative humidity and 705 mm accumulated precipitation during June-September 2013 (Figure 3A). Fully developed structures were observed 23 d after primordia emergence (Figure 3B). For the municipality of Almoloya de Juárez, Mucikovskiy and Moreno (1971) reported 13-15 °C annual temperature and 1000 mm annual precipitation when they observed horse's tooth in the State of Mexico, while in this study the annual average relative humidity was 65.26 % and total accumulated precipitation was 832.8 mm. According to Cooke and Mitchell (1967), in nature it takes around one week from germination of *C. purpurea* sclerotia to stromal maturity.

In the field, when maize is harvested, between autumn and winter, sclerotia fall down. From autumn to spring, sclerotia are exposed to low temperature and frequent frosts for a 6-9 month period. At the end of this period, temperature and moisture increase, and the host is available; this means the life cycles of the pathogen and host are synchronized, allowing disease development.

### Stipe emergence and development, and head

sugiere que inmediatamente después, o durante el tratamiento de activación por frío, se activan enzimas que hidrolizan los lípidos posiblemente para su conversión en manitol (Mitchell y Cooke, 1968).

En el campo, la aparición de primordios en los esclerocios se observó después de 3 meses de incubación a 4 °C y 64 d después de que se colocaron en el campo a temperatura promedio de 14° C, humedad relativa de 76 % y una precipitación acumulada de 705 mm durante junio-septiembre, 2013 (Figura 3A). Las estructuras completamente desarrolladas se observaron 23 d después de aparecer los primordios (Figura 3B). Fucikovsky y Moreno (1971) reportaron una temperatura anual en el municipio de Almoloya de Juárez de 13-15 °C y una precipitación anual de 1000 mm cuando observaron el diente de caballo en el estado de México, mientras que en el presente estudio la humedad relativa promedio anual fue 65.26 % y la precipitación acumulada total fue 832.8 mm. Según Cooke y Mitchell (1967), en la naturaleza transcurre aproximadamente una semana desde los inicios de la germinación de los esclerocios de *C. purpurea* a la maduración de los estromas.

En campo, al final de la cosecha del maíz, los esclerocios caen al suelo entre el otoño y el invierno. Desde el otoño hasta primavera, los esclerocios están expuestos a temperaturas bajas y heladas frecuentes por un período de 6 a 9 meses. Al terminar éste período, la temperatura y humedad aumentan y el hospedante se encuentra disponible, sincronizando el ciclo biológico del patógeno y el hospedante para el desarrollo de la enfermedad.

#### **Tiempo de emisión y desarrollo de estípites y formación de cabezuelas**

Los primeros indicios de germinación de los esclerocios, tanto en laboratorio como en campo, fue

#### **formation**

The first signs of sclerotia germination, both in the lab and the field, were emergence of stromatic heads five months after the experiment began (three months at 4 °C and two at 22-24 °C) (Figure 3A). Primordia emerges from sclerotia in the form of light colored globose protuberances. The germination period was at least 6 months faster than the period reported by De la Isla and Fuentes (1963) and Fuentes *et al.* (1964), who observed *C. gigantea* sclerotia germination after 12 months under an alternate temperature treatment (4-2 °C and 22-28 °C from 1 to 2 periods of 8 months) and constant periods (12 °C during 4 months in darkness).

Cooke and Mitchell (1967) mentioned that in nature the inoculum potential of sclerotia populations depends on the number of heads produced, which is related to the size of the sclerotium. In this study sclerotia produced from three to nine heads, with an average of five heads per sclerotium. Protuberances were constrained to the base to form the body of the stipe. Stromatic heads were formed on the tip of the stipe and matured after 15 days under lab conditions, and 23 days in the field, after primordia emergence (Figures 3B and C). As the stromatic head matured, its color changed from light to dark brown; it also showed points or papilla that were actually the ostioles of the perithecia immersed in the head, from which they protruded slightly. These observations were similar to germination of *C. purpurea*, *C. sorghicola* and *C. africana* described by Hadley (1968), Loveless and Peach (1986) and Tsukiboshi *et al.* (2001).

We observed that the germination of sclerotia and the formation of primordia, stipes and heads are not synchronized, which suggests that ascospores are released over a long period of time (Figure 3D)

la observación de los primordios de las cabezuelas estromáticas que ocurrió cinco meses después de iniciado el experimento (tres meses a 4 °C y dos a 22-24 °C) (Figura 3A). Los primordios se observaron cómo protuberancias globosas de color claro emergiendo de los esclerocios. Este tiempo de germinación fue al menos 6 meses más rápido comparado con el reportado por De la Isla y Fuentes (1963) y Fuentes *et al.* (1964), quienes observaron la germinación de esclerocios de *C. gigantea* después de 12 meses con un tratamiento de temperatura alternada (4- 2 °C y de 22-28 °C, por períodos de una a dos semanas por 8 meses) y constante (12 °C por 4 meses en oscuridad).

Cooke y Mitchell (1967), mencionan que en la naturaleza el potencial de inóculo de una población de esclerocios depende del número de cabezuelas que puede producir lo cual se relaciona con el tamaño del esclerocio. En el presente estudio los esclerocios produjeron de tres a nueve cabezuelas, con un promedio de cinco por esclerocio. Las protuberancias se constriñeron en la base para formar el cuerpo del estípite. En la punta del estípite se formaron cabezuelas estromáticas que maduraron después de 15 d en condiciones de laboratorio y 23 d en campo, después de la aparición de los primordios (Figuras 3B y C). Durante el proceso de maduración de la cabezuela estromática ésta mostró un cambio en la coloración de café claro a oscura y la presencia de puntos o papilas que correspondían a los ostiolos de los peritecios inmersos en la cabezuela de la que sobresalen ligeramente. Estas observaciones son similares al proceso de germinación de esclerocios de *C. purpurea*, *C. sorghicola* y *C. africana* descritas por Hadley (1968), Loveless y Peach (1986) y Tsukiboshi *et al.* (2001).

Se observó que los esclerocios no tienen sincronización en su germinación, formación de primordios, estípites ni cabezuelas, lo que sugiere que existe un amplio rango de tiempo en la libera-

### Ascospore production and release

For the first time, it was possible to record ascospore release using (Sony Cyber-shot (modelo DSC-W120) (Figure 4). Under a stereoscopic microscope, we observed ascospores emerging from the ostioles of the perithecia; they were very thin, long structures that floated in space due to their lack of weight or, possibly, to geotropism.

According to Loveless and Peach (1986), *C. purpurea* ascospores can be easily observed floating in the air over the stromatic head. Lutrell (1977) and Prakash *et al.* (1983) reported that they observed *C. paspali* and *C. fusiformis* ascospores discharge under the microscope by focusing on the ostioles of the perithecia (Figure 4), while Pazoutová and Parbery (1999) also observed asci tips emerging from ostioles. Ascomycetes are able to discharge ascospores either by ejecting them into the air several centimeters away or exuding them slowly as a mucilaginous mass accumulated around the ostiole (Loveless y Peach, 1986).

No ascospores were observed on inverted sclerotia immersed in distilled water for night monitoring. When germinated and differentiated stromas in the stipe and strome were inversely placed into bottles, the structures turned dark and porous, and stopped their normal development and maturity. However, no ascospores were captured on slides with lactophenol cotton blue stain or distilled water even when the distance between heads and slides was only about 10 cm.

According to outputs of this study, *C. gigantea* germination, formation of stipes, perithecia and ascae, and ascospores release, took about 175 days.

### Ascospores growth in culture medium

No growth was observed in the 6 media used in this study (PDA, AHM, EMA, AA, AAD and

ción de ascosporas (Figura 3D).

### Producción y descarga de ascosporas

Se logró grabar por primera vez en video (Sony Cyber-shot (modelo DSC-W120) (Figura 4F) la liberación de ascosporas. En microscopio este-reoscópico se observó la liberación de ascosporas emergiendo de los ostiolos de peritecios como estructuras muy delgadas y alargadas que flotaban en el espacio, debido a su falta de peso o un posible fenómeno de geotropismo.

Según Loveless y Peach (1986), las ascosporas de *C. purpurea* se observan a simple vista en el aire sobre la cabezuela estromática. Lutrell (1977) y Prakash *et al.* (1983) reportaron la descarga de ascosporas de *C. paspali* y *C. fusiformis* directamente con un microscopio, enfocando en los ostiolos de los peritecios (Figura 4C), mientras que Pazoutová y Parbery (1999) también observaron las puntas de las ascas emergiendo del ostiolo. Los ascomicetos pueden descargar las ascosporas ya sea expulsándolas al aire a una distancia de varios centímetros o son lentamente exudadas en una masa mucilaginosa acumulada alrededor del ostiolo (Loveless y Peach, 1986).

No se observaron ascosporas de los esclerocios invertidos con agua destilada estéril en la base que se utilizaron para el monitoreo nocturno. Cuando los estromas germinados y diferenciados en estípites y estroma se colocaban invertidos en los frascos, estas estructuras tomaban un color oscuro y una apariencia rugosa sin continuar su desarrollo normal y madurez. Sin embargo, no se logró captura de ascosporas en portaobjetos con azul de lactofenol o agua destilada aun cuando la distancia entre las cabezuelas y los portaobjetos fue de aproximadamente 10 cm.

De acuerdo con los resultados de éste estudio, en *C. gigantea* el proceso de germinación, forma-

Agar-Maize) and the thermal treatment at 50 °C. Deacon (2006) states that for ascospores *in vitro* germination and growth some stimulants are needed, such as carbohydrates and heat shocks to interrupt ascospores dormancy and induce germination. However, in this study we were not able to obtain pure crops from ascospores.

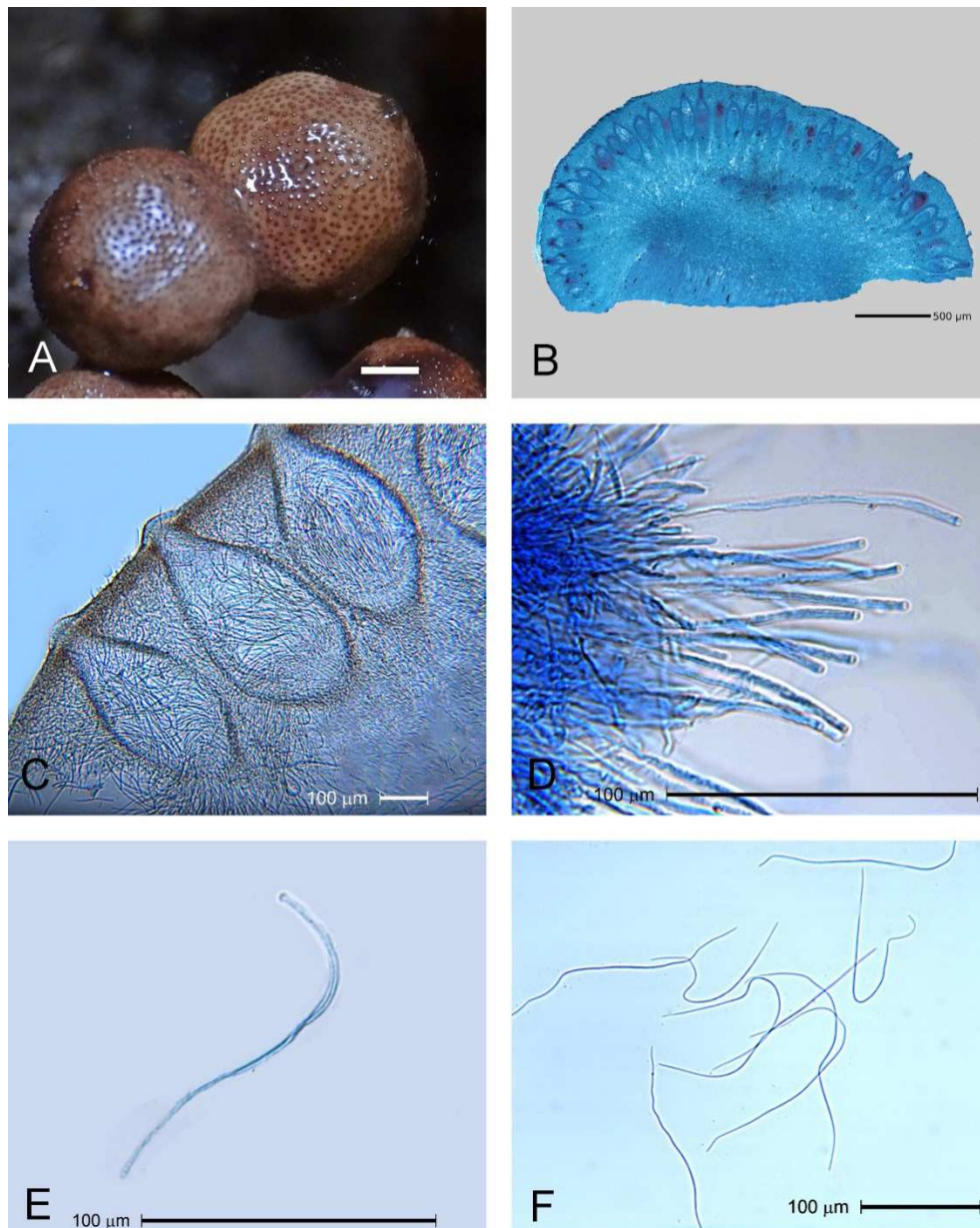
### Morphological and molecular identification

Longitudinal sections of fine sections of heads showed a number of pyriform perithecia embedded in the peripheral region of the tissue. Perithecia showed asci, paraphyses and ascospores. Perithecia ostioles reached the head surface (Figures 4A, B). Pazoutová and Parbery (1999) stated that the size and form of perithecia depend on their maturity level. Young perithecia are small, oblong-to-oval shaped, while old perithecia are often elipsoidalto-pyriform; these features are also shown in this study (Figure 4B).

Measurements of perithecia (Figure 4C) were 404.9-569.3 x 151.3-284.4 µm, with 187-265.3 µm long asci containing 8 ascospores of 169.6-263.7 x 1.0-2.1 µm. The size of these structures was larger than the one reported by Fuentes *et al.* (1964). According to Loveless (1964) and Pazoutová and Parbery (1999), the length of stringy ascospores of the *Claviceps* genus is a taxonomically reliable attribute, provided that measures are taken soon after they are ejected from asci (Figures 4E, F). The size of perithecia is also taxonomically reliable because it is a constant characteristic of mature stromas (Loveless, 1967).

The sequence analysis of the partial region of the 18s gen, full ITS1, full 5.8s, full ITS2 and partial 28s, showed that the four sequences stored in NCBI No. KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) and KJ543567 (onesi2) are 99 % identical to AJ133394.2 (*Claviceps gigantea*





**Figura 4.** Estructuras sexuales resultado de la germinación de esclerocios en condiciones de laboratorio. Cortes longitudinales de cabezuelas estromáticas muestran: A) Peritecios con diferente grado de desarrollo, B) Peritecios con ascas y ascosporas teñidos con azul de lactofenol, C) Ascas intercaladas con parafisos, D) Ascas con ascosporas y E) Ascosporas expulsadas de los peritecios.

**Figure 4.** Sexual structures from sclerotia germination under lab conditions. Stromatic head longitudinal cuts show: A) Perithecia with different development level; B) Perithecia with asci and ascospores stained with lactophenol cotton blue; C) Asci interspersed with paraphyses; D) Asci with ascospores; and E) Ascospores ejected from perithecia.

ción de estípites, cabezuelas estromáticas, peritecios, ascas y hasta la expulsión de las ascosporas se logró en un total de aproximadamente 175 d.

### **Crecimiento de ascosporas en medio de cultivo**

No se observó ningún crecimiento en los 6 medios probados en este estudio (PDA, AHM, EMA, AA, AAD y Agar-Maíz) y el tratamiento térmico a 50 °C. Deacon (2006) mencionó que para la germinación de ascosporas y su crecimiento *in vitro* son necesarios algunos estímulos como, la presencia de carbohidratos y los choques de calor para interrumpir la dormancia de las ascosporas e inducir su germinación, pero en el presente estudio no se logró obtener cultivos puros a partir de ascosporas.

### **Identificación morfológico - molecular**

Las secciones longitudinales de los cortes hechos a mano y los cortes finos de las cabezuelas revelaron numerosos peritecios piriformes embebidos en la región periférica del tejido. En los peritecios se observaron ascas, parafisos y ascosporas. El ostiolo de los peritecios alcanzaba la superficie de la cabezuela (Figuras 4A, B). Pazoutová y Parbery (1999) mencionaron que el tamaño y forma de los peritecios dependen de su grado de madurez. Los peritecios jóvenes son pequeños, oblongos a ovales, mientras que los maduros generalmente son elipsoides a piriformes, lo que igualmente se muestra en los resultados del presente estudio (Figura 4B).

Los peritecios (Figura 4C) midieron de 404.9-569.3 x 151.3-284.4 µm, con ascas de 187-265.3 µm de largo, que contenían 8 ascosporas de 169.6-263.7 x 1.0-2.1 µm. Las dimensiones de éstas estructuras observadas fueron mayores a las reportadas por Fuentes *et al.* (1964). Según Loveless (1964) y Pazoutová y Parbery (1999),

Pazoutová). The five samples were compared with *Claviceps sorghi* from another phylogenetic group (Figure 5) (Pazoutová, 2001). Both characteristics, morphological and molecular, confirmed the *Claviceps gigantea* species. Fuentes, De la Isla, Ullstrup and Rodríguez.

### **CONCLUSIONS**

- In the lab, sclerotia germination and formation of stipes was achieved after incubation using residual carbon for 90 days at 4 °C and 60 d at 22 °C, formation of heads in 15-23 d, and ascospores release in 15 d.
- The germination of sclerotia, formation of reproductive structures and ascospores release are not synchronized
- There was no effect using temperature treatments or culture medium in ascospores germination. For the first time, it was possible to electronically record ascospore release (video).
- Morphological and molecular characteristics contributed to identify the fungus as *C. gigantea*.
- From the DNA sequences obtained from the sexual structures, from DNA analysis (AJ133394.2), the identity of *C. gigantea* at molecular level was confirmed; this first report was delivered to the Gene Bank.
- These results will facilitate the establishment of integrated management programs and the study of the life cycle of the pathogen.

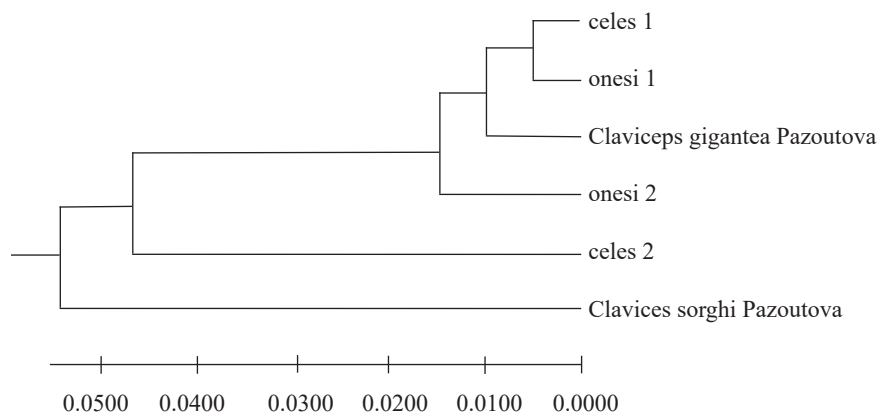
~~~~~ End of the English version ~~~~~

la longitud de las ascosporas filiformes del género *Claviceps* es un carácter taxonómico confiable, condicionado a que las medidas se realicen después de ser expulsadas del asca (Figuras 4E, F). El tamaño de los peritecios también se considera otro criterio taxonómico confiable, ya que es un carácter constante de un estroma maduro (Loveless, 1967).

El análisis de la secuencia de la región parcial del gen 18s, ITS1 completo, 5.8s completo, ITS2 completo y parcial del 28s, mostró que las cuatro secuencias depositadas en NCBI No. KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2) tienen un porcentaje de identidad de 99 % con AJ133394.2 (*Claviceps gigantea* Pazoutová). Estas cinco muestras se compararon contra *Claviceps sorghi* que perteneció a otro grupo filogenético (Figura 5) (Pazoutová, 2001). Tanto las características morfológicas (Fuentes *et al.*, 1964) como moleculares confirmaron la especie como *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez.

## CONCLUSIONES

- En laboratorio, se logró la germinación de esclerocios y formación de estípites después de incubación en carbón residual por 90 d a 4 °C y 60 d a 22 °C, formación de cabezuelas en 15-23 d y liberación de ascosporas en 15 d.
- No se encontró sincronización en la germinación de esclerocios, formación de estructuras reproductivas y liberación de ascosporas.
- No hubo efecto del tratamiento con temperaturas ni medios de cultivo en la germinación de las ascosporas.
- Por primera vez, la expulsión de ascosporas en esta especie se documentó electrónicamente (en video).
- Las características morfológicas y moleculares permitieron identificar al hongo como *C. gigantea*.



**Figura 5.** Relación filogenética de secuencias de cuatro muestras de ADN de *C. gigantea* comparadas con las secuencias de *C. gigantea* y *C. sorghi* reportadas previamente por Pazoutová (2001) en el NCBI.

**Figure 5.** Phylogenetic relation of the sequences of four *C. gigantea* DNA samples compared with sequences of *C. gigantea* and *C. sorghi* previously reported by Pazoutová (2001) at NCBI.

- De las secuencias de ADN que se obtuvieron a partir de las estructuras sexuales, en los análisis de ADN (AJ133394.2) se confirmó la identidad de *C. gigantea* a nivel molecular; este primer reporte quedó consignado en el Banco de Genes.
- Estos resultados facilitarán el establecimiento de programas de manejo integrado de la enfermedad y el estudio de la biología del patógeno.

## LITERATURA CITADA

- Aguere, S. L., Ramstad, E., and Ullstrup, A. J. 1963. The alkaloids of maize ergot. *Planta Medica* 11: 392-398. DOI: 10.1055/s-0028-1100254
- CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1974. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Kew, Surrey, England. 267 p.
- Cooke, R. C., and Mitchell, D. T. 1967. Germination pattern and capacity for repeated stroma formation in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50:275-283. DOI: 10.1016/S0007-1536(67)80038-X
- Cunfer, B. M., and Seckinger, A. 1977. Survival of *Claviceps purpurea* and *C. paspali* sclerotia. *Mycologia* 69: 1142-1148. DOI: 10.2307/3758937
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal Biology*. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publ. England. 384 p.
- De la Isla, Ma. L. y Fuentes F., S. 1963. Germinación de esclerocios de *Sphacelia* sp., causante del "Diente de caballo" en el maíz. *Agric. Téc.* 3:119.
- Dneasy plant handbook Qiagen. 2012. Protocolo del proveedor. p. 22-2 <http://www.qiagen.com/knowledgeandsupport/resourcecenter/resourcedownload.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=e> (Consulta: enero 2014)
- Fucikovskiy, L. y Moreno, M. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the State of México, México. *Plant Dis. Repr.* 55:231-233. <http://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015001262727;view=lup;seq=11>
- Fuentes F, S. y De la Isla, Ma. de L. 1961. Una enfermedad desconocida del maíz el "Diente de caballo". *Agric. Téc.* 12:11-12.
- Fuentes, S. F., De la Isla, M. de L., Ullstrup, A. J., and Rodríguez, A. E. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in México. *Phytopathology* 54:379-381.
- Glass, N. L., and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167388/pdf/611323.pdf>
- Hadley, G. 1968. Development of stromata in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51: 763-769.
- Kulkarni, U. K. 1963. Initiation of the dikaryon in *Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. pp:19-22. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02053250>
- López, C. M. L., Márquez, J. y Murguía, G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. 2<sup>a</sup> ed. Fac. de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Loveless, A. R. 1964. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47:205-213. DOI: 10.1016/S0007-1536(64)80054-1
- Loveless, A. R. 1967. A new species of *Claviceps* on *Cyperaceae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50:19-22. DOI:10.1016/S0007-1536(67)80059-7
- Loveless, A. R., and Peach, J. M. 1986. Evidence from ascospores for host restriction in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 86:603-610. DOI:10.1016/S0007-1536(86)80063-8
- Luttrell, E. S. 1977. The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot. *Phytopathology* 67:1461-1468. DOI: 10.1094/Phyto-67-1461.
- Mitchell, D. T. and Cooke, R. C.. 1968. Water uptake, respiration pattern and lipid utilization in sclerotia of *Claviceps purpurea* during germination. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51:731-736. DOI:10.1016/S0007-1536(68)80093-2
- Moreno M. y Fucikovskiy, L. 1972. Efecto de la posición y el número de esclerocios de *Claviceps gigantea* sobre la germinación de granos de maíz. *Fitopatología* 5:7-9.
- Osada-K., S. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción-hospedante parásito (*Zea mays* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). Tesis doctoral. Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 86p.
- Osada, S. K., Fucikovskiy, Z. L., Ortega D., M. L. y Engleman, E. M. 1986. Estudio sobre la germinación del diente de caballo del maíz e interacción hospedante – parásito (*Zea mays* L. *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). *Agrociencia* 66:57-69.
- Pazoutová, S. 2001. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. *Mycol. Res.* 105:275-283. DOI:10.1017/S0953756201003562
- Pazoutová, S., and Parbery, D. P. 1999. Ergot: the genus *Claviceps*: The taxonomy and phylogeny of *Claviceps*. *Hardwood Acad. Publ., London.* 499 p.
- Pazoutová, S., Odvody, G. N., Frederickson, D. E., Chudíková, M., Olsovska, J., and Kolarik, M. 2011. New *Claviceps* species from warm-season grasses. *Fungal Diversity* 49:145-165. DOI:10.1007/s13225-011-0102-4
- Pedroza-Sandoval, A. 2010. Epidemiología fitosanitaria. Univ. Autónoma Chapingo. pp. 1-28.
- Prakash, H. S., Shetty, H. S., and Safeulla. K. M. 1983. Germination and nuclear behavior of sexual and asexual propagules of *Claviceps fusiformis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81:65-69. <http://eurekamag.com/research/005/522/005522683.php>
- SAGARPA-SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Producción Nacional de Maíz en Grano. Consultado en: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx).
- Tsukiboshi, T., Shimanuki, T., and Koga, H. 2001. *Claviceps sorghicola* and *C. africana*, the ergot pathogens of sorghum, and their cultural control

- in Japan. Japan Agric. Res. Quart. 35:221-226. <https://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/35-4/35-04-02.pdf>
- Villamagua M, A., Loaiza, C., E. R. y Naula, A., P. E. 2008. Efecto del carbón vegetal en las propiedades físicas-químicas del suelo en cultivo de tomate de mesa *Solanum lycopersicum* L. bajo invernadero. Estudios Universitarios. Rev. Cient. (Ecuador) 8:85-100. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/362>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p:315-322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

# Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico

## Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas y viveros de ornamentales en Culiacán, México

Álvarez-Rodríguez Brando, Carrillo-Fasio José Armando, García-Estrada Raymundo Saúl, Allende-Molar Raúl\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. CIAD AC. Área de Horticultura. Km 5.5 Carr. Culiacán-Eldorado, Campo El Diez. Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110 Tel. 6677605536; Santos-Cervantes María Elena. Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquin, Guasave, Sinaloa. CP 81101 Tel. 6878729626. Correo electrónico: msantos@ipn.mx. \*Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 06 de mayo de 2016

Aceptado: 08 de julio de 2016

Álvarez-Rodríguez B, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Santos-Cervantes ME. Characterization of *Phytophthora nicotianae* causing vinca blight in urban areas and ornamental nurseries in Culiacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 242-257.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-1)

Primera publicación DOI: 12 de Julio, 2016.

First DOI publication: July 12, 2016.

**Resumen.** Los objetivos de este estudio fueron obtener y caracterizar, mediante técnicas morfológicas y moleculares, aislados de *Phytophthora* asociados con tizón en plantas de vinca en áreas urbanas y viveros en Culiacán, México, determinar los tipos de compatibilidad sexual y evaluar la patogenicidad de los aislados. Los aislados desarrollaron micelio cenocítico y colonias algodonosas de color blanco en agar V8; clamidosporas (20 µm) intercalares y terminales, y esporangios papi-

**Abstract.** The aims of this study were to obtain and characterize, by morphological and molecular techniques, *Phytophthora* isolates associated with blight symptoms on vinca plants in urban areas and nurseries in Culiacan, Mexico, determine the mating types and evaluate the pathogenicity of isolates. Isolates developed white and cottony colonies with coenocytic mycelium on V8 agar; intercalary and terminal chlamydospores (20 µm) and papillate sporangia, round or oval (34.16 µm and 26.35 µm). The isolates were heterothallic: 21 isolates resulted A1 type and 18 isolates were A2 type. A group of representative isolates showed pathogenicity and caused vinca blight incidence between 13 and 66 %. The identity of the isolates was confirmed by analysis of nucleotidic sequences of the ITS region and nuclear genes as elongation factor (TEF-1 $\alpha$ ) and beta tubulin ( $\beta$ -Tub). The sequences, compared to the NCBI database, showed a high degree of identity with *P. nicotianae* (ITS, 98-100%; TEF-1 $\alpha$ , 99-100%;  $\beta$ Tub, 98-100%) and phylogenetically

lados redondos a ovales (34.16  $\mu\text{m}$  y 26.35  $\mu\text{m}$ ). Los aislados fueron heterotálicos: 21 del tipo de compatibilidad A1 y 18 del tipo A2. Un grupo de aislados representativos mostraron patogenicidad y causaron incidencia de tizón en vinca entre 13 y 66 %. La identidad de los aislados se confirmó por análisis de secuencias nucleotídicas de las regiones ITS y de los genes nucleares factor de elongación (TEF-1 $\alpha$ ) y beta tubulina ( $\beta$ -Tub). Las secuencias, comparadas con la base de datos del NCBI, mostraron alto grado de identidad con *P. nicotianae* (ITS, 98-100 %; TEF-1 $\alpha$ , 99-100 %;  $\beta$ Tub, 98-100 %) y se agruparon filogenéticamente con cepas de referencia. La utilización de oligonucleótidos específicos resultó en una amplificación positiva para los aislados evaluados. Este es uno de los pocos estudios relacionado con enfermedades en plantas ornamentales en áreas urbanas en México.

**Palabras clave:** Oomicetes, enfermedades de plantas ornamentales, heterotalismo

El género *Phytophthora*, dentro de los oomicetes, incluye un grupo diverso de microorganismos fitopatógenos destructivos que infectan un amplio rango de hospedantes y causan considerables pérdidas económicas en ambientes naturales y agrícolas en todo el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996). Más de 100 especies de *Phytophthora* han sido descritas (Martin *et al.*, 2012); algunas especies, son altamente especializadas a un hospedante y otras especies, como por ejemplo *P. nicotianae*, tienen un amplio rango de hospederos en cultivos agrícolas y plantas ornamentales.

*Vinca rosea* (L.) es una planta herbácea, también identificada como *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Es ornamental, resistente a altas temperaturas, humedad, sequía e infertilidad de suelos (Schubert y Leahy, 1989). Es ampliamente utilizada como planta de jardín y actualmente existen más

clustered with reference strains. The utilization of specific primers resulted in a positive amplification for the isolates tested. This is one of the few studies on plant diseases affecting ornamental plants in urban areas in Mexico.

**Keywords:** Oomycetes, ornamental plant diseases, heterothallism

The genus *Phytophthora*, within the oomycetes, includes a diverse group of destructive phytopathogenic microorganisms that infect a wide range of hosts and cause considerable economic losses in natural and agricultural environments worldwide (Erwin and Ribeiro, 1996). Over 100 species of *Phytophthora* have been described (Martin *et al.*, 2012); some species are highly specialized to one host and others, such as *P. nicotianae*, have a wide range of hosts in agricultural crops and ornamental plants.

*Vinca rosea* (L.) is a herbaceous plant, also identified as *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. It is ornamental, resistant to high temperatures, moisture, drought, and soil infertility (Schubert and Leahy, 1989). It is widely used as a garden plant and there are currently more than 100 hybrids developed (McGovern and Begeman, 1996). In addition, vinca plants have been identified as secondary hosts for many pathogenic microorganisms such as viruses, fungi, and oomycetes (Hagan, 2004), which affect fruit and vegetable crops such as papaya, tomato, peppers, and cucumber, among others (Haider *et al.*, 2007).

The disease known as blight and wilting in *V. rosea* plants is caused by *Phytophthora* spp., it progresses quickly and is present in warm and humid climates, particularly in summer, when humidity is high (Hao *et al.*, 2010). The symptoms of the disease begin with a gray color in the tips of infected tissues, which quickly become necrotic.

de 100 híbridos desarrollados (McGovern y Begeman, 1996); adicionalmente, las plantas de vinca se han identificado como hospedantes secundarios para muchos microorganismos fitopatógenos como virus, hongos y oomicetes (Hagan, 2004), los cuales afectan cultivos hortofrutícolas como papaya, tomate, chile y pepino, entre otros (Haider *et al.*, 2007).

La enfermedad conocida como tizón y marchitamiento en plantas de *V. rosea* es causada por *Phytophthora* spp., progresa rápidamente y se presenta en climas cálidos y húmedos especialmente en el verano cuando la humedad es alta (Hao *et al.*, 2010). Los síntomas de la enfermedad inician con una coloración gris en las puntas de los tejidos infectados, los cuales gradualmente se necrosan. Las lesiones progresan rápidamente y ocasionan un marchitamiento general de la planta (McGovern y Begeman, 1996). Varias especies, entre las que se incluyen *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. crypto-gea* y *P. tropicalis*, se han descrito como causantes de tizón y marchitez en plantas de vinca (McGovern y Begeman, 1996; McMillan y Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010).

La identificación y caracterización de *Phytophthora* spp. se basa principalmente en características morfológicas (Waterhouse, 1963): tipo de micelio, forma, tamaño y desarrollo de esporangios, producción de estructuras de reproducción sexual, así como la formación de clamidosporas (Pintos *et al.*, 2004). Debido a la variación morfológica intraespecífica, la identificación exacta de aislados es con frecuencia difícil, incluso para los especialistas. Por esta razón, las técnicas moleculares que analizan secuencias genéticas han ayudado a la identificación y delimitación de especies. En oomicetes, las regiones genómicas más comúnmente utilizadas para la identificación, a nivel de especie, son la región espaciadora interna transcrita (ITS) (Cooke *et al.*, 2000) y algunas regiones codifican-

Lesions progress quickly and cause a general wilting of the plant (McGovern and Begeman, 1996). Various species, including *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. crypto-gea*, and *P. tropicalis*, have been described as causing blight and wilting in vinca plants (McGovern and Begeman, 1996; McMillan and Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010).

The identification and characterization of *Phytophthora* spp. is based mainly on morphological characteristics (Waterhouse, 1963): type of mycelia, shape, size, and development of sporangia, production of sexual reproduction structures, as well as the formation of clamidospores (Pintos *et al.*, 2004). Due to the intraspecific morphological variation, the exact identification of isolates is frequently difficult, even for specialists. For this reason, the molecular techniques that analyze genetic sequences have helped to identify and demarcate species. In oomycetes, the genomic regions most commonly used for identification at the species level, are the internal transcribed spacer (ITS) (Cooke *et al.*, 2000) and some codifying regions of molecular genes, that include the factor of elongation 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) and beta tubulin ( $\beta$ -Tub) (Kroon *et al.*, 2004). Another promising region to develop specific oligonucleotides for species of *Phytophthora* is the gene YPT1 related to a RAS protein (Meng and Wang, 2010), since the non-codifying regions of this gene have displayed enough variation support the development of molecular markers for almost all the species of *Phytophthora* (Schena and Cooke, 2006).

In Culiacán, Sinaloa, ornamental vinca plants are common in parks and/or boulevard strips, home gardens, and ornamental nurseries. During the rainy season in the summer (June-August), it is common to find in plants symptoms of leaf blight and wilting. A previous report mentions the presence of *P. nicotianae* in vinca causing blight



tes de genes nucleares, que incluyen el factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) y beta tubulina ( $\beta$ -Tub) (Kroon *et al.*, 2004). Otra región prometedora para desarrollar oligonucleótidos específicos para especies de *Phytophthora* es el gen YPT1 relacionado con una proteína RAS (Meng y Wang, 2010), ya que las regiones no codificantes de este gen han mostrado suficiente variación para fundamentar el desarrollo de marcadores moleculares para casi todas las especies de *Phytophthora* (Schena y Cooke, 2006).

En Culiacán, Sinaloa, las plantas ornamentales de vinca son comunes en parques y/o camellones urbanos, jardines en casas y viveros de plantas ornamentales. Durante la época de lluvia en verano (junio-agosto) es común observar en las plantas síntomas de tizones de hoja y marchitez. Un reporte previo menciona la presencia de *P. nicotianae* en vinca causando tizón (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013); sin embargo, se desconoce si es la única especie por lo que los objetivos de este estudio fueron obtener y caracterizar, mediante técnicas morfológicas y moleculares, las especies de *Phytophthora* asociadas al tizón en plantas de vinca, determinar los tipos de compatibilidad sexual y evaluar la patogenicidad en los aislados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del agente causal de tizón y marchitez en vinca

Se colectaron muestras de plantas enfermas creciendo en jardines urbanos y viveros de plantas ornamentales en Culiacán. Muestras de tejidos infectados se colocaron en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio para realizar el aislamiento de las especies de *Phytophthora* asociadas a la enfermedad. En el laboratorio, pequeñas porciones

(Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2013); however, we are not sure if it is the only species, therefore the aims of this study were to find and characterize, using morphological and molecular techniques, the species of *Phytophthora* related to blight in vinca plants, to determine the types of sexual compatibility, and to evaluate the pathogenicity in the isolations obtained.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of the causal agent of blight and wilting in vinca

Samples of diseased plants were taken from urban gardens and ornamental nurseries in Culiacan. Samples of infected tissues were placed in plastic bags and taken to the laboratory to isolate the *Phytophthora* species related to the disease. In the lab, small portions of infected plant tissue were washed with distilled water, disinfected with sodium hypochlorite at 0.5 % for 1 min and finally placed in Petri dishes with a V8 agar culture medium (840 ml distilled water, 163 ml V8 juice, 3 g of CaCO<sub>3</sub> and 18 g bacteriological agar), which were kept at room temperature for 72 h.

### Morphological characterization

The isolations were reactivated in a V8 agar culture medium. Once the mycelium developed, permanent preparations were made using lactophenol and placed for observation under a microscope (Carl Zeiss Axiostar Imager A2). Each isolation was purified with the technique of transference of hyphal tips (Donahoo and Lamour, 2008). To induce the growth of sporangia, cuts were made on the colony under growth and the plate was flooded with sterile distilled water. The plates were

de tejido vegetal infectado se lavaron con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5 % por 1 min y finalmente se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo agar V8 (840 ml de agua destilada, 163 ml de jugo V8, 3 g de CaCO<sub>3</sub> y 18 g de agar bacteriológico), las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente por 72 h.

### Caracterización morfológica

Los aislados se reactivaron en medio de cultivo agar V8, una vez que se desarrolló el micelio, se realizaron preparaciones permanentes con lactofenol y fueron observadas en un microscopio (Carl Zeiss AxioStar Imager A2). La purificación de cada aislado se realizó mediante la técnica de transferencia de puntas de hifa (Donahoo y Lamour, 2008). Para inducir el desarrollo de esporangios, se realizaron cortes en la colonia en crecimiento y la placa se inundó con agua destilada estéril. Las placas se incubaron por 3 días a temperatura ambiente (Martin *et al.*, 2012). La presencia de esporangios fue revisada en un microscopio biológico adaptado con una cámara, una vez que se produjeron los esporangios se retiró el agua y se agregó a las placas fucsina acida al 2% para teñirlos. Después de 24 h se tomaron muestras y se observaron al microscopio para registrar las medidas de esporangios y otras estructuras.

La presencia de clamidosporas se observó en medio a base de zanahoria (200 g de zanahoria, 20 g de agar bacteriológico y 1 L de agua destilada). Los aislados crecieron en el medio a base de zanahoria y se incubaron por 15 días a 25 °C en la oscuridad (Mirsoleimani y Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2013); después de este tiempo, las observaciones se realizaron bajo el microscopio para registrar la presencia y tamaño de las clamidosporas.

Para determinar el tipo de compatibilidad y registrar la formación de estructuras de reproducción

incubated for 3 days at room temperature (Martin *et al.*, 2012). The presence of sporangia was observed under a biological microscope adapted with a camera. Once the sporangia were produced, the water was removed and acid fuchsin was added to the plates at 2 % to stain them. Samples were taken after 24 h and observed under the microscope to record the measurements of sporangia and other structures.

Chlamydospores were observed in a carrot-based medium (200 g of carrot, 20 g of bacteriological agar, and 1 L of distilled water). The isolates grew in the carrot-based medium and were incubated for 15 days at 25 °C in the dark (Mirsoleimani and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2013); after this time, they were observed under the microscope and the presence and size of chlamydospores were recorded.

To determine the type of compatibility and record the formation of structures of sexual reproduction, each isolate was confronted with reference strains A1 and A2 of *P. nicotianae* in V8 culture medium; an agar disc with mycelia in active growth of each isolate, 0.5 cm in diameter, was placed approximately 1 cm away from agar discs with mycelia in active growth of reference strains A1 and A2 of *P. nicotianae*. The plates were incubated for 15 days at 25 °C and then the presence/absence of oospores was recorded, as well as the characteristics of oogonia and antheridia (Javier-Alva and Mattos, 2006; Waterhouse, 1963).

### Molecular identification

The mycelia of the isolates was grown in a PD (potato-dextrose) liquid medium, and stored at -20 °C. The DNA was extracted using the protocol proposed by Zelaya-Molina *et al.* (2011), which consists of a series of washings with chloroform-isoamyl alcohol. A group of 10

sexual, cada aislado se confrontó con cepas de referencia A1 y A2 de *P. nicotianae* en medio de cultivo V8; un disco de 0.5 cm de diámetro de agar con micelio en crecimiento activo de cada aislado se colocó a una distancia aproximada de 1 cm de distancia de discos de agar con micelio en crecimiento activo de las cepas de referencia A1 y A2 de *P. nicotianae*. Las placas se incubaron por 15 días a 25 °C y entonces se registró la presencia/ausencia de oosporas, así como las características de oogonios y anteridios (Javier-Alva y Mattos, 2006; Waterhouse, 1963).

### Identificación molecular

El micelio de los aislados se desarrolló en medio líquido PD (papa-dextrosa), y se almacenó a -20 °C. El ADN se extrajo utilizando el protocolo propuesto por Zelaya-Molina *et al.* (2011), el cual consiste en una serie de lavados con cloroformo-alcohol isoamílico. Un grupo de 10 aislados representativos que comparten características morfológicas se utilizaron para amplificar el ADN con los pares de oligonucleótidos ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') y ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') para TEF-1 $\alpha$ , TUBUF2 (5'-CGGTAACAACACTGGGCCAAGG-3') y TUBUR1 (5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3') para beta tubulina (Kroon *et al.*, 2004) y los oligonucleótidos DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para la región ITS (Bonants *et al.*, 1997).

Las condiciones para efectuar la PCR usando los oligonucleótidos para TEF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -Tub consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, después 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Las condiciones de amplificación con los oligonucleótidos para ITS fueron

representative isolates that share morphological characteristics were used to amplify the DNA with the pairs of oligonucleotides ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') and ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGATGACCATG-3') for TEF-1 $\alpha$ , TUBUF2 (5'-CGGTAACAACACTGGGCCAAGG-3') and TUBUR1 (5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3') for beta tubuline (Kroon *et al.*, 2004) and the oligonucleotides DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for the region ITS (Bonants *et al.*, 1997).

The conditions to carry out the PCR using the oligonucleotides for TEF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -Tub consisted of an initial denaturalization at 95 °C for 2 min, followed by 35 denaturalization cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The conditions of amplification with the oligonucleotides for ITS were 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

The specific oligonucleotides for the species *P. nicotianae*, Pn1 (5'-GACTTTGTAAAGTGCCACCATAC-3') and Pn2 (5'-CTCAGCTCTTTTCCTTGGATCT-3') (Meng and Wang, 2010), were used under the following conditions of PCR: 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, alignment at 58 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

### Phylogenetic analysis and sequencing

The PCR products obtained from the genes ITS, TEF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -Tub were purified using the kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), following the specifications described

94 °C por 3 min, después 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los oligonucleótidos específicos para la especie *P. nicotianae*, Pn1 (5'-GAC TTT GTA AGT GCC AC-CATAC-3') y Pn2 (5'-CTCAGCTCTTTTCCTTGGATCT-3') (Meng y Wang, 2010), se utilizaron bajo las siguientes condiciones de PCR: 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, alineamiento a 58 °C por 1 min, elongación a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

### Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos de los genes ITS, TEF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -Tub se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las especificaciones descritas por el proveedor. La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias fueron editadas con el programa CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Qld, Australia), y comparadas con secuencias del Banco de Genes (GenBank, siglas en inglés) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés) utilizando el software alineamiento local básico de nucleótidos (BLAST-N, siglas en inglés) y el algoritmo Megablast. Para el alineamiento múltiple y análisis filogenético de cuatro secuencias de aislados representativos se utilizó el software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas con otras 22 pertenecientes a diferentes especies de *Phytophthora* (Cuadro 1) utilizando el programa MUSCLE integrado en MEGA (Edgar, 2004), usando los valores por default para la penalización por apertura y extensión de gaps y con posterior co-

by the supplier. Sequencing was carried out by capillary electrophoresis with an automatic sequencer ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), in the Unit of Molecular Biology of the Cell Physiology Institute of the UNAM. The sequences were edited using the program CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Qld, Australia), and compared with sequences of the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-N) and the Megablast algorithm. For the multiple alignment and phylogenetic analysis of four sequences of representative isolations, we used the software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). The sequences were aligned with another 22 belonging to different species of *Phytophthora* (Table 1) using the program MUSCLE integrated in MEGA (Edgar, 2004), using the default values for the penalization for opening and extension of gaps and with the later manual correction of the alignment. The alignments underwent the nucleotide substitution model selection program in order to select the evolutionary model that best fit the data. For the phylogenetic reconstruction we used the maximum verisimilitude model and the Tamura-Nei model. The variation of rates between sites was modeled by a gamma distribution plus invariable sites (4 categories). The support of the internal topology of the dendrograms was determined by bootstrap analysis with 1000 re-sampling (Felsenstein, 1985). Linked alignments were carried out on the 3 markers using the software DAMBE 6.1.23 (Xia, 2013) and a phylogenetic tree was constructed as described earlier.

### Pathogenicity evaluation

Ten-week old vinca plants were inoculated by spraying a suspension of zoospores of  $1 \times 10^4$

**Cuadro 1.** Especies, cepas y número de accesión de secuencias utilizadas para el análisis filogenético.**Table 1.** Species, strains, and accession numbers of sequences used for the phylogenetic analysis.

| Especie                  | Identificación del aislado | No. de acceso en GeneBank |              |                         |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|
|                          |                            | ITS                       | $\beta$ -Tub | TEF <i>I</i> - $\alpha$ |
| <i>P. alni</i>           | P10568                     | FJ801456                  | EU080606     | EU080607                |
| <i>P. brassicae</i>      | CBS 179.87                 | AF380148                  | EU080790     | EU080791                |
| <i>P. cambivora</i>      | ATCC46719                  | HQ261516                  | EU080551     | EU080552                |
| <i>P. capsici</i>        | P1319                      | HQ261519                  | EU079737     | EU079738                |
| <i>P. cinnamomi</i>      | P3232                      | HQ261526                  | EU079798     | EU079799                |
| <i>P. citricola</i>      | P10458                     | FJ802050                  | EU079582     | EU079583                |
| <i>P. citrophthora</i>   | P6310                      | JN618789                  | EU080538     | EU080539                |
| <i>P. cryptogea</i>      | CBS 290.35                 | HQ6432126                 | EU080447     | EU080448                |
| <i>P. erythroseptica</i> | CBS 956.87                 | HQ643224                  | EU079828     | EU079829                |
| <i>P. fragariae</i>      | P1435                      | HQ261564                  | EU079744     | EU079745                |
| <i>P. ilicis</i>         | P6860                      | HQ261580                  | EU080137     | EU080138                |
| <i>P. insolita</i>       | P6195                      | HQ261591                  | EU080176     | EU080177                |
| <i>P. katsurae</i>       | P3389                      | HQ261600                  | EU079815     | EU079816                |
| <i>P. sp. "kelmania"</i> | P10613                     | HQ261692                  | EU079606     | EU079607                |
| <i>P. lateralis</i>      | P1728                      | FJ802092                  | EU080090     | EU080091                |
| <i>P. meadii</i>         | CBS 219.88                 | HQ643268                  | AY564077     | AY564133                |
| <i>P. nemorosa</i>       | P10288                     | HQ261628                  | EU079475     | EU079476                |
| <i>P. nicotianae</i>     | P7146                      | HQ261629                  | EU079556     | EU079557                |
| <i>P. nicotianae</i>     | P10116                     | FJ801280                  | EU079963     | EU079964                |
| <i>P. nicotianae</i> *   | OVH                        | KF147897                  | KF290380     | KF290387                |
| <i>P. nicotianae</i> *   | OV2R                       | KF147895                  | KF290383     | KF290391                |
| <i>P. nicotianae</i> *   | OV5N                       | KF147901                  | KF290386     | KF290393                |
| <i>P. nicotianae</i> *   | OV11                       | KC248201                  | KC248203     | KC248205                |
| <i>P. palmivora</i>      | P0255                      | HQ261635                  | EU080339     | EU080340                |
| <i>P. primulae</i>       | P10333                     | HQ261650                  | EU080399     | EU080400                |
| <i>P. syringae</i>       | P10332                     | HQ261715                  | EU079764     | EU079765                |

\* aislados de este estudio / \* isolates of this study.

rección manual del alineamiento. Los alineamientos fueron sometidos al programa de selección del modelo de sustitución nucleotídica, para seleccionar el modelo evolutivo que mejor se ajustara a los datos. Para la reconstrucción filogenética se utilizó el método de máxima verosimilitud y el modelo Tamura-Nei. La variación de tasas entre sitios fue modelada por una distribución gamma más sitios invariables (4 categorías). El soporte de la topología interna de los dendrogramas fue determinado por análisis de bootstrap con 1000 remuestreos (Felsenstein, 1985). Se realizaron alineamientos conca-

zoospores/ml of 10 representative isolates from different sampling sites. Three pots containing 5 plants each were inoculated with isolate. Plants inoculated with only sterile distilled water were used as a control treatment. All plants were kept in a shade mesh area at 25 °C and 80-90 % relative humidity. Once the symptoms developed in the inoculated plants, the pathogen was reisolated and the incidence of the disease was quantified.

## RESULTS AND DISCUSSION

tenados de los 3 marcadores utilizando el software DAMBE 6.1.23 (Xia, 2013) y un árbol filogenético fue construido como se describió previamente.

### Evaluación de patogenicidad

Plantas de vinca de 10 semanas de edad se inocularon al asperjar una suspensión de zoosporas de  $1 \times 10^4$  zoosporas/ml de 10 aislados representativos provenientes de distintos sitios de colecta. Tres macetas que contenían 5 plantas cada una, se inocularon con cada aislado. Plantas inoculadas sólo con agua destilada estéril se utilizaron como un tratamiento testigo. Todas las plantas se mantuvieron en un área de malla sombra a 25 °C y 80-90 % de humedad relativa. Una vez que se desarrollaron los síntomas en las plantas inoculadas, se realizó el reaislamiento del patógeno y se cuantificó la incidencia de la enfermedad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación morfológica

Se obtuvieron 39 aislados de *Phytophthora* sp. provenientes de plantas de vinca con síntomas de tizón y marchitez (Figura 1A); 77 % provinieron de viveros de plantas ornamentales y 23 % de plantas en jardines y áreas urbanas. Los aislados produjeron micelio cenocítico y colonias algodonosas de color blanco en agar V8; crecieron entre 7 y 30 °C (temperatura óptima 25 °C); desarrollaron esporangios persistentes, terminales de forma oval o alimonada, principalmente papilados (Figura 1B) que midieron en promedio 34.16 µm de longitud y 26.35 µm de ancho (n=24). Waterhouse (1963) menciona que el rango del tamaño de esporangios de *P. nicotianae* se encuentra alrededor de 25-50 x 20-40 µm; mientras que, Erwin y Ribeiro (1996)

### Morphological identification

Thirty-nine *Phytophthora* sp. isolates were obtained from vinca plants with symptoms of blight and wilting (Figure 1A); 77 % came from ornamental nurseries and 23 % came from urban areas. The isolations produced coenocytic mycelia and white cotton-like colonies in V8 agar; they grew between 7 and 30 °C (optimum temperature 25 °C); they developed persistent sporangia, oval or lemon shaped terminals, mainly papillate (Figure 1B) with a average of 34.16 µm in length and 26.35 µm in width (n=24). Waterhouse (1963) mentions that the range of the size of *P. nicotianae* sporangia is around 25-50 x 20-40 µm; meanwhile, Erwin and Ribeiro (1996) reported ranges of 11-60 x 20-45 µm. A proportion in length/width of 1.29 µm (n=24) was observed in the sporangia, similar to the proportion of 1.3 described by Erwin and Ribeiro (1996) for *P. nicotianae*. All isolations displayed intercalary and terminal chlamydospores (Figure 1D), which is a characteristic of *P. nicotianae* (Waterhouse, 1963; Erwin and Ribeiro, 1996).

### Sexual compatibility

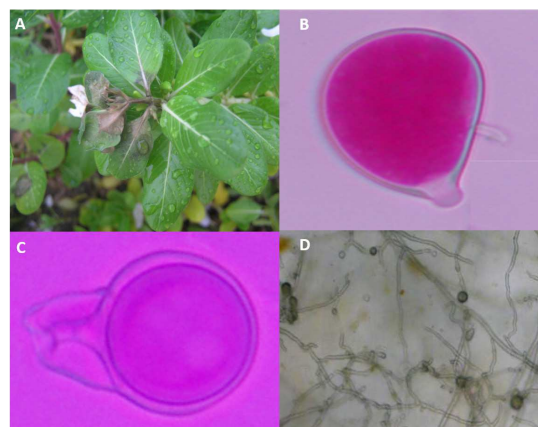
The isolations were heterothallic, 21 of a compatibility type A1 and 18 of compatibility type A2 (Table 2). The interaction between compatibility types A1 and A2 produced anaplerotic oospores (Figure 1C), with spherical and flat oogonia, and amphiginous antheridia. These characteristics are consistent with *P. nicotianae* according to Waterhouse (1963), and Erwin and Ribeiro (1996). In some sampling sites, both types of compatibility were found, which suggests the presence of sexual recombination; this would increase the genetic variability of the population and could cause the appearance of highly pathogenic isolates (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004; Blaya

reportaron rangos de 11-60 x 20-45  $\mu\text{m}$ . Una proporción largo/ancho de 1.29  $\mu\text{m}$  (n=24) se observó en los esporangios, similar a la proporción de 1.3 descrita por Erwin y Ribeiro (1996) para *P. nicotianae*. Todos los aislados mostraron la presencia de clamidosporas intercalares y terminales (Figura 1D), lo cual es una característica de *P. nicotianae* (Waterhouse, 1963; Erwin y Ribeiro, 1996).

### Compatibilidad sexual

Los aislados fueron heterotáticos, 21 de tipo de compatibilidad A1 y 18 tipo de compatibilidad A2 (Cuadro 2). La interacción entre los tipos de compatibilidad A1 y A2 produjeron oosporas apaléroticas (Figura 1C), con oogonios esféricos y lisos, y anteridios anfíginos. Estas características son consistentes con *P. nicotianae* según Waterhouse (1963) y Erwin y Ribeiro (1996).

En algunos sitios de muestreo se encontraron los dos tipos de compatibilidad, lo cual sugiere que existe recombinación sexual; esto incrementaría la variabilidad genética de la población y podría cau-



**Figura 1.** Síntomas de tizón en vinca y estructuras reproductivas de *P. nicotianae*. A. Tizón en planta de vinca, B. Esporangio papilado, C. Oospora, D. Clamidosporas.

**Figure 1.** Blight symptoms in vinca and *P. nicotianae* reproductive structures. A. Blight in a vinca plant, B. Papillate sporangium, C. Oospore, D. Chlamydospores.

*et al.*, 2015). An important observation was the presence of both types of compatibility in three out of the four nurseries observed, which means that recombination could take place in this site, and that

**Cuadro 2.** Sitios de muestreo y tipo de compatibilidad en aislados de *P. nicotianae* causante de tizón y marchitez en plantas de *Vinca rosea* en Culiacán.

**Table 2.** Sampling sites and type of compatibility in *P. nicotianae* isolates, source of blight and wilting in *Vinca rosea* plants in Culiacán.

| Sitio de muestreo         | Aislados                                 | Tipo de compatibilidad |
|---------------------------|--|------------------------|
| Vivero 3 Ríos             | OV-A, OV-B, OV-E, OV-F, OV-G             | A1                     |
| Vivero 3 Ríos             | OV-C, OV-D, OV-5N                        | A2                     |
| Vivero tienda comercial   | OV-H                                     | A2                     |
| Vivero Lomas              | OV-I, OV-J, OV-N                         | A2                     |
| Vivero Lomas              | OV-K, OV-M                               | A1                     |
| Vivero Chinchorro         | OV-P, OV-R, OV-S, OV-T, OV-W, OV-Z       | A1                     |
| Vivero Chinchorro         | OV-U, OV-V, OV-X, OV-Y                   | A2                     |
| Colonia Bugambilias       | OV-4                                     | A2                     |
| Colonia Bugambilias       | OV-11                                    | A1                     |
| Vivero Pedro Infante      | OV-2F, OV-2G, OV-2H, OV-2I, OV-2J, OV-2R | A1                     |
| Colonia Aguaruto          | OV-3B                                    | A1                     |
| Colonia Obrero Campesina  | OV-3T, OV-3U, OV-3W                      | A2                     |
| Colonia Villa Universidad | OV-4X, OV-4Y, OV-5A                      | A2                     |

sar la aparición de aislados altamente patogénicos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004; Blaya *et al.*, 2015). Una observación importante fue la presencia de los dos tipos de compatibilidad en tres de los cuatro viveros muestreados, lo que significa que podría ocurrir recombinación en este sitio y que al venderse algunas plantas con infecciones iniciales, éstas representarían un factor de dispersión en la región.

### Identificación molecular

Un fragmento de aproximadamente 1300 pb se obtuvo cuando se utilizaron los oligonucleótidos DC6/ITS4 en los diez aislados seleccionados. Los productos se secuenciaron y se compararon con secuencias depositadas en el NCBI. Los porcentajes de homología fluctuaron entre 98-100 % con la especie *P. nicotianae*. Los oligonucleótidos ELONGF1/ELONGR1 generaron un fragmento de aproximadamente 1000 pb, los productos se secuenciaron y cuando se compararon las secuencias se obtuvo una homología entre 99-100 % con *P. nicotianae*. Los oligonucleótidos TUBUF2/TUBUR1 generaron un fragmento de aproximadamente 1000 pb, y sus secuencias mostraron una homología entre 98-100 % con *P. nicotianae*. Las secuencias de las distintas regiones amplificadas fueron depositadas en el NCBI (Cuadro 3).

Los oligonucleótidos Pn1/Pn2 específicos para *P. nicotianae* amplificaron un fragmento de aproximadamente 400 pb en todos los aislados (Figura 2). Estos resultados fueron los esperados para *P. nicotianae* (Meng y Wang, 2010). La utilización de estos oligonucleótidos específicos puede ser una estrategia rápida para identificar esta especie.

La reconstrucción filogenética resultante de la concatenación de los tres marcadores mostró que los cuatro aislados analizados en el presente estudio se agruparon en el mismo clado que las cepas de referencia de *P. nicotianae* (Figura 3; 100 % de

if plants with initial infections were to be sold, they would be a factor of dispersion in the region.

### Molecular identification

A fragment of approximately 1300 pb was obtained when oligonucleotides DC6/ITS4 were used in the ten isolates selected. The products were sequenced and compared with sequences deposited in the NCBI. Homology percentages ranged between 98 and 100 % with the species *P. nicotianae*. Oligonucleotides ELONGF1/ELONGR1 generated a fragment of approximately 1000 pb; the products were sequenced and when the sequences were compared, a homology was obtained between 99 and 100 % with *P. nicotianae*. Oligonucleotides TUBUF2/TUBUR1 generated a fragment of approximately 1000 pb, and its sequences displayed a homology between 98 and 100 % with *P. nicotianae*. The sequences of the different amplified regions were deposited in the NCBI (Table 3).

The oligonucleotides Pn1/Pn2 specific to *P. nicotianae* amplified a fragment of approximately 400 pb in all the isolates (Figure 2). These results were expected for *P. nicotianae* (Meng and Wang, 2010). The use of these oligonucleotides can be a quick strategy to identify this species.

The phylogenetic reconstruction resulting from linking the three markers showed that the four isolates analyzed in this study were grouped in the same clade as the reference strains of *P. nicotianae* (Figure 3; 100 % bootstrap), belonging to clade 1 of species of *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000; Kroon *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2008). The analyses of the individual partial sequences of each marker showed low percentages of support of the internal topology of the dendrograms compared with the values resulting from linking the 3 loci under analysis. With the sequences obtained in this study,



**Cuadro 3.** Acciones de secuencias de tres loci depositadas en GenBank de aislados de *P. nicotianae* obtenidos de *V. rosea* de zonas urbanas en Culiacán e incidencia de infección en experimento de patogenicidad.

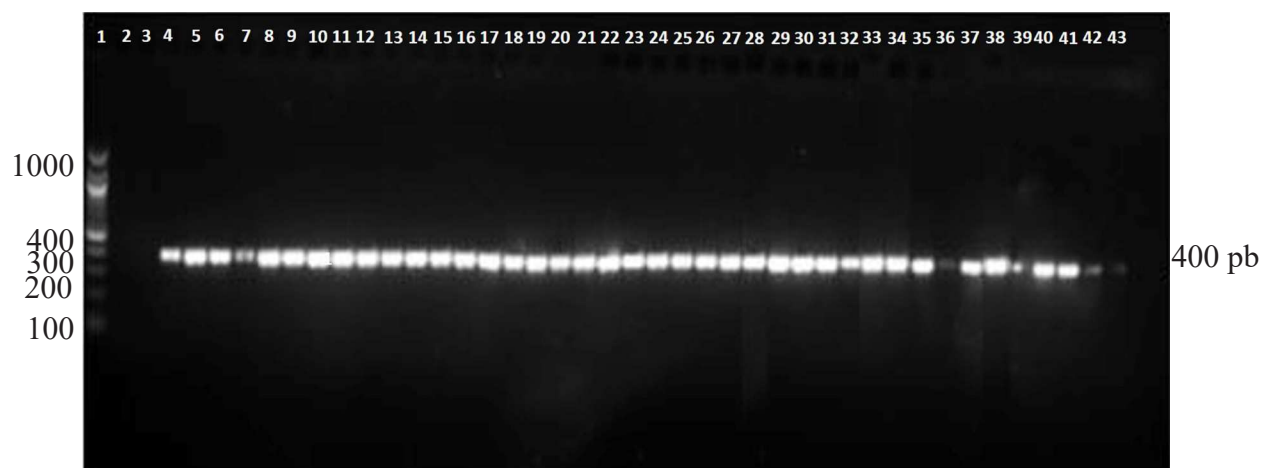
**Table 3.** Accessions of sequences of three loci deposited in the GenBank of *P. nicotianae* isolates obtained from *V. rosea* in urban areas in Culiacán and incidence of infection in pathogenicity experiment.

| Aislado | Número de acceso en GenBank |                         |          | % de incidencia |
|---------|-----------------------------|-------------------------|----------|-----------------|
|         | $\beta$ -Tub                | TEF <i>I</i> - $\alpha$ | ITS      |                 |
| OV5N    | KF290386                    | KF290393                | KF147901 | 40              |
| OV4X    | KF290382                    | KF290390                | KF147900 | 46.7            |
| OV3B    | KF290384                    | KF290388                | KF147899 | 40              |
| OVR     | KF290381                    | KF290394                | KF147898 | 53.3            |
| OVH     | KF290380                    | KF290387                | KF147897 | 20              |
| OVF     | KF290379                    | KF290392                | KF147896 | 13.3            |
| OV2R    | KF290383                    | KF290391                | KF147895 | 66.7            |
| OV4     | KC248204                    | KC248206                | KC248202 | 66.7            |
| OV11    | KC248203                    | KC248205                | KC248201 | 66.7            |
| OV3W    | KF290385                    | KF290389                | ND       | 60              |

B-Tub = beta tubulina, TEF *I*- $\alpha$  = factor de elongación, ITS= región espaciadora interna transcrita ND= no determinado / B-Tub = beta tubulin, TEF *I*- $\alpha$  = elongation factor, ITS= internal transcribed spacer region, ND= not determined.

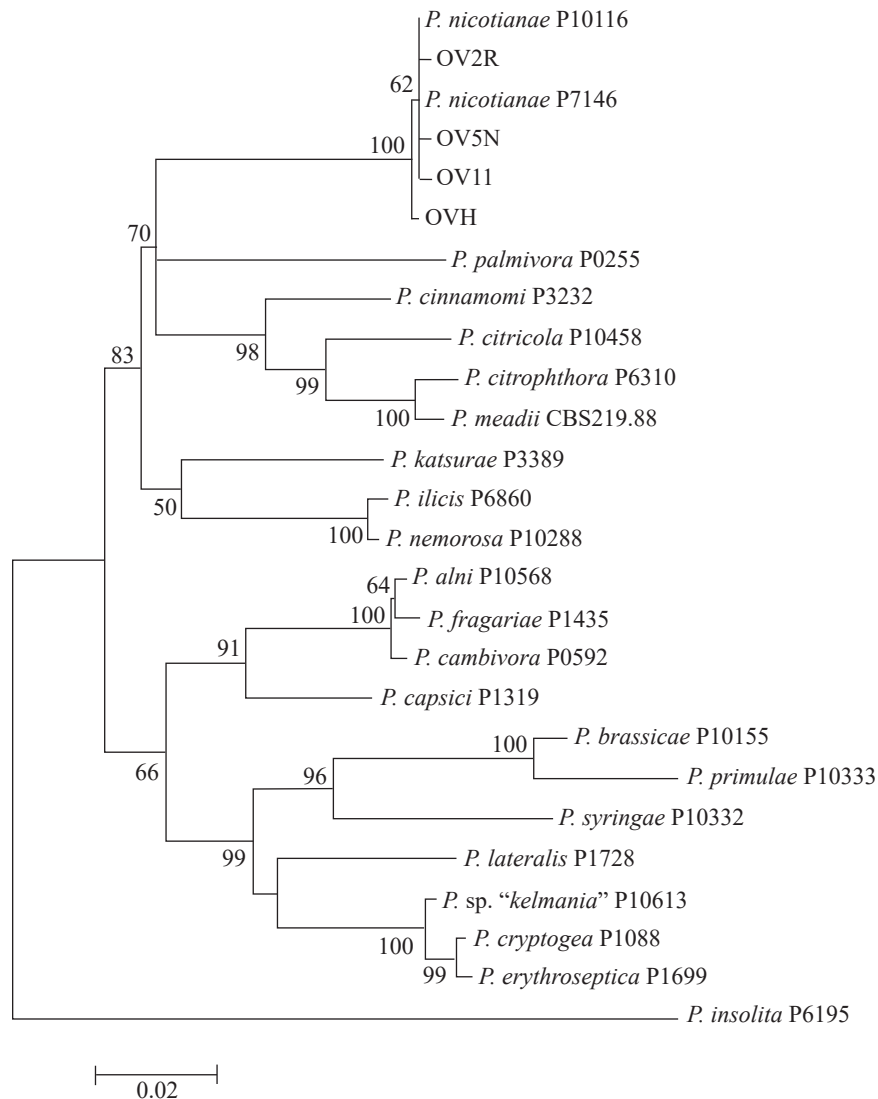
bootstrap), perteneciente al clado 1 de especies de *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000; Kroon *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2008). Los análisis de las se-

individual alignments were carried out for each marker used (ITS,  $\beta$  Tub and TEF *I*- $\alpha$ ). Later, the 3 alignments were linked (1589 pb) and a similarity



**Figura 2.** Fragmento amplificado de ADN con los oligonucleótidos Pn1-Pn2 específicos para *P. nicotianae*. Línea 1, Marcador molecular 100 bp; Línea 2, agua; Línea 3, control negativo (*P. capsici*); Línea 4, *P. nicotianae* control positivo, Líneas 5-43 aislados de *P. nicotianae* de *Vinca rosea*.

**Figure 2.** Amplified DNA fragment with the oligonucleotides Pn1-Pn2 specific to *P. nicotianae*. Line 1, Molecular marker 100 bp; Line 2, water; Line 3, negative control (*P. capsici*); Line 4, *P. nicotianae* positive control, Lines 5-43 *P. nicotianae* isolated from *Vinca rosea*.



**Figura 3.** Árbol filogenético de aislamientos representativos del presente estudio (OV2R, OV5N, OV11 y OVH) y 22 cepas de referencia de *Phytophthora* derivado de las secuencias parciales de tres loci (ITS,  $\beta$  Tub y TEF *1-a*). El árbol fue construido con el software MEGA 6.06 (bootstrap=1000), utilizando el modelo de sustitución Tamura-Nei (TN93 G+I). Los valores bootstrap están mostrados sobre las ramas.

**Figure 3.** Phylogenetic tree diagram of representative isolates of this study (OV2R, OV5N, OV11, and OVH) and 22 reference strains of *Phytophthora* derived from the partial sequences of three loci (ITS,  $\beta$  Tub, and TEF *1-a*). The tree was created using the software MEGA 6.06 (bootstrap=1000), using the Tamura-Nei substitution model (TN93 G+I). The bootstrap values are shown on the branches.

cuencias parciales individuales de cada marcador mostraron bajos porcentajes de soporte de la topología interna de los dendrogramas comparados con los valores resultantes de la concatenación de los

was found of 99.6 to 100 % between sequences, therefore not all sequences are equal; 11 differences were found between nucleotides and 2 gaps per insertions of nucleotides (Data not shown). Future

3 loci bajo análisis. Con las secuencias obtenidas en el presente estudio, se realizó el alineamiento individualmente por cada marcador utilizado (ITS,  $\beta$  Tub y TEF *1- $\alpha$* ), posteriormente se concatenaron los 3 alineamientos (1589 pb) y se encontró una similitud entre el 99.6 y 100 % entre las secuencias, por lo que no todas las secuencias son iguales, se encontraron 11 diferencias entre nucleótidos y 2 gaps por inserciones de nucleótidos (Datos no mostrados). En un estudio futuro se podría estimar la diversidad genética de poblaciones de *Phytophthora nicotianae* al analizar un mayor número de aislados, de diferentes regiones y años de colecta para enriquecer el estudio y correlacionarla con las características fenotípicas del patógeno.

### Evaluación de patogenicidad

Los 10 aislados evaluados en los ensayos de patogenicidad causaron los síntomas de la enfermedad en plantas de *V. rosea*. Los síntomas iniciales de la enfermedad se observaron a los 4 días posteriores a la inoculación e incluyeron tizón de hojas. Después, las plantas desarrollaron síntomas de marchitez y murieron a los 12 días posteriores a la inoculación. Todos los aislados fueron virulentos, infectaron plantas sanas de vinca; sin embargo, existió una variación en el nivel de incidencia, ya que el porcentaje de plantas con síntomas fluctuó entre 13 y 66.7 % (Cuadro 3). Las cepas inoculadas fueron reaisladas de plantas inoculadas.

Es importante mencionar que *P. nicotianae* infecta más de 300 hospedantes diferentes entre los que se incluyen *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* (Erwin y Ribeiro 1996). Por ello, no podemos descartar que la especie *P. nicotianae* encontrada en plantas de vinca en el área urbana, también esté causando algunas infecciones en el área hortícola del valle de Culiacán, la cual se basa principalmente en la producción de tomate y chi-

studies could estimate the genetic diversity of *Phytophthora nicotianae* populations by analyzing a greater number of isolates from different regions and years of collection in order to enrich the study and correlate it with the phenotypical characteristics of the pathogen.

### Pathogenicity evaluation

The 10 isolates evaluated in the pathogenicity tests caused the symptoms of the disease in *V. rosea* plants. The initial symptoms of the disease were observed 4 days after inoculation and included leaf blight. Afterwards, plants developed symptoms of wilting and died 12 days after inoculation. All isolations were virulent, they infected healthy vinca plants, although there was a variation in the incidence level, since the percentage of plants with symptoms fluctuated between 13 and 66.7 % (Table 3). Inoculated strains were reisolated from inoculated plants.

It is important to mention that *P. nicotianae* infects more than 300 different hosts, including *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum* (Erwin and Ribeiro 1996). For this reason, we cannot discard that the species *P. nicotianae* found in vinca plants in urban areas is also causing some infections in the vegetable-growing area of the Culiacan valley, which is based largely on the production of tomatoes and peppers. Although diverse species of *Phytophthora* have been reported as causal agents of blight and wilting in vinca (McGovern and Begeman, 1996; McMillan and Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010), the morphological, phylogenetic, and pathogenic analysis performed in this investigation shows that *P. nicotianae* is responsible for the damages inflicted on this ornamental plant in the samples gathered in the city of Culiacan.

le. Aunque diversas especies de *Phytophthora* han sido reportadas como causantes de tizón y marchitez en vinca (McGovern y Begeman, 1996; McMillan y Garofalo, 2004; Orilowski *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2010), el análisis morfológico, filogenético y patogénico realizado en esta investigación demuestra que *P. nicotianae* es la responsable de los daños observados en esta planta ornamental en las muestras colectadas en la ciudad de Culiacán.

## CONCLUSIONES

*Phytophthora nicotianae* fue la única especie asociada al tizón y muerte de plantas de vinca en la ciudad de Culiacán. La caracterización molecular indicó que las secuencias nucleotídicas en las regiones TEF 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -Tub e ITS mostraron 98-100 % de homología con la especie *P. nicotianae* y se agruparon filogenéticamente con cepas de referencia de esta especie. Todos los aislados fueron detectados por los oligonucleótidos Pn1/Pn2 específicos para *P. nicotianae*. Los postulados de Koch demostraron la patogenicidad de los aislados sobre vinca. Este es uno de los pocos estudios enfocados en enfermedades de plantas ornamentales en áreas urbanas en el Noroeste de México.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento a los estudios de Brando Álvarez Rodríguez

## LITERATURA CITADA

- Alvarez-Rodriguez B, Ortiz-Meza JA, Rojo-Baez I, Márquez-Zequera I, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA and Allende-Molar R. 2013. First report of vinca blight caused by *Phytophthora nicotianae* in Northwestern Mexico. Plant Disease 97:1257. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0400-PDN>
- Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM and Kang S.

## CONCLUSIONS

*Phytophthora nicotianae* was the only species associated with blight and death of vinca plants in the city of Culiacán. The molecular characterization indicated that the nucleotide sequences in the regions TEF 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -Tub, and ITS showed a homology of 98-100 % with the species *P. nicotianae* and they were grouped phylogenetically with reference strains of this species. All the isolates were detected by the oligonucleotides Pn1/Pn2 specific to *P. nicotianae*. The Koch postulates showed the pathogenicity of the isolations on vinca. This is one of the few studies focused on ornamental plant diseases in urban areas in Northwestern Mexico.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT for funding Brando Álvarez Rodríguez's studies.

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

2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45:266-277. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fgb.2007.10.010>.
- Blaya J, Lacasa C, Lacasa A, Martínez V, Santísima-Trinidad AB, Pascual JA and Ros M. 2015. Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates in southeast Spain and their detection and quantification through a real-time TaqMan PCR. Journal of Science Food and Agriculture 95:1243-1251. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/jsfa.6813>.
- Bonants P, Hagenaar-de Weerd M, van Gent-pelzer M, Lacourt I, Cooke D and Duncan J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103:345-355. <http://dx.doi.org/doi:10.1023/A:1008640227432>
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G and Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30:17-32. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2000.1202>
- Donahoo RS and Lamour KH. 2008. Characterization of *Phytophthora* species from leaves of nursery woody ornamentals in Tennessee. HortScience 43:1833-1837. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspublishings.org/content/43/6/1833.full.pdf+html>
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment

- with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Erwin D, and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society. 562 Pp.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. Disponible en línea: <http://statweb.stanford.edu/~nzhang/Stat366/Felsenstein85.pdf>
- Hagan A. 2004. Diseases of annual vinca in the greenhouse and landscape. Alabama Cooperative Extension System ANR-1023 6 pag. Disponible en línea: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1023/ANR-1023.pdf>
- Haider M, Tahir M, Saeed A, Shah A, Rashid N, Javed M and Iqbal J. 2007. *Vinca minor*; another host of a tomato infecting begomovirus in Pakistan. *African Crop Science Conference Proceedings* 8:905-907. Disponible en línea: <http://www.acss.ws/acw/Upload/XML/Research/425.pdf>
- Hao W, Richardson P and Hong C. 2010. Foliar blight of annual vinca (*Catharanthus roseus*) caused by *Phytophthora tropicalis* in Virginia. *Plant Disease* 94:274. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0274A>
- Javier-Alva J y Mattos L. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón rugoso *Citrus jambhiri Lush* bajo riego por aspersión. *Universalia* 11:23-35. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2916267>
- Kroon LPNM, Bakker FT, Van den Bosch GBM, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41:766-782. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fgb.2004.03.007>
- Martin F, Abad Z, Balci Y and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*. 96:1080-1103. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- McGovern R and Begeman J. 1996. Reduction of *Phytophthora* blight of Madagascar periwinkle in the landscape by soil solarization. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 108:58-60. Disponible en línea: [http://fshs.org/proceedings-o/1995-vol-108/58-60%20\(MCGOVERN\).pdf](http://fshs.org/proceedings-o/1995-vol-108/58-60%20(MCGOVERN).pdf)
- McMillan R and Garofalo J. 2004. *Phytophthora parasitica* wilt of new cultivars of *Catharanthus roseus*. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 117:316-317. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/85918/82834>
- Meng J and Wang Y. 2010. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and samples based on its Ypt1 gene. *Journal of Phytopathology*. 158:1-7. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01548.xo>
- Mirsoleimani Z and Mostowfizadeh-Ghahamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology, and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea* 52:501-516. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-11549](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11549)
- Orilowski L, Ptaszek M and Trzewik A. 2011. *Phytophthora* shoot blight of periwinkle in polish hardy ornamental nursery stock. *Journal of Plant Protection Research* 51:1-6. Disponible en línea: [http://www.plantprotection.pl/PDF/51\(4\)/JPPR\\_51\(4\)\\_22\\_Orlikowski.pdf](http://www.plantprotection.pl/PDF/51(4)/JPPR_51(4)_22_Orlikowski.pdf)
- Pintos VC, Mansilla VJ y Agúin CO. 2004. *Phytophthora ramorum* nuevo patógeno en España sobre *Camellia japonica* y *Viburnum tinus*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 30:97-111. Disponible en línea: <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-30-01-01-097-111.pdf>
- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cáarez B y Valdés M. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrizicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:267-278. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/610/61027307.pdf>
- Schena L and Cooke DEL. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* 67:70-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.003>
- Schubert T and Leahy R. 1989. *Phytophthora* blight of *Catharanthus roseus*. Florida Department of Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry. *Plant Pathology Circular* 321. Disponible en línea: <http://www.freshfromflorida.com/content/download/11327/144253/pp321.pdf>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Waterhouse G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. No. 92.
- Xia X. 2013. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30:1720-1728. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst064>
- Zelaya-Molina LX, Ortega MA and Dorrance AE. 2011. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters* 33:715-720. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10529-010-0478-3>

# Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*

## Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum*

**Efrén Robledo-Leal**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451; **Mariana Elizondo-Zertuche**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Rogelio de Jesús Treviño-Rangel**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Gloria M. González**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Carlos Hernández-Luna**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451; **Nohemí Huerta-González**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451. Correspondencia: [efren.robledoll@uanl.edu.mx](mailto:efren.robledoll@uanl.edu.mx).

**Recibido:** 11 de Mayo, 2016      **Aceptado:** 04 de Agosto, 2016

Robledo-Leal E, Elizondo-Zatuche M, Treviño-Rangel RJ, González GM, Hernández-Luna C y Huerta-González N. Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 258-269. DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-3)  
Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2016.  
First DOI publication: August 04, 2016.

**Resumen.** Una de las enfermedades que sufre el tomate es la pudrición ácida causada por *Geotrichum candidum*. Para lo cual se aislaron levaduras a partir de hormigas del género *Atta* y se seleccio-

**Abstract.** One of the diseases occurring in tomato is the sour rot caused by *Geotrichum candidum*. In order to evaluate the antagonism of killer yeasts, isolates were obtained from ants belonging to the genus *Atta* and those with killer activity were selected, resulting in 8 killer isolates (M1 – M8). Then, isolates of *G. candidum* were obtained from infected tomatoes and the most aggressive one was selected. Each killer yeast was inoculated in 1x1 cm<sup>2</sup> cuts made to tomato fruits and after a 3 hour incubation, 50 µL of a *G. candidum* suspension of 1x10<sup>4</sup> cells/mL was inoculated. After incubation for 72 h in a moist chamber, the lesions were quantified using the Tukey test (p<0.05) resulting in yeast

naron aquellas que mostraron actividad killer frente, resultando en 8 cepas killer (M1 – M8). Posteriormente se aislaron cepas de *G. candidum* a partir de tomates infectados y se seleccionó la más agresiva. Cada levadura killer fue inoculada en cortes hechos a los tomates de 1x1 cm<sup>2</sup> y después de 3 horas de incubación, la cepa seleccionada del fitopatógeno fue inoculada en un volumen de 50 µL con una concentración de 1x10<sup>4</sup> células/mL. Después de 72 h de incubación en cámara húmeda, los daños fueron cuantificados mediante la medición de las lesiones alrededor del sitio de inoculación. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Tukey (p<0.05) resultando que las levaduras M1 y M2 presentaron las mayores actividades antagonistas. La identificación por API 20C AUX arrojó que las cepas corresponden a *Candida (Pichia) guilliermondii*.

**Palabras clave adicionales:** Levaduras killer, antagonismo, *Pichia guilliermondii*, *Geotrichum candidum*.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es uno de los cultivos de mayor comercialización en el mundo, así como uno de los de mayor valor económico. México representa el décimo lugar a nivel mundial en la producción del tomate y el primero en su exportación, lo que en promedio da un ingreso al país de 1,000 millones de dólares. Se ha estimado que 1 de cada 3 tomates rojos se produce en Sinaloa, generando 867 mil toneladas del total nacional de 2.8 millones (SIAP, 2016). Durante la poscosecha, una de las enfermedades que se presentan en este fruto es la pudrición ácida, ocasionada por el hongo *G. candidum*, alteración común prácticamente en cualquier lugar donde se produzcan y exista prefe-

isolates M1 and M2 as the most protective ones. The auxanogram test API 20C AUX identified them as *Candida (Pichia) guilliermondii*.

**Additional keywords:** Killer yeasts, antagonism, *Pichia guilliermondii*, *Geotrichum candidum*.

## INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum* L) is one of the most widely sold crops in the world, and one with the highest commercial value. Mexico is the tenth largest tomato producer worldwide, and the single most important exporter, providing the country with an average of one billion dollars. It has been estimated that 1 out of every 3 red tomatoes is produced in the state of Sinaloa, for a total of 867 thousand tons, out of the total of 2.8 millions produced in Mexico (SIAP, 2016). During postharvest, one of the diseases that appear in this fruit is sour rot, caused by the fungus *G. candidum*, a common alteration in practically any place in which this fruit is produced, and the temperature is preferably of around 30 °C (Ruiz-Martínez *et al.*, 2012). The damage regularly begins through lesions caused by insects, or mechanically, when handling the product in the commercialization process. There are several alternatives to avoid the deterioration of tomatoes and to preserve their quality for longer time periods, including biological control using antagonistic microorganisms such as yeasts, the different action mechanisms include antibiosis, competition for space and nutrients, and direct interaction (Bautista-Baños, 2006; Khaled & Sivasithamparam, 2006). Among the antagonistic yeasts are what are called killer yeasts, capable of secreting metabolites of a protein nature and variable molecular weights, named killer toxins, capable of inhibiting other microorganisms by

rentemente una temperatura de alrededor de 30 °C (Ruiz-Martínez *et al.*, 2012). El daño inicia regularmente a través de lesiones ocasionadas por insectos o mecánicamente por el manejo del producto en el proceso de comercialización. Existen diversas alternativas para evitar el deterioro del tomate y preservar su calidad por más tiempo, entre las que se encuentra el control biológico empleando microorganismos antagonistas, tales como las levaduras, cuyos diferentes mecanismos de acción incluyen la antibiosis, la competencia por espacio y nutrientes, y la interacción directa (Bautista-Baños, 2006; Khaled & Sivasithamparam, 2006). Entre las levaduras antagonistas, se encuentran las denominadas levaduras killer, capaces de secretar metabolitos de naturaleza proteica y peso molecular variable, denominadas toxinas killer, con capacidad de inhibir otros microorganismos mediante alteraciones de la pared celular, membrana o núcleo de la célula susceptible (Buzzini *et al.*, 2007). Actualmente existen numerosos reportes de la efectividad y potencial de las levaduras killer para el control de hongos causantes de deterioro de vegetales. El hongo *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos más dañinos en el cultivo de uvas y fresas, logró ser inhibido empleando las toxinas parcialmente purificadas de la cepa *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (Santos & Marquina, 2004). Este mismo hongo fue posteriormente inhibido con cepas de *Pichia anomala* y *Debaryomyces hansenii*, aumentando el arsenal biológico con potencial biocontrolador frente a este patógeno (Santos *et al.*, 2004). Cepas de *Issatcehnkia orientalis*, *Candida guilliermondii*, *P. ohmeri* y *Torulaspora globosa*, entre otras, han sido reportadas para la inhibición exitosa de hongos fitopatógenos de importancia tales como *Aspergillus cabonarius*, *A. niger*, *Penicillium expansum* y *Colletotrichum sublineolum* en cultivos de uva, pera, manzana y sorgo, respectivamente (Bleve *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010). En México, Hernán-

altering cell walls, membranes, or vulnerable cell nuclei (Buzzini *et al.*, 2007). There are several reports on the effectiveness and the potential of killer yeasts for the control of fungi that cause plant deterioration. The fungus *Botrytis cinerea*, one of the most harmful pathogens in grape and strawberry crops, was inhibited using the partially purified of the strain *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (Santos & Marquina, 2004). This same fungus was later inhibited using strains of *Pichia anomala* and *Debaryomyces hansenii*, increasing the biological arsenal with biocontrolling potential over this pathogen (Santos *et al.*, 2004). Strains of *Issatcehnkia orientalis*, *Candida guilliermondii*, *P. ohmeri* and *Torulaspora globosa*, among others, have been reported to successfully inhibit important plant pathogenic fungi, such as *Aspergillus cabonarius*, *A. niger*, *Penicillium expansum* and *Colletotrichum sublineolum* in grape, pear, apple, and sorghum crops, respectively (Bleve *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010). In Mexico, Hernández-Montiel *et al.*, (2011) reported a significant reduction of *Geotrichum citri-aurantii* in limes during postharvest, using epiphytic *D. hansenii* yeasts.

Yeasts present an ecologically diverse association with insects; over 200 species of only beetles have been reported, along with 12 of termites, 17 for ants, and other insects such as wood-eaters, homoptera, dipterous, hymenoptera, neuroptera, etc. (Rosa & Gábor, 2006). Carreiro *et al.*, (2002) reported that 77 out of 99 yeast strains isolated from ants of the genus *Atta* presented the killer phenotype, including some genera in which this phenomenon had not been previously reported. To study the applicability of this knowledge in preventing the postharvest damage in tomatoes by *G. candidum*, the aim was set to evaluate the antagonistic capability of killer yeast strains taken from ants, against isolations of *G. candidum*



dez-Montiel *et al.*, (2011) reportaron una reducción significativa de *Geotrichum citri-aurantii* en limón durante poscosecha, empleando levaduras epífitas de *D. hansenii*.

Las levaduras presentan una asociación ecológicamente diversa con los insectos; tan sólo de escarabajos se reportan más de 200 especies, así como 12 reportadas en termitas, 17 para hormigas, y otros insectos como los xilófagos, homópteros, dípteros, himenópteros, neurópteros, etc. (Rosa & Gábor, 2006). Carreiro *et al.*, (2002) reportaron que 77 de 99 cepas de levaduras aisladas de hormigas del género *Atta* presentaron el fenotipo killer, incluyendo algunos géneros en los cuales no se encontraba previamente reportado este fenómeno. Para estudiar la aplicabilidad de este conocimiento en la prevención del daño poscosecha en tomate por *G. candidum*, se planteó el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de cepas de levaduras killer obtenidas de hormigas, frente a aislamientos de *G. candidum* obtenidos de muestras de tomate con síntomas característicos de pudrición ácida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de levaduras

Las levaduras fueron aisladas de hormigas rojas (*Atta* spp.) con base en lo reportado previamente (Carreiro *et al.*, 2002). Las hormigas fueron colectadas de diferentes localidades en bolsas de plástico y transportadas en frío al laboratorio. Para el aislamiento, se efectuó el procedimiento descrito por Torres-Mireles (2013); de forma individual, las hormigas fueron maceradas en un mortero estéril adicionando 1 ml de solución salina (0.85 % NaCl) estéril. A partir de cada homogeneizado obtenido, se realizaron 4 diluciones seriadas y 100 µl de cada dilución fueron inoculados por extensión en placas

obtainadas from tomato samples with characteristic symptoms of sour rot.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of yeasts

Yeasts were isolated from red ants (*Atta* spp.) based on previous reports (Carreiro *et al.*, 2002). The ants were gathered from different locations in plastic bags and transported to the lab in a low temperature. For the isolation, we carried out the procedure described by Torres-Mireles (2013); one by one, the ants were macerated in a sterile mortar adding 1 ml of sterile saline solution (0.85 % NaCl). From each homogenization obtained, we performed 4 dilutions in series, and 100 µl of each one were inoculated by extension in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C for up to 72 h. The yeasts obtained, recognized macroscopically by their creamy look and opaque color, and microscopically by their cell size, observable under an optic microscope at a 400x magnification, were preserved in vials with sterile distilled water at room temperature until used.

### Determining the killer phenotype

To evaluate the presence of the phenotype killer in the isolated yeasts, we used the strains of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26609 and ATCC 38527 as yeasts sensitive to the killer toxins (Robledo-Leal *et al.*, 2012), using the medium YEPD-MB (0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5% tryptone, 1 % glucose, 2 % agar, and 0.003 % methylene blue) adjusted to a pH of 4.5 with a citrate-phosphate regulator 0.1 M. Inóculos of  $1 \times 10^6$  cells/ml were prepared from 24h cultures

de Petri con agar dextrosa y papa (PDA) e incubadas a 25 °C hasta por 72 h. Las levaduras obtenidas, reconocidas macroscópicamente por su aspecto cremoso y color opaco, y microscópicamente por su tamaño celular observable al microscopio óptico a 400 aumentos, fueron preservadas en viales con agua destilada estéril a temperatura ambiente, hasta su empleo.

### Determinación del fenotipo killer

Para evaluar la presencia del fenotipo killer en las levaduras aisladas, se emplearon las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26609 y ATCC 38527 como levaduras sensibles a toxinas killer (Robledo-Leal *et al.*, 2012), empleando el medio YEPD-MB (0.3 % de extracto de levadura, 0.3 % de extracto de malta, 0.5 % de peptona, 1 % de glucosa, 2 % de agar y 0.003 % de azul de metileno) ajustado a un pH de 4.5 con regulador de citrato-fosfato 0.1 M. Se prepararon inóculos de  $1 \times 10^6$  células/ml a partir de cultivos de 24h de las cepas sensibles, de los cuales se depositaron 400 µl en placas con medio YEPD-MB empleando hisopos estériles, sembrando en 4 direcciones para generar un “césped” uniforme. Una vez eliminado el exceso de humedad, se inocularon las cepas de levaduras a evaluar a manera de estría gruesa y las placas fueron incubadas a 25 °C por 72h. El fenotipo killer se consideró positivo si se presentó una zona clara de inhibición delineado por un borde azul.

### Aislamiento y selección de las cepas de *G. candidum*.

Se obtuvieron muestras de tomate rojo con síntomas compatibles con la pudrición ácida (reblandimiento, exudado, micelio blanco, producción de gas). Las muestras fueron lavadas a chorro del agua de la llave, después se cortaron trozos del

of the sensitive strains, out of which 400 µl were placed on plates with a YEPD-MB medium, using sterile cotton swabs, plating in 4 directions to generate an even “lawn”. Once the excess humidity was removed, the yeast strains to be evaluated were inoculated as a thick smear and the trays were incubated at 25 °C for 72h. The killer phenotype was considered positive if a clear area of inhibition appeared, surrounded by a blue edge.

### Isolation and selection of *G. candidum* strains

Samples were taken of red tomato with symptoms compatible with sour rot (softening, exudate, white mycelium, production of gas). The samples were washed under the faucet, then pieces of the damaged area were cut (1 cm<sup>2</sup> approx.) and submerged for 2 min in a 2 % hypochlorite solution. They were later moved to a Petri dish with sterile distilled water and washed; this process was carried out twice. Under conditions of sterility, the pieces of tomato were transferred to trays with PDA. The trays were incubated at 30 °C until the cultures appeared. The isolates were identified as *G. candidum* due to their macroscopic and microscopic characteristics, such as rapid growth, whitish color, dry culture aspect, hyaline, septed, branched hyphae, and the production by fragmentation of hyaline, unicellular arthroconidia, without conidiophores or blastoconidia (Watanabe, 2002). Once the pure isolations were obtained, they were kept in glycerol at 20 %, at a temperature of -20 °C, until they were used.

Under conditions of sterility, a tray with PDA was inoculated by puncturing for each strain obtained in the stage of isolation and incubated at 28°C, allowing them to grow until the area of the tray was completely covered. Later, using a needle, a sample of the mycelium was taken and a healthy tomato was inoculated by puncturing after

área dañada (1 cm<sup>2</sup> aprox.) y se sumergieron durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2 %. Posteriormente se pasaron a una caja Petri con agua destilada estéril y se lavaron; este proceso se realizó 2 veces. En condiciones de esterilidad, los trozos del tomate se transfirieron a placas con PDA. Las placas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieran las colonias. Los aislamientos fueron identificados como *G. candidum* por sus características macroscópicas y microscópicas tales como rápido crecimiento, color blanquecino, aspecto colonial seco, hifas hialinas, septadas, ramificadas y la producción por fragmentación de artroconidias hialinas, unicelulares, sin conidióforos ni blastoconidios (Watanabe, 2002). Una vez obtenidos los aislamientos puros, se resguardaron en glicerol al 20 %, a una temperatura de -20 °C, hasta su utilización.

En condiciones de esterilidad, se inoculó por picadura una placa con PDA por cada cepa obtenida en la etapa de aislamiento y se incubaron a 28 °C, dejándolas crecer hasta que el área de la placa estuviera completamente cubierta. Posteriormente, empleando una aguja se tomó una muestra del micelio y se inoculó por picadura un tomate sano previamente sanitizado con hipoclorito de sodio al 2%. Cada tomate recibió 10 picaduras y posteriormente se colocó dentro de una cámara húmeda y después se incubó a 28 °C. Se observaron resultados a las 24 y 48 h. Estos experimentos se realizaron en dos ocasiones separadas con 2 réplicas por ensayo. La cepa más agresiva se seleccionó con base en la cantidad de picaduras infectadas (*i.e.* con crecimiento de micelio), el diámetro de las lesiones en las picaduras y el grado de ablandamiento establecido de forma visual.

### Pruebas de antagonismo en fruto

Se realizaron 2 experimentos de forma inde-

sanitizing with sodium hypochlorite at 2 %. Each tomato was punctured 10 times, then placed inside a damp chamber then incubated at 28 °C. Results were observed after 24 and 48 h. These experiments were carried out in two different moments, separated by replications per test. The most aggressive strain was chosen based on the amount of punctures infected (*i.e.* with mycelial growth), the diameter of the damages in the punctures and the degree of softening established visually.

### Antagonism test on fruit

Two experiments were carried out independently with 3 replications each. Along with the strains of killer yeasts, we included a control treatment without added yeast, and another one with the strain of *Candida albicans* ATCC 90028 as a non-antagonistic yeast control. From young cultures of the strain of *G. candidum* chosen as the most aggressive for tomato, a suspension was prepared of 1 x 10<sup>4</sup> cells/ml. The yeasts of each treatment, including the *C. albicans* control, were adjusted to 1 x 10<sup>8</sup> cells/ml in a sterile salt solution (Ren *et al.*, 2012).

Once the suspensions required for the tests were prepared, the tomatoes were sanitized using cotton soaked in 2 % sodium hypochlorite and using a scalpel, semicircle-shaped holes were carved around the pedicle, with incisions of 1 cm<sup>2</sup> x 0.5 cm in depth in the mesocarp. In each hole 100 µl of the yeast suspension were inoculated, the tomato was placed inside a humidity chamber and incubated at 28 °C for 3 hours, to allow for the pre-establishment of the yeast in the fruit. After this time, 50 µl of the *G. candidum* suspension was inoculated in each hole; it was placed back into the humidity chamber and incubated at 28 °C. The effectiveness of each treatment was evaluated after 72h by measuring the lesions, which were quantified by adding their

pendiente con 3 réplicas cada uno. Además de las cepas de levaduras killer, se incluyó un tratamiento control al que no se le adicionó levadura y otro en el que se empleó la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 como un control de levadura no antagonista. A partir de cultivos jóvenes de la cepa de *G. candidum* seleccionada como la más agresiva frente al tomate, se preparó una suspensión de  $1 \times 10^4$  células/ml. Las levaduras de cada tratamiento, incluyendo el control de *C. albicans*, se ajustaron a  $1 \times 10^8$  células/ml en solución salina estéril (Ren *et al.*, 2012).

Una vez preparadas las suspensiones requeridas para las pruebas, se sanitizaron los tomates con algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 2 % y empleando un bisturí se realizaron pocillos alrededor del pedículo haciendo incisiones de  $1 \text{ cm}^2 \times 0.5 \text{ cm}$  de profundidad en el mesocarpo. En cada pocillo se inocularon 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de levaduras, se colocó el tomate dentro de una cámara húmeda y se incubó a 28 °C por 3 horas, para permitir el pre-establecimiento de la levadura en el vegetal. Una vez transcurrido el tiempo, se inoculó en cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de *G. candidum*, se colocó nuevamente en la cámara húmeda y se incubó a 28 °C. La efectividad de cada tratamiento fue evaluada a las 72h mediante la medición de las lesiones, las cuales fueron cuantificadas sumando su extensión en milímetros hacia ambos lados y el inferior de cada pocillo inoculado. Los valores promedio obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante la prueba de Tukey utilizando el programa SPSS versión 20.0, a un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ).

### Identificación de las levaduras

Las levaduras killer aisladas fueron identificadas mediante el sistema API 20 C AUX de bioMérieux, siguiendo las instrucciones del fabricante y sometiendo los resultados a la base de datos apiweb®.

extension in millimeters towards both sides, and the bottom of each inoculated hole. The average values obtained for each treatment were analyzed with the Tukey test using the program SPSS version 20.0, at a level of significance of ( $p < 0.05$ ).

### Identification of the yeasts

The killer yeasts were identified with the bioMérieux API 20 C AUX system, following the instructions of the manufacturer, and submitting the results to the apiweb® database.

## RESULTS AND DISCUSSION

From the ants gathered we obtained 8 yeasts, the killer activity of which was observable by the formation of a halo of inhibition, surrounded by a darker blue edge, generated by the methylene precipitated as an indicator of cell death (Figure 1).

From the tomato samples, the strain of *G. candidum* named MG2 produced the most damage in the tomatoes, and was therefore chosen as the most aggressive, and it was used in the antagonism test on the fruit (Table 1 and Figure 2). The comparison of averages using the Tukey test showed that all yeasts, except M5 and M6, helped reduce the significantly higher damage in comparison to the strain of *C. albicans* and the control without yeast. Strains M1 and M2 were the ones that allowed the least total damage (mm) on the fruits, although with no significant difference in comparison with M3, M4, M7, and M8 (Table 2). The identification of the 8 killer yeasts obtained using the API 20 C AUX test indicated that they all corresponded to *Candida (Pichia) guilliermondii*, a species in which killer activity has been known for over 20 years (Polonelli *et al.*, 1987), yet it wasn't until 1991 that its use as a biocontrol agent was first

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las hormigas recolectadas, se obtuvieron 8 levaduras cuya actividad killer fue observable por la formación de un halo de inhibición rodeado de un borde azul más oscuro generado por el azul de metileno precipitado como indicador de muerte celular (Figura 1).

A partir de las muestras de tomate, la cepa de *G. candidum* denominada MG2 fue la que generó el mayor daño a los tomates, por lo que se seleccionó como la más agresiva y se empleó en los ensayos de antagonismo en el fruto (Cuadro 1 y Figura 2). La comparación de medias mediante la prueba de Tukey mostró que todas las levaduras salvo M5 y M6, permitieron una reducción del daño significa-

reported (Wisniewski *et al.*, 1991) and its activity has been reported in several occasions (Coelho *et al.*, 2009; de Lima *et al.*, 2013; Papon *et al.*, 2013). The difference between the damage in the presence of the killer yeasts and the treatments without yeast and with *C. albicans* suggest that the phenotype killer in yeasts M1 – M8 is related to its antagonism with *G. candidum*. The differences observed in the damage to the fruit allowed by each yeast could be explained by differences in the type of killer toxin secreted, which influences the affinity to the white area of the susceptible fungus and/or in differences in the expression of the toxin, since they are mostly codified in the nuclear genome (Buzzini *et al.*, 2007). On the other hand, it is possible that these strains present, not only killer toxins, but also, in a variable way, additional previously reported action mechanisms in *C. guilliermondii*, such as the direct



**Figura 1.** Determinación del fenotipo killer de levaduras aisladas a partir de hormigas del género *Atta*. El borde azul indica la muerte celular de la levadura susceptible en el “césped”.

**Figure 1.** Determination of the killer phenotype of yeasts isolated from ants of the genus *Atta*. Blue edges indicate the cellular death of vulnerable yeast in the “lawn”.

**Cuadro 1.** Selección de la cepa más agresiva de *G. candidum*, de un total de 4 repeticiones. Se enlistan los resultados obtenidos por la inoculación del fitopatógeno por picadura en los frutos.

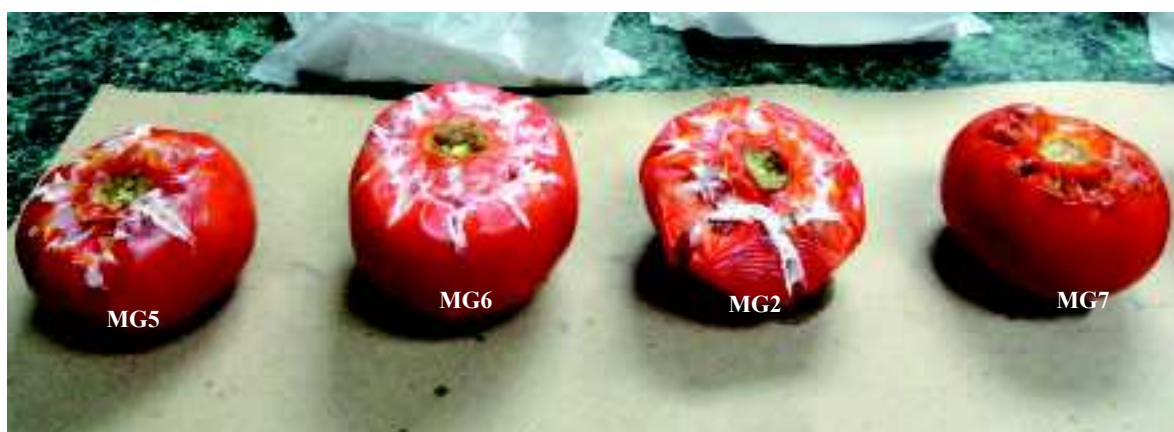
**Table 1.** Selection of the most aggressive *G. candidum* strain, out of a total of 4 repetitions. Results obtained by the inoculation of the pythopathogen by puncturing the fruits are enlisted.

| Cepa | No. de picaduras totales infectadas | Diámetro del halo de pudrición (cm) | Ablandamiento <sup>a</sup> |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| MG1  | 28                                  | < 1                                 | +                          |
| MG2  | 40                                  | ≥ 2                                 | +++                        |
| MG3  | 40                                  | < 1                                 | +                          |
| MG4  | 36                                  | < 1                                 | +                          |
| MG5  | 40                                  | ≥ 2                                 | ++                         |
| MG6  | 40                                  | ≥ 2                                 | ++                         |
| MG7  | 40                                  | ≤ 2                                 | ++                         |
| MG13 | 40                                  | ≤ 2                                 | +                          |
| MG15 | 40                                  | ≤ 2                                 | ++                         |
| MG17 | 12                                  | ≤ 2                                 | +                          |

<sup>a</sup>+ bajo, ++ medio, +++ alto, determinado visualmente / <sup>a</sup>+ low, ++ medium, +++ high, determined visually.

tivamente mayor en comparación a la cepa de *C. albicans* y al control sin levadura. Las cepas M1 y M2 fueron las que permitieron el menor daño neto (mm) en los frutos, aunque sin diferencia significativa en comparación con M3, M4, M7 y M8 (Cuadro 2). La identificación de las 8 levaduras

attack on hyphae and the competition for nutrients (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008; Nantawanit *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2003). This diversity in mechanisms represents a diverse interval of antagonistic capabilities for the killer yeasts with plant pathogenic fungi, with the possibility



**Figura 2.** Evaluación de los daños ocasionados por diferentes cepas de *G. candidum* en tomate rojo. Se observa la presencia de micelio y ablandamiento en los frutos.

**Figure 2.** Evaluation of the damages caused by different strains of *G. candidum* on red tomatoes. The presence of mycelia and softening of fruits can be observed.

killer obtenida por la prueba API 20 C AUX indicó que todas correspondieron a *Candida (Pichia) guilliermondii*, especie en la cual la actividad killer se conoce desde hace más de 20 años (Polonelli *et al.*, 1987), aunque no fue sino hasta 1991 que se reportó por primera vez su uso como agente de biocontrol (Wisniewski *et al.*, 1991) y su actividad ha sido reportada en diversas ocasiones (Coelho *et al.*, 2009; de Lima *et al.*, 2013; Papon *et al.*, 2013). La diferencia en el daño en presencia de las levaduras killer en comparación a los tratamientos sin levadura y con *C. albicans*, sugieren que el fenotipo killer en las levaduras M1 – M8 está asociado con su antagonismo frente a *G. candidum*. Las diferencias observadas en el daño al fruto permitido por cada levadura podrían explicarse por diferencias en el tipo de toxina killer secretado, que influye en la afinidad al sitio blanco del hongo susceptible y/o en diferencias en la expresión de la toxina, ya que en su mayoría se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Buzzini *et al.*, 2007). Por otro lado, es posible que además de las toxinas killer estas cepas presenten, de forma variable, mecanismos de acción adicionales previamente reportados en *C. guilliermondii*, tales como el ataque directo a las hifas y la competencia por nutrientes (Chanchaichaoovivat *et al.*, 2008; Nantawanit *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2003). Esta diversidad en mecanismos representa un diverso intervalo de capacidades antagónicas para las levaduras killer frente a hongos fitopatógenos, con la posibilidad de que cepas con baja o nula actividad antagónica frente a un género o especie de hongos pueda mostrar una alta actividad antagónica frente a otros, lo que permite opciones amplias de estudio. El empleo de insectos como una fuente no convencional de levaduras resulta atractiva, dada la magnitud de la biodiversidad asociada a estos organismos (Rosa & Gábor, 2006) y a que al menos en algunos casos, las levaduras asociadas representan una relación en

**Cuadro 2.** Valores promedio de la extensión del daño ocasionado por *G. candidum* en los tomates, en cada tratamiento.

**Table 2.** Average values of the extension of the damage caused by *G. candidum* in tomatoes in each treatment.

| Tratamiento                   | Extensión promedio del daño (mm) a las 72h |
|-------------------------------|--------------------------------------------|
| M1                            | 2.0 a <sup>1</sup>                         |
| M2                            | 0.3 a                                      |
| M3                            | 3.5 ab                                     |
| M4                            | 5.2 ab                                     |
| M5                            | 12.7 bc                                    |
| M6                            | 12.7 bc                                    |
| M7                            | 8.0 ab                                     |
| M8                            | 9.0 ab                                     |
| <i>C. albicans</i> ATCC 90028 | 18.8 c                                     |
| Control sin levadura          | 21 c                                       |

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 6 tomates. Valores en cada fila con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) / <sup>1</sup> Each value represents the average of 6 tomatoes. Values in each row with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).

that strains with little or no antagonistic activity towards a genus or species of fungi can show a high antagonistic activity towards others, which allows wide options of study. The use of insects as a non-conventional source of yeasts is attractive, given the size of the biodiversity related to these organisms (Rosa & Gábor, 2006) and the fact that, at least in some cases, associated yeasts represent a relation in which yeast protects the insect from pathogenic fungi (Rodrigues *et al.*, 2009) and with this comes the possibility that this antagonistic mechanism acts against fungi which can be important as plant pathogens.

Although it is clear that they do not represent a direct competition with the efficiency of chemical fungicides due to the speed at which they act, they are an alternative that would help reduce required doses without increasing the damage to the fruits, resulting in products with less concentrations of

la que la levadura confiere protección al insecto de hongos entomopatógenos (Rodrigues *et al.*, 2009) y con ello, la posibilidad de que este mecanismo antagonista sirva también contra hongos de importancia fitopatogénica.

Si bien es claro que no representan una competencia directa con la eficiencia de los fungicidas químicos debido a la velocidad de su acción, son una alternativa que permitiría disminuir las dosis requeridas sin aumentar el daño a los vegetales, teniendo por resultado productos con menos concentraciones de químicos y con ello una disminución a los riesgos de toxicidad para el ser humano.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que es posible aislar levaduras con el fenotipo killer a partir de hormigas del género *Atta* y estas levaduras exhiben un antagonismo variable frente a *G. candidum*. La sola presencia de una levadura no-killer no es suficiente para proteger al tomate del daño causado por *G. candidum*, siendo estadísticamente igual a no inocular ninguna levadura. La cuantificación del daño al fruto, mediante la medición acumulada (mm) del área afectada hacia los lados laterales y el inferior de la lesión, permiten evaluar la protección conferida por la presencia de levaduras antagonistas.

## LITERATURA CITADA

Bautista-Baños S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades de postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagonistas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 8(1):1-6. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81380101>

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A and Visconti A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108(2):204-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>

Buzzini P, Turchetti B and Vaughan-martini AE. 2007. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the

chemicals, and therefore a reduction in the risk of toxicity for humans.

## CONCLUSIONS

Results show that it is possible to isolate yeasts with the killer phenotype from ants of the genus *Atta* and these yeasts display variable antagonism towards *G. candidum*. The mere presence of a non-killer yeast is not enough to protect the tomato from the damage caused by *G. candidum*, making it statistically equal to inoculating no yeast. Quantifying the damage to the fruit by accumulated measurement (mm) of the area affected to the sides and the bottom of the lesion help evaluate the protection conferred by the presence of antagonistic yeasts.

End of the English version

state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Research* 7(6):749-760. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00238.x>

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M, Bueno OC, Hebling MJ and Middelhoven WJ. 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol (Praha)* 47(3):259-262. <https://dx.doi.org/10.1007/BF02817648>

Chanchaichaovivat A, Panijpan B and Ruenwongsa P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control* 47:207-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.018>

Coelho AR, Tachi M, Pagnocca FC, Andrade GM, Hoffman FL, Harada K and Hirooka EY. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives & Contaminants: Part A* 26(1):73-81. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030802227227>

de Lima JR, Gonçalves LR, Brandão LR, Rosa CA and Viana FM. 2013. Isolation, identification, and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology* 53:590-599. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200049>

Hernández-Montiel L, Holguín-Peña J, López-Aburto M y



- Troyo-Diéguez, E. 2011. Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) mediante levaduras marinas y epífitas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792011000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792011000200008&lng=es&nrm=iso)
- Khaled A and Sivasithamparam K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. 47:25-35. <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>
- Nantawanit N, Chanchaichaovivat A, Panijpan B and Ruenwongsa P. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biological Control* 52:145–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.011>
- Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Courdavault V and Sibirny AA. 2013. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics* 59(3):73-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-013-0391-0>
- Polonelli LG, Dettori, C and Morace G. 1987. Biotyping of mycelial fungus cultures by the killer system. *European Journal of Epidemiology* 3:237-242. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00149730>
- Ren X, Kong Q, Wang H, Yu t, Tang YJ, Zhou WW and Zheng X. 2012. Control of apple blue mold by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(5):761-767. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0656-2>
- Robledo-Leal E, Villarreal-Treviño L and González GM. 2012. Occurrence of killer yeasts in isolates of clinical origin. *Tropical Biomedicine* 29(2):297–300. Disponible en línea: [http://www.msptm.org/files/297\\_-\\_300\\_Robledo-Leal\\_E.pdf](http://www.msptm.org/files/297_-_300_Robledo-Leal_E.pdf)
- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M and Pagnocca FC. 2009. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96(3):331-342. <https://dx.doi.org/10.1007/s10482-009-9350-7>
- Rosa MM, Tauk-Tornisielo SM, Rampazzo PE and Ceccato-Antonini SR. 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(8):1491-1502. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0324-8>
- Rosa, C and Gábor, P. 2006. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. First edition. Springer. Berlin, Germany. 580p.
- Ruiz-Martínez J, Vicente AA, Montáñez-Saenz, JC, Rodríguez-Herrera R y Aguilar González, CN. 2012. Un tesoro percedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. *Investigación y Ciencia* 54, 42-48. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408008>
- Santos A, Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150(Pt 8):2527-2534. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27071-0>
- Santos A, Sánchez A and Marquina D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159(4):331-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mires.2004.07.001>
- Scherm B, Ortu G, Muzzu A, Budroni M, Arras G and Migheli Q. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology* 85:205–213. Disponible en línea: <http://www.jstor.org/stable/41998150>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Cierre de la producción agrícola por estado. (consulta: 28 junio 2016). Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Torres-Mireles S. 2013. Actividad antagonista de levaduras frente a hongos en poscosecha. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Second edition. CRC Press. Boca Raton, Fla. 486p.
- Wisniewski M, Biles C, Droby S, McLaughlin R, Wilson C and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:245–258. [http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90033-e](http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765(91)90033-e)

# Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle

## Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica

Santo Ángel Ortega-Acosta<sup>1</sup>, Ciro Velasco-Cruz<sup>2</sup>, Javier Hernández-Morales<sup>1\*</sup>, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez<sup>1</sup> and Javier Hernández-Ruiz<sup>3</sup>. <sup>1</sup> Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. <sup>2</sup> Estadística, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. <sup>3</sup> Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, México. \*Corresponding author: hjavier@colpos.mx

Recibido: 20 de Junio, 2016

Aceptado: 01 de septiembre, 2016

Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández-Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 270-285.  
DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-6  
Primera publicación DOI: 02 de septiembre, 2016  
First DOI published: September 2nd, 2016

### ABSTRACT

Spotted leaves and calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) induced by *Corynespora cassiicola*, is currently considered the main disease for this crop in Mexico. Given its importance, it is necessary to have a standardized method to quantify the disease severity. Therefore, the objective of this study was to develop and validate two diagrammatic logarithmic scales to quantify the severity of this disease. Naturally infected roselle leaves and calyces were collected in Guerrero state commercial plantations, and the actual severity of each of these organs was assessed. The proposed scales, designed from 2LOG program, comprised six classes in

### RESUMEN

El manchado de hojas y cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), inducido por *Corynespora cassiicola*, actualmente es considerada la principal enfermedad de este cultivo en México. Dada su importancia, es necesario contar con un método estandarizado para cuantificar la severidad de la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en desarrollar y validar dos escalas logarítmicas diagramáticas para cuantificar ésta enfermedad. Para ello, se colectaron hojas y cálices de jamaica infectados de manera natural en plantaciones comerciales del estado de Guerrero, y se calculó la severidad real de cada uno de éstos órganos. Las escalas propuestas, diseñadas con el programa 2LOG, comprenden seis clases, en hojas: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) y 5=(>57-70-≤100); en cálices: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) y 5=(>77-87-≤100). Asimismo, se verificó la exactitud, precisión y reproducibilidad de las estimaciones. Se hizo una evaluación en hojas y cálices sin utilizar las escalas, y otras dos

leaves: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) and 5=(>57-70-≤100); in calyces: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) and 5=(>77-87-≤100). The accuracy, precision and reproducibility of the estimates were verified. For leaves and calyces, one evaluation was carried without scale, and two others evaluations were done with scale, each seven days apart. Evaluators showed better levels of accuracy, precision and reproducibility with the scales. The results suggest that the proposed scales are appropriate to estimate the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

**Additional key words:** *Corynespora cassiicola*, *Hibiscus sabdariffa*, measuring disease.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is an important crop for Mexico, as annually around 19,000 hectares are used for its cultivation. Guerrero is the main state producer nationwide where Ayutla and Tecoaapa municipalities provide more than 50 % of the state production (SIAP, 2014). Spotted leaves and calyces induced by *Corynespora cassiicola*, is currently considered the main limiting factor for the production of this crop, as there have been incidence in the order of 100 % (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). The symptoms in leaves consist of circular to irregular spots with straw-colored center, black borders and purple rings, which coalesce into large necrotic lesions. In calyces, initially stage occur sunken spots necrotic of circular or irregular shape, and in advanced stages of infection originated blight (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Despite the importance of this disease, currently there is not a standardized method to assess its severity, which is a fundamental parameter in epidemiological studies and evaluation of management practices, among others. These studies require simple and

evaluaciones utilizando las escalas, a intervalos de siete días. Los evaluadores mostraron mejores grados de exactitud, precisión y reproducibilidad con el uso de las escalas. Los resultados sugieren que las escalas propuestas son apropiadas para estimar la severidad del manchado de hojas y cálices en jamaica.

**Palabras clave adicionales:** *Corynespora cassiicola*, *Hibiscus sabdariffa*, medición de enfermedad.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un cultivo importante para México, anualmente se destinan alrededor de 19,000 hectáreas para su cultivo. A nivel nacional, Guerrero es el principal productor, en dónde los municipios de Ayutla y Tecoaapa aportan más del 50 % de la producción nacional (SIAP, 2014). El manchado de hojas y cálices inducido por *Corynespora cassiicola*, actualmente es considerado el principal factor limitante para la producción de jamaica, ya que se han registrado incidencias del orden del 100 % (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Los síntomas en hojas consisten de manchas circulares a irregulares con centro color pajizo, bordes negros y anillos púrpuras, que al coalescer forman grandes lesiones necróticas. En los cálices, en etapas iniciales se observan manchas necróticas hundidas de forma circulares a irregular, y en etapas avanzadas de infección se genera un tizón (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). A pesar de la importancia de ésta enfermedad, actualmente no se cuenta con un método estandarizado que permita evaluar su severidad, el cual constituye un parámetro fundamental en estudios epidemiológicos y evaluaciones de prácticas de manejo, entre otros. Estos estudios requieren métodos simples y rápidos, con los mismos estándares y que puedan utilizarse en diferentes condiciones. Por lo tanto, dichos métodos tienen que

fast methods with the same standards that can be used under different conditions; thus, they must be accurate, precise, and reproducible. Diagrammatic scales reduce subjectivity and measure accurately and reliably the estimates of the severity of disease (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Belan *et al.*, 2014). These scales must consider representative symptoms of the disease, as well as the maximum and minimum values in field (Tovar-Soto *et al.*, 2002). Furthermore, according to Capucho *et al.* (2011), the diagrammatic scales must be subject to validation before their practical use in order to improve the accuracy and precision of the severity assessments. Current trend is the use of robust evaluation systems, in them is evaluated the accuracy, precision, reproducibility and other attributes. These are important due to the participation of group of evaluators in field, essential epidemiological surveillance systems (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Based on the above, the objective of this study was to develop and validate two diagrammatic logarithmic scales in order to assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

## MATERIALS AND METHODS

### Development of scales

In the municipalities of Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, in based to climatic station (12012) situated at 365 m.a.s.l, these characterized by presented average annual temperature and precipitation of 27 °C and 1519 mm respectively (SMN, 2016). From August to December 2013, in commercial plantations of roselle cv. “Criollo” naturally infected by *Corynespora cassiicola*, 200 leaves and 200 calyces were collected with different levels of severity of spotted (Tovar-Soto

ser exactos, precisos y reproducibles. Las escalas diagramáticas reducen la subjetividad y miden de manera precisa y confiable las estimaciones de la severidad de la enfermedad (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Belan *et al.*, 2014). Estas escalas deben considerar los síntomas representativos de la enfermedad, así como los valores máximo y mínimo presentes en campo (Tovar-Soto *et al.*, 2002). Además, de acuerdo a Capucho *et al.* (2011), antes de utilizarlas en la práctica, las escalas diagramáticas tienen que ser sometidas a validación a fin de mejorar la exactitud y precisión de las evaluaciones de severidad. La tendencia actual, es su utilización en sistemas de evaluaciones robustos, en los cuales se evalúa la exactitud, precisión, reproducibilidad y otros atributos. Estos sistemas son importantes debido a la participación de grupos de evaluadores en condiciones de campo, los cuales resultan esenciales en sistemas de vigilancia epidemiológica (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar dos escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo de las escalas

Con base en la estación meteorológica más cercana (12012) situada a 365 m.s.n.m.; los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero se caracterizan por presentar una temperatura y precipitación promedio anual de 27 °C y 1,519 mm, respectivamente (SMN, 2016). Durante agosto a diciembre de 2013, se colectaron 200 hojas y 200 cálices en plantaciones comerciales de jamaica del cultivar “Criollo” infectados de manera natural por *Corynespora cassiicola*, con diferentes grados de severidad del

*et al.*, 2002; Capucho *et al.*, 2011). Afterwards, 50 leaves and 50 calyces representative of different ranges of severity were visually selected (Belan *et al.*, 2014). The selected leaves and calyces were digitally photographed and with the use of the GIMP® ver. 2.0 software, the background of each image was removed in order to facilitate the quantification of affected area. With the use of the Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2002) software, the total area of each leaf or calyx was quantified, as well as the damaged area (necrotic tissue), then, the percentage of actual severity of the disease was obtained by using the formula:  $\text{severity} = (\text{diseased area} / \text{total image area}) * 100$  (Nutter Jr. *et al.*, 2006). After obtaining the real levels of severity for leaves and calyces, six classes were defined, then the maximum level of severity obtained from leaves and calyces was introduced into the 2LOG program (Osada-Velázquez and Mora-Aguilera, 1997) in order to obtain severity ranges and the midpoint (Tovar-Soto *et al.*, 2002).

### Validation of the scales

In order to validate the scales, 50 leaves and 50 calyces of roselle representative of the different levels of spotted severity were used (Belan *et al.*, 2014). The images were inserted randomly into individual slides to be viewed in Microsoft® PowerPoint® 2010, and they were presented to eight evaluators without experience in the quantification of plant diseases (Celoto and Papa, 2010), and whom conducted three evaluations for leaves and calyces. The first evaluation was made without scales and the two remaining were conducted with scales 7 and 14 days after the first evaluation by the same evaluators (Belan *et al.*, 2014).

In order to quantify the accuracy of the evaluators in the severity assessments, these were compared with the actual severity values obtained

manchado (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Capucho *et al.*, 2011). Posteriormente, se seleccionaron de manera visual 50 hojas y 50 cálices representativos de los diferentes grados de severidad (Belan *et al.*, 2014). Las hojas y cálices seleccionados fueron fotografiados digitalmente y con el programa GIMP® ver. 2.0 se eliminó el fondo de cada imagen para facilitar la cuantificación del área afectada. Con el uso del programa Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2002) se cuantificó el área total de cada una de las hojas y cálices, así como el área afectada (tejido necrótico); con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de severidad real de la enfermedad, aplicando la fórmula:  $\text{severidad} = (\text{área enferma} / \text{área total de la imagen}) * 100$  (Nutter Jr. *et al.*, 2006). Después de obtener los niveles reales de severidad en hojas y cálices, se definieron seis clases; el siguiente paso consistió en capturar el nivel máximo de severidad en hojas y cálices en el programa 2LOG (Osada-Velázquez y Mora-Aguilera, 1997) para obtener los rangos de severidad y el punto medio (Tovar-Soto *et al.*, 2002).

### Validación de las escalas

Para validar las escalas se utilizaron 50 hojas y 50 cálices de jamaica representativos de los diferentes grados de severidad (Belan *et al.*, 2014). Las imágenes se insertaron aleatoriamente en diapositivas individuales para ser visualizadas en Microsoft® PowerPoint® 2010 y se mostraron a ocho evaluadores sin experiencia en la cuantificación de enfermedades de las plantas (Celoto y Papa, 2010), quienes realizaron tres evaluaciones para hojas y tres para cálices, en forma independiente. En la primera evaluación no se utilizaron las escalas; y las dos restantes se realizaron con escalas a los 7 y 14 días después de la primera evaluación por los mismos evaluadores (Belan *et al.*, 2014).

electronically, by a simple linear regression, to verify the following set of hypotheses: for intercept  $H_0: b_0=0$  versus  $H_1: b_0 \neq 0$  and for the slope  $H_0: b_1=1$  versus  $H_1: b_1 \neq 1$ . The evaluation of both sets of hypotheses was performed with a significance level of 5 %. The estimated values of the slope that are significantly different from 1, indicate overestimation ( $>1$ ) or underestimation ( $<1$ ) at all levels of disease severity. While if the intercept estimated values are significantly different from 0, they indicate overestimation ( $>0$ ) or underestimation ( $<0$ ) of the actual severity of the disease, at low severity values (Nutter Jr. and Schultz, 1995).

In addition, the accuracy of the estimates was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression, and the absolute errors which are defined as the difference between the estimated severity by evaluators and the actual severity obtained electronically, both in leaves and calyces were graphed. The reproducibility of the scales was assessed by using the coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression among the severities estimated by the evaluators, combined in pairs (Nutter Jr. and Schultz, 1995).

Data were tabulated in Microsoft® Excel 2010® software, and the statistical analyzes were performed with SAS® program ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTS

### Development of scales

Roselle calyces and leaves under natural conditions of infection collected in field, showed leaves and healthy calyces asymptomatic (0 %), and as values of minimum severity of 0.2 and 2.8 in leaves and calyces respectively, and maximum value of 69.9 % in leaves and over 85 % in calyces.

Para cuantificar la exactitud de las evaluaciones de severidad que hicieron los evaluadores, éstas fueron comparadas con los valores reales de severidad generados de manera electrónica, mediante una regresión lineal simple, para verificar las siguientes hipótesis: para el intercepto  $H_0: b_0=0$  versus  $H_1: b_0 \neq 0$  y para la pendiente  $H_0: b_1=1$  versus  $H_1: b_1 \neq 1$ . La evaluación de ambos juegos de hipótesis se llevó a cabo con un nivel de significancia del 5 %. Los valores estimados de la pendiente que fueron significativamente diferentes de 1, indican sobreestimación ( $>1$ ) o subestimación ( $<1$ ) en todos los niveles de severidad de la enfermedad. Si los valores estimados del intercepto fueron significativamente diferentes de 0, esto indica una sobreestimación ( $>0$ ) o una subestimación ( $<0$ ) de la severidad real de la enfermedad, en niveles bajos de severidad (Nutter Jr. y Schultz, 1995).

Adicionalmente, la precisión de las estimaciones fue determinada por el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la regresión lineal, y se graficaron los errores absolutos, los cuales se definen como la diferencia entre la severidad estimada por los evaluadores y la severidad real obtenida por medios electrónicos, tanto en hojas como en cálices. La reproducibilidad de las escalas se evaluó utilizando el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la regresión lineal entre las severidades estimadas por los evaluadores, combinadas en pares (Nutter Jr. y Schultz, 1995).

Los datos se tabularon en Microsoft® Excel 2010® y los análisis estadísticos se realizaron en SAS® ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS

### Desarrollo de las escalas

Las colectas en campo de cálices y hojas de Jamaica en condiciones naturales de infección, mostraron

Based on the percentages of the damaged area of the 50 leaves and 50 calyces selected, six classes of severity were defined; the range and midpoints of each class (0, 1, 2, 3, 4 and 5) were expressed in percentage of the affected area as follows: for leaves: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4 (>29-42-57) and 5=(>57-70-100); in calyces: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) and 5=(>77-87-100) (Figures 1A and 1B).

### Validation of the scales

In general, the accuracy of evaluations of spotted leaves and calyces was high with or without the use of scales (Tables 1 and 2). Without the use of scales,  $r^2$  values ranged from 0.55 to 0.92 with a 0.79 mean and 0.63 to 0.89 with a 0.80 mean for spotted leaves and calyces, respectively.

With the use of scales,  $r^2$  values ranged from 0.86 to 0.95 with a 0.90 mean and 0.89 to 0.93 with a 0.91 mean for the first and second evaluations of spotted leaves, respectively. For calyces,  $r^2$  values were 0.85 to 0.92 with a 0.90 mean and 0.86 to 0.92 with a 0.89 mean for the first and second evaluations, respectively (Tables 1 and 2). These results show that the estimates were accurate when diagrammatic scales were used.

According to the results of the linear regression, without the use of the scales, the values of the intercept for leaves were significantly different from 0 in two evaluators (25 %), whereas for the slope were statistically different from 1 in three evaluators (37.5 %). In calyces, the intercept values were significantly different from 0 in four evaluators (50 %), whereas for the slope they were statistically different from 1 in two evaluators (25 %). In absolute terms for the intercept, in leaves, five evaluators overestimated (e2, e3, e4, e6 and e7) and three of them underestimated (e1, e5 and e8).

hojas y cálices sanos (0 %), así como valores mínimos de severidad de 0.2 y 2.8 en hojas y cálices, respectivamente, y valores máximos de 69.9 % en las hojas y más de 85 % en cálices.

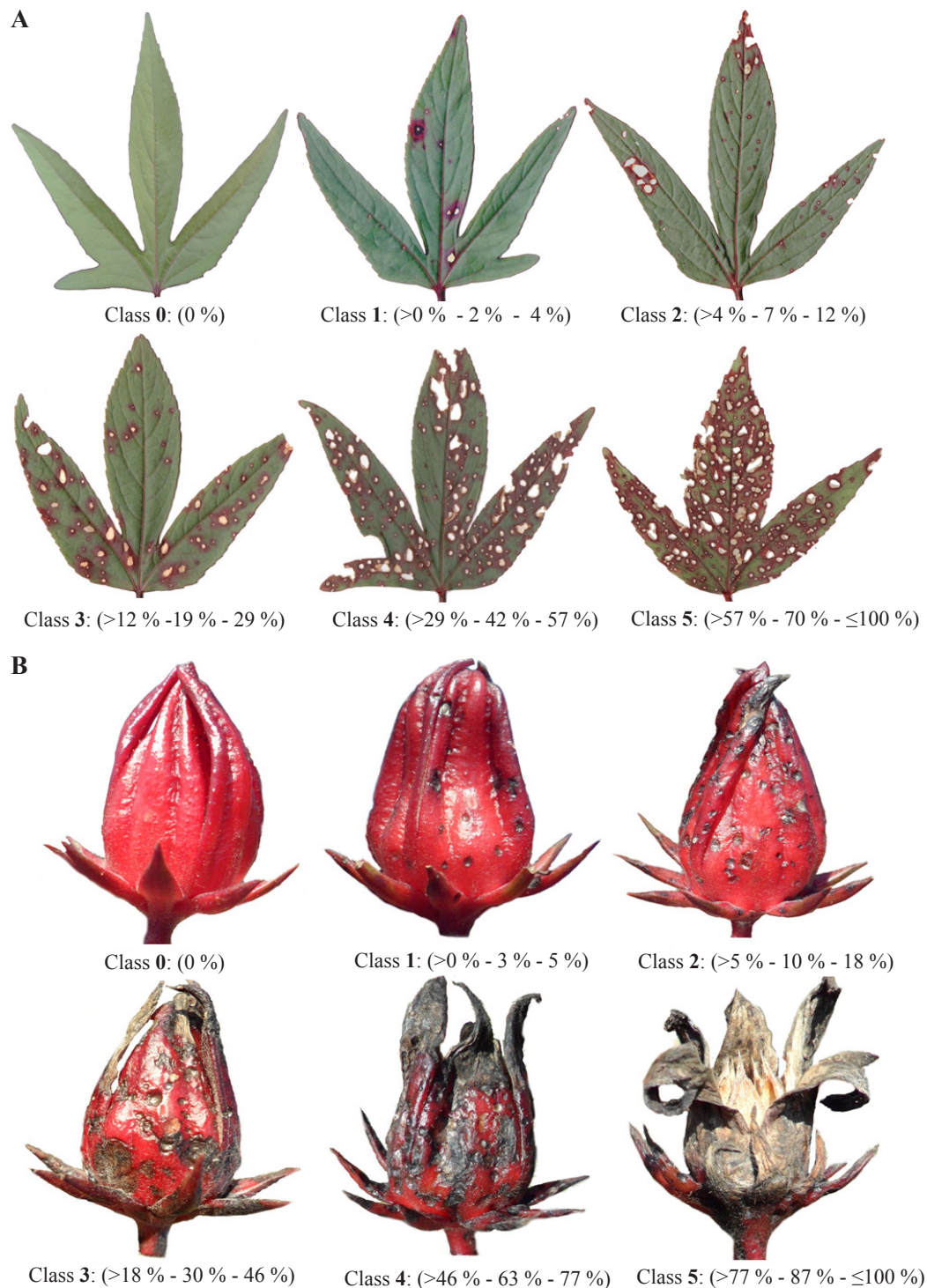
Con base en los porcentajes de área dañada de las 50 hojas y 50 cálices seleccionados, se definieron seis clases de severidad. Los rangos y los puntos medios de cada clase (0, 1, 2, 3, 4 y 5) se expresaron como porcentaje de la superficie afectada. Así, para hojas: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) y 5=(>57-70-100); y para cálices: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) y 5=(>77-87-100) (Figuras 1A y 1B).

### Validación de las escalas

En general, la exactitud de las evaluaciones del manchado de hojas y cálices fue alta, con y sin el uso de escalas (Cuadros 1 y 2). Sin el uso de escalas, los valores de  $r^2$  variaron de 0.55 a 0.92, con una media de 0.79, y de 0.63 a 0.89 con una media de 0.80, para el manchado de hojas y cálices, respectivamente.

Cuando se utilizaron las escalas, los valores de  $r^2$  variaron de 0.86 a 0.95 con una media de 0.90, y de 0.89 a 0.93 con una media de 0.91, en la primera y segunda evaluaciones del manchado de hojas, respectivamente. Para los cálices, los valores de  $r^2$  fueron de 0.85 a 0.92, con una media de 0.90, y de 0.86 a 0.92 con una media de 0.89, en la primera y segunda evaluaciones, respectivamente (Cuadros 1 y 2). Estos resultados muestran que las estimaciones fueron precisas cuando se utilizaron las escalas diagramáticas.

De acuerdo con los resultados de la regresión lineal, cuando no se utilizaron las escalas, los valores del intercepto para hojas fueron significativamente diferentes de 0 en dos evaluadores (25 %), en tanto que los valores de la pendiente fueron



**Figure 1.** Diagrammatic logarithmic scales to assess the spotted severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola*. A) Scale to assess the severity in leaves. B) Scale to assess the severity in calyces.

**Figura 1.** Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola*. A) Escala para evaluar la severidad en hojas. B) Escala para evaluar la severidad en cálices.



**Table 1.** Intercept ( $b_0$ ), slope of the line ( $b_1$ ) and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the equation of the linear regression of the visual estimates of spotted leaves severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), carried out with and without diagrammatic scale, compared to the actual percentages of affected area.**Cuadro 1.** Intercepto ( $b_0$ ), pendiente de la línea ( $b_1$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de la regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del manchado de hojas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), realizadas con y sin escalas diagramáticas, comparadas con los porcentajes reales de área afectada.

| Evaluator | Coefficients  |        |       |                  |        |       |                   |        |       |
|-----------|---------------|--------|-------|------------------|--------|-------|-------------------|--------|-------|
|           | Without scale |        |       | With scale       |        |       |                   |        |       |
|           | $b_0$         | $b_1$  | $r^2$ | First evaluation |        |       | Second evaluation |        |       |
|           | $b_0$         | $b_1$  | $r^2$ | $b_0$            | $b_1$  | $r^2$ | $b_0$             | $b_1$  | $r^2$ |
| e1        | 0.60ns        | 1.08ns | 0.84  | 1.98ns           | 1.03ns | 0.89  | -0.03ns           | 1.07ns | 0.93  |
| e2        | 2.24ns        | 1.11*  | 0.92  | 0.14ns           | 1.01ns | 0.88  | -0.28ns           | 1.09ns | 0.89  |
| e3        | 1.58ns        | 0.83*  | 0.80  | 1.20ns           | 1.12*  | 0.95  | 2.29ns            | 0.99ns | 0.91  |
| e4        | 10.57*        | 1.14ns | 0.76  | 1.73ns           | 1.11ns | 0.89  | 2.22ns            | 1.09ns | 0.91  |
| e5        | -0.63ns       | 0.95ns | 0.88  | -0.23ns          | 1.00ns | 0.86  | 1.65ns            | 0.98ns | 0.89  |
| e6        | 2.93ns        | 0.97ns | 0.76  | 0.18ns           | 1.06ns | 0.93  | 0.88ns            | 1.01ns | 0.92  |
| e7        | 5.42*         | 0.65*  | 0.55  | 1.63ns           | 1.01ns | 0.87  | 1.47ns            | 1.01ns | 0.90  |
| e8        | 0.59ns        | 0.96ns | 0.83  | 1.10ns           | 1.09*  | 0.95  | 0.70ns            | 1.05ns | 0.92  |
| Average   |               |        | 0.79  |                  |        | 0.90  |                   |        | 0.91  |

ns= Not significant / ns= No significativo.

\* Situation where the null hypothesis ( $b_0=0$  or  $b_1=1$ ) was rejected by the  $t$ -test ( $P=0.05$ ) / \* Situación en dónde la hipótesis nula ( $b_0=0$  o  $b_1=1$ ) fue rechazada por la prueba  $t$  ( $P=0.05$ ).**Table 2.** Intercept ( $b_0$ ), slope of the line ( $b_1$ ) and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the equation of linear regression of the visual estimates of spotted calyces severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), carried out with and without diagrammatic scale, compared to the actual percentages of affected area.**Cuadro 2.** Intercepto ( $b_0$ ), pendiente de la línea ( $b_1$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de la regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del manchado de cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), realizadas con y sin escalas diagramáticas, comparadas con los porcentajes reales de área afectada.

| Evaluator | Coefficients  |        |       |                  |        |       |                   |        |       |
|-----------|---------------|--------|-------|------------------|--------|-------|-------------------|--------|-------|
|           | Without scale |        |       | With scale       |        |       |                   |        |       |
|           | $b_0$         | $b_1$  | $r^2$ | First evaluation |        |       | Second evaluation |        |       |
|           | $b_0$         | $b_1$  | $r^2$ | $b_0$            | $b_1$  | $r^2$ | $b_0$             | $b_1$  | $r^2$ |
| e1        | 2.34ns        | 0.80*  | 0.74  | -0.78ns          | 1.16*  | 0.91  | 0.92ns            | 1.06ns | 0.90  |
| e2        | 2.93ns        | 1.06ns | 0.82  | -1.72ns          | 1.08ns | 0.89  | -1.24ns           | 1.06ns | 0.90  |
| e3        | 5.91*         | 1.04ns | 0.86  | 0.08ns           | 1.02ns | 0.91  | 0.77ns            | 1.10ns | 0.91  |
| e4        | 10.05*        | 1.04ns | 0.83  | 1.16ns           | 1.10ns | 0.90  | 1.48ns            | 1.08ns | 0.86  |
| e5        | 4.46*         | 1.09ns | 0.89  | -1.81ns          | 1.09ns | 0.85  | -1.09ns           | 1.09ns | 0.89  |
| e6        | 10.15*        | 0.90ns | 0.63  | -0.35ns          | 1.06ns | 0.92  | -1.24ns           | 1.06ns | 0.92  |
| e7        | 1.66ns        | 0.82*  | 0.79  | 0.61ns           | 1.08ns | 0.89  | 1.38ns            | 1.10ns | 0.88  |
| e8        | 1.64ns        | 1.08ns | 0.86  | 1.68ns           | 1.07ns | 0.89  | -0.19ns           | 0.99ns | 0.87  |
| Average   |               |        | 0.80  |                  |        | 0.90  |                   |        | 0.89  |

ns= Not significant / ns= No significativo.

\* Situation where the null hypothesis ( $b_0=0$  or  $b_1=1$ ) was rejected by the  $t$ -test ( $P=0.05$ ) / \* Situación en dónde la hipótesis nula ( $b_0=0$  o  $b_1=1$ ) fue rechazada por la prueba  $t$  ( $P=0.05$ ).

In calyces, all evaluators showed tendencies to overestimation. For the slope in absolute terms, in leaves, three evaluators overestimated (e1, e2 and e4) and five underestimated (e3, e5, e6, e7 and e8). While in calyces five evaluators overestimated (e2, e3, e4, e5 and e8) and three underestimated (e1, e6 and e7) (Tables 1 and 2).

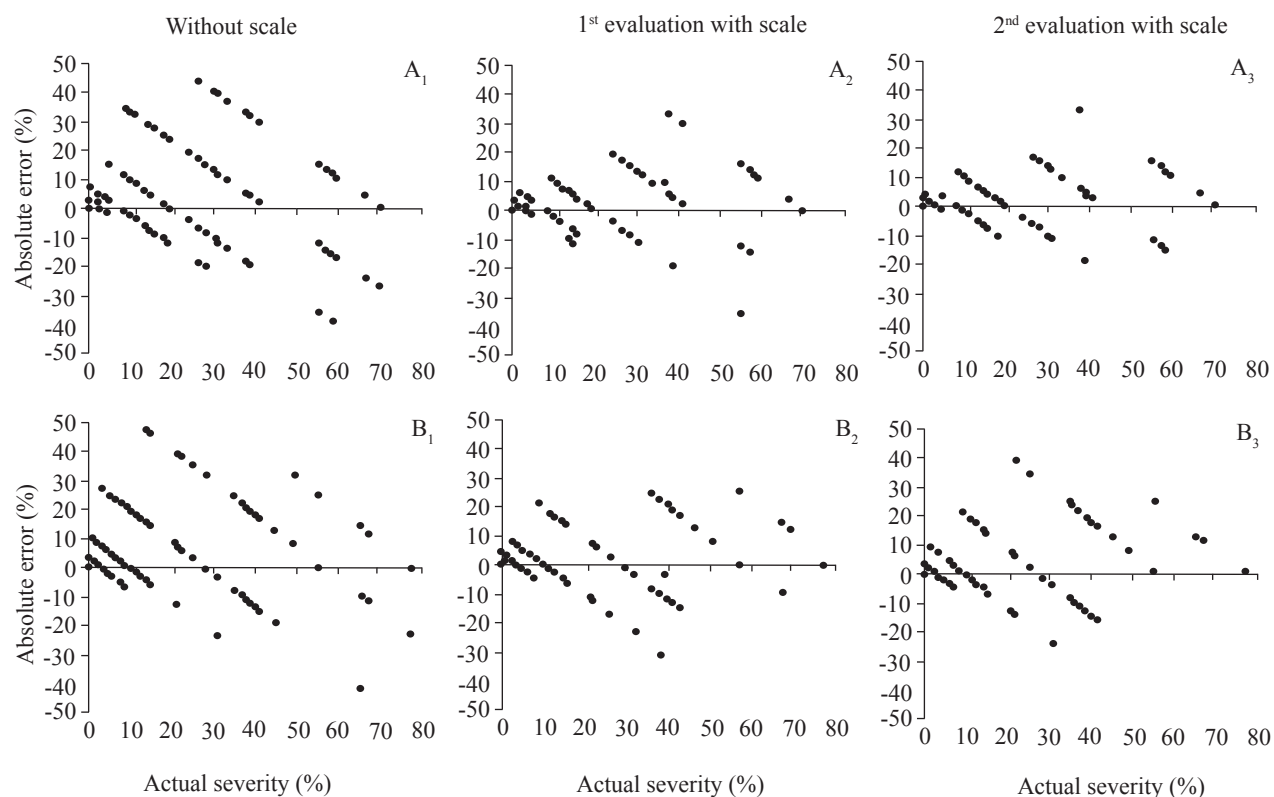
On the other hand, with the use of scales a tendency to improve the accuracy of severity estimates, in leaves and calyces, was observed, the values of the intercept of all evaluators were not significantly different from 0 in the first and second evaluations in both cases (Tables 1 and 2). Additionally, in the case of leaves, the values of the slope of the linear regression were statistically different from 1 in two evaluators (25 %), whereas in the second evaluation, values statistically equal to 1 were obtained in all evaluators. In calyces, the slope of the line was statistically different from 1 in one evaluator (12.5 %), while in the second evaluation values non-statistically different from 1 were obtained in all the evaluators. These results show that there is a good precision with the use of the proposed scales to assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

Moreover, in all cases, highest absolute errors were obtained without the use of scales. In leaves without scale, a range of 43.81 to -39.48 was obtained as maximum and minimum values respectively, whereas with the scales, an average range of 32.28 to -27.95 was obtained in both assessments. In calyces, without the scale a range of 47.13 to -63.45 was obtained, and when scales were used, the average range of the two evaluations was 31.46 to -27.88 (Figure 2). In the evaluations of leaves, without scale, 30.5% of the absolute errors were outside of -10 and +10, while in calyces values were 34.25 %. With the use of scales, these values were 21.75 % and 19.5%, and 23.75 % and 23.0 % for the first and second assessments of leaves and calyces, respectively.

estadísticamente diferentes de 1 en tres evaluadores (37.5 %). En cálices, los valores del intercepto fueron significativamente diferentes de 0 en cuatro evaluadores (50 %), en tanto que para la pendiente, los valores fueron estadísticamente diferentes de 1 en dos evaluadores (25 %). En términos absolutos para el intercepto, en hojas, cinco evaluadores sobreestimaron (e2, e3, e4, e6 y e7) y tres subestimaron (e1, e5 y e8). En cálices, todos los evaluadores tendieron a la sobreestimación. Para la pendiente, en términos absolutos, en hojas, tres evaluadores sobreestimaron (e1, e2 y e4) y cinco subestimaron (e3, e5, e6, e7 y e8). En cálices, cinco evaluadores sobreestimaron (e2, e3, e4, e5 y e8) y tres subestimaron (e1, e6 y e7) (Cuadros 1 y 2).

Por otra parte, cuando se utilizaron las escalas, se observó una tendencia a mejorar la exactitud de las estimaciones de la severidad tanto en hojas como en cálices; en ambos casos, los valores del intercepto en todos los evaluadores no fueron significativamente diferentes de 0 en la primera y la segunda evaluaciones (Cuadros 1 y 2). Además, en el caso de las hojas, los valores de la pendiente de la regresión lineal fueron estadísticamente diferentes de 1 en dos evaluadores (25 %), en tanto que, en la segunda evaluación, los valores que se obtuvieron fueron estadísticamente iguales a 1 para todos los evaluadores. En los cálices, la pendiente de la línea fue estadísticamente diferente de 1 en un evaluador (12.5 %), en tanto que en la segunda evaluación, se obtuvieron valores los cuales no fueron estadísticamente diferentes de 1 en todos los evaluadores. Estos resultados muestran que la precisión es buena cuando se utilizan las escalas propuestas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica.

Por otra parte, en todos los casos, los mayores errores absolutos se obtuvieron sin el uso de las escalas. En hojas, sin escala, se obtuvo un rango de 43.81 a -39.48 como valores máximos y mínimos respectivamente, mientras que con las escalas



**Figure 2.** Distribution of residuals (estimated severity – actual severity) of the severity evaluations of spotted leaves and calyces of roselle. (A) Leaves: A1; without scale. A2; first evaluation with scale. A3; second evaluation with scale. (B) Calyces: B1; without scale. B2; first evaluation with scale. B3; second evaluation with scale.

**Figura 2.** Distribución de residuales (severidad estimada – severidad real) de las evaluaciones de la severidad del manchado de hojas y cálices en jamaica. (A) Hojas: A1; sin escala. A2; primera evaluación con escala. A3; segunda evaluación con escala. (B) Cálices: B1; sin escala. B2; primera evaluación con escala. B3; segunda evaluación con escala.

Diagrammatic scales were reproducible. In the case of leaves, without the use of the scale, the  $r^2$  values were 0.39 to 0.86 with 0.69 average. By using the scale, the  $r^2$  values were from 0.81 to 0.95 and from 0.83 to 0.96 in the first and second evaluations respectively (0.88 average), and they were  $>0.80$  in 100 % of the combinations of evaluators (Table 3). In calyces, without the use of the scale, the  $r^2$  values were from 0.46 to 0.90, and 0.68 average. With scale, the  $r^2$  values were from

el rango promedio fue de 32.28 a -27.95 en ambas evaluaciones. En cálices, sin las escalas, se obtuvo un rango de 47.13 a -63.45, y cuando se utilizaron las escalas, el rango promedio de las dos evaluaciones fue de 31.46 a -27.88 (Figura 2). En evaluaciones de hojas, sin las escalas, 30.5 % de los errores absolutos estuvieron fuera de -10 y +10, mientras que en cálices el valor fue de 34.25 %. Con el uso de las escalas, estos valores fueron de 21.75 % y 19.5 %, y de 23.75 % y 23.0 %, en la primera y la

**Table 3.** Coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression equation related to the estimations of severity of spotted leaves of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola* between evaluators in pairs, with and without diagrammatic scale.

**Cuadro 3.** Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de la regresión lineal relacionada con las estimaciones de la severidad del manchado de hojas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola* entre evaluadores en pares, con y sin escala diagramática.

| Evaluators                    | e2   | e3   | e4   | e5   | e6   | e7   | e8   |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Without scale                 |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.86 | 0.72 | 0.68 | 0.81 | 0.75 | 0.53 | 0.74 |
| e2                            |      | 0.75 | 0.77 | 0.80 | 0.71 | 0.46 | 0.84 |
| e3                            |      |      | 0.71 | 0.76 | 0.77 | 0.39 | 0.76 |
| e4                            |      |      |      | 0.63 | 0.69 | 0.51 | 0.65 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.79 | 0.55 | 0.76 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.46 | 0.70 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.68 |
| First evaluation with scale.  |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.92 | 0.84 | 0.91 | 0.84 | 0.85 | 0.81 | 0.83 |
| e2                            |      | 0.83 | 0.88 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.84 |
| e3                            |      |      | 0.84 | 0.84 | 0.90 | 0.88 | 0.95 |
| e4                            |      |      |      | 0.83 | 0.88 | 0.84 | 0.86 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.91 | 0.86 | 0.90 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.83 | 0.94 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.89 |
| Second evaluation with scale. |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.89 | 0.87 | 0.90 | 0.86 | 0.91 | 0.89 | 0.90 |
| e2                            |      | 0.83 | 0.93 | 0.85 | 0.89 | 0.84 | 0.87 |
| e3                            |      |      | 0.91 | 0.89 | 0.88 | 0.90 | 0.85 |
| e4                            |      |      |      | 0.89 | 0.89 | 0.91 | 0.91 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.90 | 0.87 | 0.86 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.93 | 0.96 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.96 |

0.81 to 0.95, and from 0.83 to 0.96 in the first and second evaluations, respectively, (0.84 average) and they were  $\geq 0.80$  in 82.14 % of the cases (Table 4).

## DISCUSSION

The diagrammatic scales improve the accuracy and precision of the evaluation of the severity of different diseases (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006) by allowing a better approach of the actual percentage of affected tissue. With the scales developed in this research, the precision and

segunda evaluaciones de hojas y cálices, respectivamente.

Las escalas diagramáticas fueron reproducibles. En el caso de las hojas, sin las escalas, los valores de  $r^2$  fueron de 0.39 a 0.86 con un promedio de 0.69. Utilizando las escalas, los valores de  $r^2$  fueron de 0.81 a 0.95, y de 0.83 a 0.96, en la primera y la segunda evaluaciones, respectivamente (0.88 en promedio), y fueron  $> 0.80$  en 100 % de las combinaciones de evaluadores (Cuadro 3). En los cálices, sin el uso de las escalas, los valores de  $r^2$  fueron de 0.46 a 0.90 (0.68 en promedio). Con las escalas, los valores de  $r^2$  fueron de 0.81 a 0.95, y de 0.83 a 0.96,

**Table 4.** Coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression equation related to the estimations of severity of spotted calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola* between evaluators in pairs, with and without diagrammatic scale.**Cuadro 4.** Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de la regresión lineal relacionada con los estimados de la severidad del manchado de cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola* entre evaluadores en pares, con y sin escala diagramática.

| Evaluators                    | e2   | e3   | e4   | e5   | e6   | e7   | e8   |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Without scale                 |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.63 | 0.64 | 0.64 | 0.63 | 0.47 | 0.83 | 0.63 |
| e2                            |      | 0.75 | 0.69 | 0.73 | 0.64 | 0.62 | 0.68 |
| e3                            |      |      | 0.87 | 0.90 | 0.60 | 0.65 | 0.80 |
| e4                            |      |      |      | 0.82 | 0.59 | 0.70 | 0.76 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.63 | 0.61 | 0.82 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.46 | 0.55 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.76 |
| First evaluation with scale.  |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.79 | 0.87 | 0.81 | 0.92 | 0.90 | 0.88 | 0.91 |
| e2                            |      | 0.81 | 0.84 | 0.74 | 0.78 | 0.80 | 0.73 |
| e3                            |      |      | 0.85 | 0.82 | 0.93 | 0.86 | 0.80 |
| e4                            |      |      |      | 0.78 | 0.91 | 0.77 | 0.77 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.86 | 0.87 | 0.86 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.83 | 0.86 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.87 |
| Second evaluation with scale. |      |      |      |      |      |      |      |
| e1                            | 0.93 | 0.76 | 0.85 | 0.89 | 0.86 | 0.82 | 0.91 |
| e2                            |      | 0.81 | 0.91 | 0.87 | 0.90 | 0.88 | 0.91 |
| e3                            |      |      | 0.76 | 0.79 | 0.84 | 0.87 | 0.80 |
| e4                            |      |      |      | 0.86 | 0.85 | 0.82 | 0.83 |
| e5                            |      |      |      |      | 0.83 | 0.83 | 0.85 |
| e6                            |      |      |      |      |      | 0.88 | 0.81 |
| e7                            |      |      |      |      |      |      | 0.81 |

accuracy of the severity spotted leaves and calyces of roselle, was improved; this improvement has been observed in the severity assessment of other diseases (Capucho *et al.*, 2011; Mengue *et al.*, 2013). Besides, in the present study the evaluations were made by people inexperienced in this activity.

The  $r^2$  values obtained for the scales developed in leaves and calyces were  $\geq 0.85$ , therefore, they are considered accurate (Belan *et al.*, 2014). Godoy *et al.* (2006) evaluated the severity of soy rust induced by *Phakopsora pachyrhizi* with and without diagrammatic scale, and they determined that the  $r^2$  values improved when the scale was used. In addition, numerous authors have found that when

en la primera y la segunda evaluaciones, respectivamente (0.84 en promedio), y fueron  $\geq 0.80$  en 82.14% de los casos (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

Las escalas diagramáticas mejoran la exactitud y la precisión en la evaluación de la severidad de diferentes enfermedades (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006), al permitir una mejor estimación del porcentaje real de tejido afectado. Con las escalas desarrolladas en este estudio, se mejoró la precisión y exactitud en las estimaciones de la

scales are used to assess severity, the estimates are more accurate (Michereff *et al.*, 2006).

In studies conducted in agricultural pathosystems, there have been tendencies to overestimation when no scales are used (Capucho *et al.*, 2011; Belan *et al.*, 2014). However, there have also been some cases of underestimation (Gomes *et al.*, 2004). In the present study, when evaluations without scales were carried, there were tendencies to overestimation of 50 % in leaves, i.e. overestimates and underestimates were present in the same proportion. However, in calyces there were tendencies to overestimation in 81.25 % of the evaluators, without scales.

As for the evaluated hypotheses for the intercept ( $b_0$ ) and the slope ( $b_1$ ), they had more rejections in leaves and calyces when the scales were not used (Tables 1 and 2), similar results have been obtained by other authors (Michereff *et al.*, 2006; Librelon *et al.*, 2015). In the first evaluation with scale in leaves, two slope values were different from 1. In calyces, only one value was significantly different from 1. Additionally, in the second evaluations for leaves and calyces with scale, in any case, there were no significantly different values from 0 and 1 for the intercept and the slope, respectively. Therefore, the evaluations for leaves and calyces are considered accurate with the use of scales. In Mexico, actually using diagrammatic scales are part of regional system assessment coffee rust (*Hemileia vastatrix*), where 60 trained evaluators located in the coffee producing regions, is assessed weekly severity of the disease in field, through data platform assessments and the accuracy and precision are concentrated. This is part of robust evaluation system diseases, important epidemiological surveillance systems (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; DGSV-CNRF, 2016).

According to the criteria used in evaluations of scale, absolute errors values below 5 % are considered excellent, while up to 10 % are

severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica. Esta mejora, ha sido observada al evaluar la severidad de otras enfermedades (Capucho *et al.*, 2011; Mengue *et al.*, 2013). Cabe mencionar que las evaluaciones del presente estudio las realizaron personas sin experiencia en esta actividad.

Los valores de  $r^2$  que se obtuvieron con las escalas en hojas y cálices fueron  $\geq 0.85$ , y por tanto se consideran precisas (Belan *et al.*, 2014). Godoy *et al.* (2006) evaluaron la severidad de la roya en soya inducida por *Phakopsora pachyrhizi*, con y sin escalas diagramáticas, y concluyeron que los valores de  $r^2$  mejoraron cuando se utilizaron las escalas. Además, numerosos autores han comprobado que cuando se utilizan escalas para evaluar la severidad, se obtienen estimaciones más precisas (Michereff *et al.*, 2006).

En estudios realizados en patosistemas agrícolas, se han observado tendencias a la sobreestimación cuando no se utilizan escalas diagramáticas (Capucho *et al.*, 2011; Belan *et al.*, 2014). Sin embargo, también se han registrado algunos casos de subestimación (Gomes *et al.*, 2004). En el presente estudio en evaluaciones sin escalas, en términos absolutos hubo una sobreestimación del 50 % en hoja, es decir, las sobreestimaciones y subestimaciones se presentaron en la misma proporción. No obstante, en cálices se observaron tendencias a la sobreestimación en 81.25 % de los evaluadores sin el uso de la escala.

Respecto a las hipótesis evaluadas para el intercepto ( $b_0$ ) y la pendiente ( $b_1$ ), se observaron más rechazos en hojas y cálices cuando no se utilizaron las escalas (Cuadros 1 y 2); otros autores han obtenido resultados similares (Michereff *et al.*, 2006; Librelon *et al.*, 2015). En la primera evaluación en hojas con el uso de la escala, dos valores de la pendiente fueron diferentes de 1. En cálices, solo un valor fue significativamente diferente de 1. Mientras que, en la segunda evaluación de las hojas y los

acceptable (Nutter Jr. and Schultz, 1995). In this study, a tendency to decrease the absolute errors was observed, especially in this range when the scales were used. In leaves with the use of the scales, the absolute error between -10 and +10 of the first and second evaluations was 79.38 % in average, and 76.63 % in calyces. While, without scales, were 69.5 % and 65.75 % for leaves and calyces, respectively. Similar results have been obtained by Celoto and Papa (2010) and Belan *et al.* (2014).

The reproducibility of the estimates was determined by the  $r^2$  value of the linear regression between evaluators in pairs with and without scale. Without the use of scales, a 0.69  $r^2$  value was obtained for leaves, and 0.68 for calyces. The highest  $r^2$  values were obtained when using the scales (the average of the first and second evaluations was 0.88 and 0.84, in leaves and calyces, respectively), besides  $r^2$  values  $\geq 0.80$  were obtained in 100 % of the combinations between evaluators for leaves; while in evaluations for calyces, in more than 80 % of the cases the  $r^2$  values were  $\geq 0.80$ . Similar results have been obtained in evaluations of diagrammatic scales for severity in other plant pathosystems (Belan *et al.*, 2014). The above demonstrates that estimations with the scales developed in this research were reproducible.

## CONCLUSIONS

The diagrammatic logarithmic scales of six classes proposed to assess severity the spotted leaves and calyces of roselle, induced by *Corynespora cassiicola*, provided good accuracy, precision and reproducibility of the estimates.

cálices, utilizando las escalas, en todos los casos, no se observaron valores significativamente diferentes de 0 y 1 para el intercepto y la pendiente, respectivamente. Por tanto, se considera que las evaluaciones de hojas y cálices fueron exactas cuando se utilizaron las escalas. En México, recientemente las escalas diagramáticas se utilizan como parte de un sistema regional de evaluación de severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*), en el cual 60 evaluadores debidamente capacitados ubicados en las zonas productoras de café, evalúan semanalmente la severidad de ésta enfermedad en campo, a través de una plataforma en la que se concentran los datos de exactitud y precisión. Lo anterior forma parte de un sistema robusto de evaluación de enfermedades, esenciales en sistemas de vigilancia epidemiológica (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; DGSV-CNRF, 2016).

De acuerdo con los criterios aplicados en las evaluaciones de escalas, valores de errores absolutos menores a 5 % se consideran excelentes, y valores de hasta 10 % son aceptables (Nutter Jr. y Schultz, 1995). En este estudio, se observó que los valores absolutos tendieron a reducir, sobre todo en éste rango cuando se utilizaron las escalas. En hojas, cuando se utilizaron las escalas, el error absoluto de entre -10 y +10 en la primera y segunda evaluaciones fue de 79.38 % en promedio, y de 76.63 % en cálices. Sin las escalas, fueron de 69.5 % y 65.75 % para las hojas y los cálices, respectivamente. Celoto y Papa (2010) y Belan *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares.

La reproducibilidad de las estimaciones fue determinada por el valor de  $r^2$  de la regresión lineal entre los evaluadores en pares, con y sin las escalas. Sin utilizar las escalas, el valor de  $r^2$  fue de 0.69 en hojas, y de 0.68 en cálices. Los valores más altos de

### Acknowledgements

The first author is grateful to CONACYT by the scholarship assigned to doctoral studies. The project "163972" of Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT by have financed this research. To the technicians of the Consejo Estatal de la Jamaica and Desarrollo Rural de Tecoaapa, Guerrero, by have participated in validations of logarithmic scales.

### REFERENCES

- Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Souza RM, Jesus Junior WC and Oliveira JM. 2014. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. *Journal of Phytopathology* 162:801-810. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12272>
- Barbosa MAG, Michereff SJ and Mora-Aguilera G. 2006. Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate white rust severity in chrysanthemum. *Summa Phytopathologica* 32:57-62. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000100008>.
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS and Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* 60:1144-1150. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x
- Celoto MIB and Papa MFS. 2010. Design and validation of diagrammatic scale for assessment of target spot in Barbados cherry leaf. *Tropical Plant Pathology* 35:258-262. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000400010>
- DGSV-CNRF. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de la Roya del Café 2016. <http://royacafe.lanref.org.mx/index.php> (Acceded, July 2016)
- Godoy CV, Koga LJ and Canteri MC. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:63-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
- Gomes AMA, Michereff SJ and Mariano RLR. 2004. Elaboracao e validacao de escala diagramatica para cercosporiose da alfaca. *Summa Phytopathologica* 30:38-42. Available online: <http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/hortalicas/samiescaif.pdf>
- Librelon SS, Souza EA, Pereira R, Pozza EA and Abreu AFB. 2015. Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. *Australasian Plant Pathology* 44:385-395. doi: 10.1007/s13313-015-0360-9
- Martins MC, Guerzoni RA, Cámara GMdS, Mattiazzi P, Lourenço SA and Amorim L. 2004. Diagrammatic scale for assessment of late season leaf diseases in soybean. *Fitopatologia Brasileira* 29:179-184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000200009>
- Michereff SJ, Noronha MA, Andrade DEGT, Oliveira EP, Filha MS and Moreira PAA. 2006. Development and validation of a diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot

$r^2$  se obtuvieron cuando se utilizaron las escalas (el promedio de la primera y la segunda evaluaciones fue de 0.88 y 0.84, en hojas y cálices, respectivamente); además, se obtuvieron valores de  $r^2 \geq 0.80$  en 100% de las combinaciones entre los evaluadores en hojas, mientras que en las evaluaciones en cálices, en más del 80% de los casos los valores de  $r^2$  fueron  $\geq 0.80$ . Se han obtenido resultados similares en evaluaciones utilizando las escalas diagramáticas para estimar la severidad de enfermedades en otros patosistemas (Belan *et al.*, 2014). Lo anterior demuestra que las estimaciones obtenidas con las escalas desarrolladas en la presente investigación fueron reproducibles.

### CONCLUSIONES

Las escalas logarítmicas diagramáticas de seis clases propuestas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica inducido por *Corynespora cassiicola*, proporcionaron buena exactitud, precisión y reproducibilidad en las estimaciones.

### Agradecimientos

El primer autor agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado. Al proyecto "163972" del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT por haber financiado la presente investigación. A los técnicos del Consejo Estatal de la jamaica y Desarrollo Rural de Tecoaapa, Guerrero, por su participación en las validaciones de las escalas logarítmicas.

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

- of sweet pepper. *Summa Phytopathologica* 32:260-266. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000300008>
- Menge D, Makobel M, Shomari S and Tiedemann AV. 2013. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of cashew blight for epidemiological studies. *International Journal of Advanced Research* 1(4):26-38.



- Available online: <http://journaldatabase.info/articles/development-validation-diagrammatic.html>
- Mora-Aguilera G, Acevedo G, Flores J, Dominguez S, Coria J, Hernandez A, Gonzalez R, Lopez A, Sanchez H, Feria J, Trujillo J, Lopez E, Mendez A, Matuz J and Martinez M. 2014. Epidemiological surveillance system for coffee rust disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a regional approach. The 25<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science. ASIC Colombia 7 p. Available online: <http://www.asic-cafe.org/fr/proceedings/6266/toc/7/conf>
- Nutter Jr. FW and Schultz PM. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. Canadian Journal of Plant Pathology 17:174-184. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669509500709>
- Nutter Jr. FW, Esker PD and Coelho-Netto RA. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. European Journal of Plant Pathology 115:95-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. Plant Disease 99:1041. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Osada-Velázquez HK and Mora-Aguilera G. 1997. 2LOG. Programa para desarrollar escalas de severidad por el método de Horsfall y Barratt. Manual del Usuario. Montecillo, estado de México, Colegio de Postgraduados
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- SIAP. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351). (Accessed, April 2016)
- SMN. 2016. Servicio meteorológico nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Periodo (1981-2010). [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion) (Accessed, April 2016)
- Tovar-Soto A, Hernández-Martínez M, Cristobal-Alejo J, Romero-Hijo R and Mora-Aguilera G. 2002. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). Revista Mexicana de Fitopatología 20:103-109. Available online: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220117>
- UTHSCSA. 2002. Image Tool Version 3.0 Final. S. Brent Dove. [dove@uthscsa.edu](mailto:dove@uthscsa.edu) Dental Diagnostic Science, Last revised: 22 February 2002. Available at: <http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>

# Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants

## Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas

Hernan Garcia-Ruiz<sup>1</sup>, Mayra Teresa Garcia Ruiz<sup>2</sup>, Sergio Manuel Gabriel Peralta<sup>1</sup>, Cristina Betzabeth Miravel Gabriel<sup>1</sup> and Kautar El-Mounadi<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Department of Plant Pathology, Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68583 USA. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, México, CP 56230. <sup>3</sup>Department of Biology, Kutztown University of Pennsylvania, Kutztown, PA 19530 USA. Autor de correspondencia: H. Garcia-Ruiz: hgarcia Ruiz2@unl.edu

Recibido: 30 de Junio, 2016

Aceptado: 01 de Septiembre, 2016.

García-Ruiz H, García-Ruiz MT, Gabriel-Peralta SM, Miravel-Gabriel CB and El-Maunadi K. 2016. Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 286-307.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-8](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-8)

Primera publicación DOI: 02 de septiembre, 2016.

First DOI published: September 2nd, 2016.

### RESUMEN

Las enfermedades virales en plantas causan pérdidas económicas importantes al reducir la calidad y rendimiento de los cultivos, lo que amenaza la seguridad alimentaria en algunos países. Dada la escasez de recursos naturales, plantas con resistencia genética a virus han sido desarrolladas con éxito por ingeniería genética. Un buen entendimiento de los mecanismos básicos que controlan las interacciones entre virus y plantas, incluido el silenciamiento génico de virus por ácido ribonucleico

### ABSTRACT

Viral diseases of plants cause important economic losses due to reduction in crop quality and quantity to the point of threatening food security in some countries. Given the reduced availability of natural sources, genetic resistance to viruses has been successfully engineered for some plant-virus combinations. A sound understanding of the basic mechanisms governing plant-virus interactions, including antiviral RNA silencing, is the foundation to design better management strategies and biotechnological approaches to engineer and implement antiviral resistance in plants. In this review, we present current molecular models to explain antiviral RNA silencing and its application in basic plant research, biotechnology and genetic engineering.

**Key words:** Plant viruses, gene silencing, antiviral defense, transgenic plants, genetic engineering of virus resistance.

(ARN) de interferencia, es necesario para diseñar mejores estrategias de manejo y métodos biotecnológicos que servirán para desarrollar e implementar resistencia antiviral en plantas. En esta revisión, presentamos modelos moleculares vigentes para explicar el silenciamiento génico de virus por ARN de interferencia y sus aplicaciones en biotecnología e ingeniería genética de plantas.

**Palabras clave:** Virus de plantas, silenciamiento génico, ARN de interferencia, defensa antiviral, plantas transgénicas, ingeniería genética de resistencia a virus.

El silenciamiento génico por ácido ribonucleico (ARN) es un sistema de inactivación de genes mediado por moléculas pequeñas de ARN interferentes (RNAi) que guían el corte endonucleolítico y la degradación o represión de la traducción de ARN mensajeros, o bloquean la transcripción (Cuperus *et al.*, 2010). El silenciamiento génico tiene funciones esenciales en el desarrollo, la respuesta al estrés y en la expresión y el mantenimiento del genoma (Ding and Voinnet, 2007). Las funciones y las actividades del silenciamiento génico están conservadas en eucariotas. En plantas, nematodos e insectos, el silenciamiento génico es un componente esencial de la inmunidad antiviral (Ding and Voinnet, 2007).

Las plantas usan el silenciamiento génico para regular la expresión de genes en una manera temporal y específica en órganos y tejidos (Chitwood *et al.*, 2009). Además, las plantas usan el sistema de silenciamiento génico para prevenir, restringir y eliminar infecciones virales (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). En interacciones plantas-virus, el establecimiento de enfermedad o resistencia depende en gran parte del balance entre el silenciamiento génico del virus

RNA silencing is a sequence-specific gene inactivation system mediated by small interfering RNAs (siRNA) guiding endonucleolytic cleavage or translational repression of mRNAs, or by preventing transcription (Cuperus *et al.*, 2010). RNA silencing has essential roles in development, stress response, and genome expression and maintenance (Ding and Voinnet, 2007). The roles and mechanistic activities of RNA silencing are highly conserved in eukaryotes. In plants, nematodes, and insects, RNA silencing is an essential component of antiviral immunity (Ding and Voinnet, 2007).

Plants naturally use RNA silencing to regulate gene expression in a temporal and tissue-specific manner (Chitwood *et al.*, 2009). Virus-infected plants deploy antiviral RNA silencing to prevent, restrict, and clear virus infections (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). In plant-virus interactions, the outcome of disease or resistance is largely dependent on the balance between antiviral RNA silencing versus virus evasion or active suppression of antiviral defense (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). Endogenous and antiviral RNA silencing have conserved and overlapping pathways. Most of the genes that participate in endogenous RNA silencing are also part of antiviral RNA silencing (Ding and Voinnet, 2007).

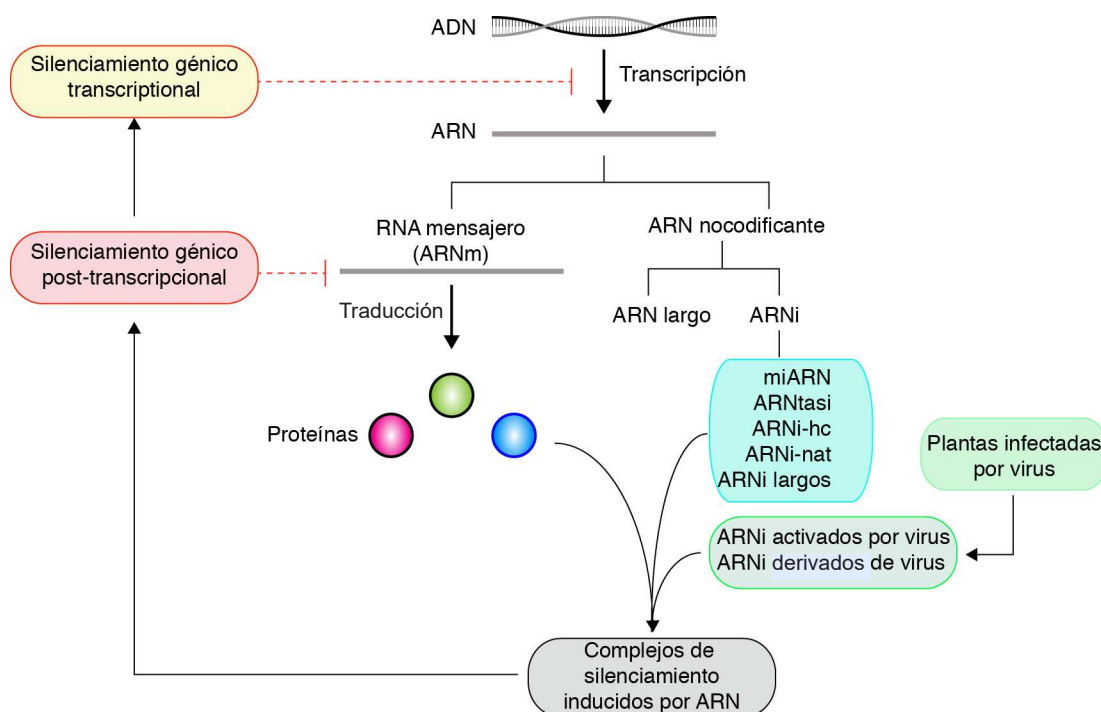
In eukaryotes, including plants, RNA silencing regulates gene expression at the transcriptional or post-transcriptional levels (Figure 1). Transcriptional gene silencing inhibits transcription, resulting in a reduction of mRNA, by methylating DNA in chromosomes, plasmids or viral minichromosomes (Raja *et al.*, 2008; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016). Transcriptional gene silencing is directed by siRNAs guiding enzymatic DNA methylation (Ding and Voinnet, 2007). Post-transcriptional gene silencing is the nucleolytic

por parte de la planta y la evasión o supresión de la defensa antiviral por parte del virus (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). El silenciamiento génico contra virus y contra ARN celular tienen varias componentes en común. La mayoría de los genes que participan en el silenciamiento de genes celulares forman parte del silenciamiento de virus (Ding and Voinnet, 2007).

En eucariotas, incluyendo plantas, el silenciamiento génico regula la expresión de genes a nivel transcripcional y post-transcripcional (Figura 1). El silenciamiento génico a nivel transcripcional inhibe la transcripción causando una reducción en

cleavage and degradation or translational repression of mRNA (Cuperus *et al.*, 2010) (Figure 1). All viruses use RNA to express their genes, replicate, or both. That RNA is potentially perceived by the cell and activates antiviral defense responses, including RNA silencing (Ivanov *et al.*, 2014). Transcriptional and post-transcriptional gene silencing has been demonstrated for DNA viruses, RNA viruses, viroids and satellite RNAs (Table 1).

Viral infection of plants occurs in two phases. After entering the cell, viruses replicate and subsequently move to other cells and systemically through the vascular system to distal plant tissues



**Figura 1.** Flujo de información genética y silenciamiento génico en plantas. Complejos de silenciamiento inducido por ARN se forman entre proteínas y ARN interferentes (ARNi) derivados de transcritos que no codifican proteínas. El silenciamiento génico bloquea el flujo de información genética lo cual evita la transcripción, induce la degradación o evita la traducción. Plantas infectadas por virus acumulan ARNi derivados del ARN viral y ARNi celulares activados por la infección viral.

**Figure 1.** Flow of genetic information and gene silencing in plants. RNA-induced silencing complexes are formed between effector proteins and small interfering RNAs (siRNAs) derived from non-coding transcripts. Gene silencing is a block in the flow of genetic information by preventing transcription or by inducing degradation or translational repression of protein-coding RNAs directed by endogenous siRNAs. Virus-infected plants accumulate virus-induced siRNAs and virus-derived siRNAs.

la síntesis de ARN mensajero vía la metilación de ADN en cromosomas, plásmidos o minicromosomas virales (Raja *et al.*, 2008; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016). El silenciamiento génico transcripcional es dirigido por los RNAi que guían la metilación enzimática del ADN (Ding and Voinnet, 2007). El silenciamiento génico a nivel post-transcripcional consiste en el corte endonucleolítico y degradación o la represión de la traducción de ARN mensajeros (Cuperus *et al.*, 2010) (Figura 1). Todos los virus usan ARN para expresar sus genes, para replicarse o ambos. Este ARN es potencialmente percibido por la célula y activa defensas antivirales, tal como el silenciamiento génico (Ivanov *et al.*, 2014). El silenciamiento génico antiviral a nivel transcripcional y pos-transcripcional ha sido demostrado para virus de ADN, virus de ARN, viroides y ARN satelitales (Cuadro 1).

La infección viral en plantas ocurre en dos fases: Tras entrar en la célula, los virus se replican, después se mueven localmente de una célula a otra y sistemáticamente a otros órganos y tejidos de la planta vía el sistema vascular (Ivanov *et al.*, 2014). El silenciamiento génico dirigido contra ARN viral restringe la replicación del virus y su movimiento (García-Ruiz *et al.*, 2015). La defensa antiviral vía silenciamiento génico depende de la detección y degradación de ARN viral en la células infectadas y de la amplificación de la señal en células lejos del sitio de infección inicial (Ding and Voinnet, 2007).

Los virus modifican el ambiente celular para favorecer su replicación y movimiento dentro de la planta (Ivanov *et al.*, 2014) usando mecanismos que incluyen la subversión, la reprogramación transcripcional y la inducción y supresión del silenciamiento génico (Ding and Voinnet, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2015). La supresión del silenciamiento génico es esencial para que los virus se repliquen, establezcan infección y se muevan local y sistemáticamente (García-Ruiz *et al.*, 2015). Una mejor

and organs (Ivanov *et al.*, 2014). RNA silencing directed against viral RNA (antiviral RNA silencing) restricts virus replication and movement (García-Ruiz *et al.*, 2015). Antiviral defense through RNA silencing is dependent on sensing and targeting viral RNA both; in the initially infected cells and in cells away from the initial site of infection (Ding and Voinnet, 2007).

Viruses modify the cellular environment to support their replication and spread (Ivanov *et al.*, 2014) using mechanisms that include subversion, transcriptional reprogramming and both RNA silencing induction and suppression (Ding and Voinnet, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2015). Suppression of RNA silencing is essential for viruses to replicate, establish infection and move both cell-to-cell and systemically (García-Ruiz *et al.*, 2015). A better understanding of the basic mechanism of endogenous and antiviral RNA silencing and silencing suppression is important to explain several phenomena of interest to plant pathologists, such as virus resistance, virus movement, host range, tissue-specific distribution of virus, viral synergism, genetic determinants of virus resistance, and genetic engineering of plant-virus resistance.

## ROLES OF RNA SILENCING

In eukaryotes, a wide range of biological processes are regulated through silencing mechanisms, including development, organ formation, and stress responses (Chitwood *et al.*, 2009). For example, in plants, the abaxial-adaxial leaf polarity is regulated by siRNA gradients moving between cells (Chitwood *et al.*, 2009). ARGONAUTE (AGO) proteins are the catalytic component of RNA silencing. In association with siRNA, AGO proteins slice target RNA (Carbonell *et al.*, 2012; Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et*

**Cuadro 1.** Componentes genéticos esenciales del silenciamiento génico con base en combinaciones planta-virus representativas y agrupadas siguiendo la organización genómica del virus.

**Table 1.** Core genetic determinants of antiviral silencing for representative plant-pathogen combinations.

| Patógeno                               | Hospedero   | Perfil    | DCL          | AGO                   | RDR          | Referencia   |
|--|-------------|-----------|--------------|-----------------------|--------------|--|
| <b>Virus de ARN de cadena positiva</b> |             |           |              |                       |              |  |
| TCV                                    | Arabidopsis | 22, ND    | DCL4DCL2     | AGO1<br>AGO7          | RDR6         | Deleris <i>et al.</i> , 2006; Qu <i>et al.</i> , 2008              |
| GRSPaV                                 | Vid         | 21, (+)   | ND           | ND                    | ND           | Pantaleo <i>et al.</i> , 2010                                      |
| MCMV                                   | Maíz        | 22, (+)   | ND           | ND                    | ND           | Xia <i>et al.</i> , 2016   |
| GfKv                                   | Vid         | 22, (+/-) | ND           | ND                    | ND           | Pantaleo <i>et al.</i> , 2010                                      |
| GRGV                                   | Vid         | 21, (+/-) | ND           | ND                    | ND           | Pantaleo <i>et al.</i> , 2010                                      |
| PapMV                                  | Papaya      | 21, (+/-) | ND           | ND                    | ND           | Chavez-Calvillo <i>et al.</i> , 2016                               |
| TuMV                                   | Arabidopsis | 21, (+/-) | DCL4<br>DCL2 | AGO1<br>AGO2<br>AGO10 | RDR1<br>RDR6 | Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2010; Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2015 |
| PRSV                                   | Papaya      | 21, (+/-) | ND           | ND                    | ND           | Chavez-Calvillo <i>et al.</i> , 2016                               |
| SCMV                                   | Maíz        | 21, (+/-) | ND           | ND                    | ND           | Xia <i>et al.</i> , 2016   |
| <b>Virus de ARN de cadena negativa</b> |             |           |              |                       |              |  |
| RSV                                    | Arroz       | 21, (+)   | ND           | AGO1<br>AGO18         | RDR6         | Wu <i>et al.</i> , 2015  |
| TSWV                                   | Tomato      | 21, (+)   | ND           | ND                    | ND           | Mitter <i>et al.</i> , 2013  |
| <b>Virus de ARN bicatenario</b>        |             |           |              |                       |              |  |
| OsEV                                   | Arroz       | 21, ND    | DCL2         | ND                    | ND           | Urayama <i>et al.</i> , 2010                                       |
| RDV                                    | Arroz       | 21, (+)   | ND           | AGO1                  | RDR6         | Hong <i>et al.</i> , 2015  |
| <b>Virus de ADN de cadena sencilla</b> |             |           |              |                       |              |  |
| ACMV                                   | Yuca        | 24, ND    | ND           | ND                    | ND           | Akbergenov <i>et al.</i> , 2006                                    |
| CaLCuV                                 | Yuca        | 24, ND    | ND           | ND                    | ND           | Akbergenov <i>et al.</i> , 2006                                    |
| <b>Virus de ADN de cadena doble</b>    |             |           |              |                       |              |  |
| CaMV                                   | Arabidopsis | 21, (-)   | DCL4         | NS                    | RDR6         | Blevins <i>et al.</i> , 2006                                       |
| <b>Viroides</b>                        |             |           |              |                       |              |  |
| GYSVd                                  | Vid         | 21, (-)   | ND           | ND                    | ND           | Navarro <i>et al.</i> , 2009                                       |
| HSVd                                   | Vid         | 21, (-)   | ND           | ND                    | ND           | Navarro <i>et al.</i> , 2009                                       |
| PSTVd                                  | N. b.       | 21, (+)   | ND           | AGO1<br>AGO2          | RDR6         | Minoia <i>et al.</i> , 2014  |
| <b>ARN satelitales</b>                 |             |           |              |                       |              |  |
| Y-sat                                  | N. b.       | 22, (+)   | ND           | ND                    | ND           | Shimura <i>et al.</i> , 2011                                       |

**Patógenos.** *Virus del mosaico de la yuca africana* (ACMV), *Virus del enrollamiento de la hoja de col* (CaLCuV), *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV), *ARN satelital Y del Virus del mosaico del pepino* (Y-sat), *Virus de la mancha de la vid* (GFkV), *Virus asociado al globo de la vid roja* (GRGV), *Virus asociado a la picadura del tallo de la vid rupestre* (GRSPaV), *Viroide 1 del moteado amarillo de la vid* (GYSVd), *Viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd), *Virus del moteado clorótico del maíz* (MCMV), *Endornavirus del arroz* (OsEV), *Virus del mosaico de la papaya* (PapMV), *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV), *Viroide del tuberculo fusiforme de la papa* (PSTVd), *Virus del enanismo del arroz* (RDV), *Virus del rayado del arroz* (RSV), *Virus del mosaico de la caña de azúcar* (SCMV), *Virus del bronceado del tomate* (TSWV), *Virus del encrespado del nabo* (TCV), *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) / **Pathogens.** *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Cucumber mosaic virus Y satellite RNA* (Y-sat), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine Red Globe associated virus* (GRGV), *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV), *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Oryza sativa endornavirus* (OsEV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Rice dwarf virus* (RDV), *Rice stripe virus* (RSV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Turnip crinkle virus* (TCV), *Turnip mosaic virus* (TuMV).

**Hospederos.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Yuca (*Manihot esculenta*), Vid (*Vitis vinifera*), Maíz (*Zea mays*), N. b. (*Nicotiana benthamiana*), Papaya (*Carica papaya*), Arroz (*Oryza sativa*), Tomate (*Solanum lycopersicum*) / **Hosts.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Cassava (*Manihot esculenta*), Grapevine (*Vitis vinifera*), Maize (*Zea mays*), N. b. (*Nicotiana benthamiana*), Papaya (*Carica papaya*), Rice (*Oryza sativa*), Tomato (*Solanum lycopersicum*).

**Perfil de la población de ARNi derivados del virus.** Tamaño en nt de los ARNi más abundantes derivados de los virus. Las poblaciones fueron caracterizadas por medio de secuenciación de nueva generación, geles de ARN, o ambas. (+): Los ARNi de polaridad positiva son más abundantes que los de polaridad negativa. (-): Los ANRi de polaridad negativa son más abundantes que los de polaridad positiva. (+/-): Los ARNi de polaridad positiva y negativa son igualmente abundantes / **Size and polarity.** Size (nt) of the most abundant virus-derived siRNAs based on next generation sequencing, northern blotting, or both. Profile of virus-derived siRNAs determined by next generation sequencing. (+): siRNAs of positive polarity are more abundant than antisense. (-): siRNAs of negative polarity are more abundant than sense. (+/-): siRNAs of positive and negative polarity are equally abundant.

comprensión del mecanismo básico del silenciamiento génico tanto de ARN celular como viral es importante para explicar varios fenómenos que interesan a los fitopatólogos, tales como la resistencia contra virus, su movimiento, su rango de hospedantes, su distribución en la planta, el sinergismo viral, las determinantes genéticas de resistencia a virus y la ingeniería genética de plantas resistentes a virus.

## FUNCIONES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO

En eucariotas varios procesos biológicos, como el desarrollo, la formación de órganos y las respuestas al estrés, son regulados por silenciamiento génico (Chitwood *et al.*, 2009). Por ejemplo, en plantas, la polaridad abaxial-adaxial de las hojas está regulada por gradientes de RNAi que se mueven entre células (Chitwood *et al.*, 2009). Las proteínas ARGONAUTA (AGO) son componentes catalíticos del silenciamiento génico. En asociación con RNAi, las proteínas AGO cortan moléculas de ARN mensajero complementario (el blanco) a los ARNi (Carbonell *et al.*, 2012; Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011). AGO7 y AGO10 se expresan específicamente en los primordios de hojas y en los tejidos vasculares. AGO7 restringe la actividad del micro ARN390 (miR390) y dirige un gradiente de ARNi del lado adaxial al lado abaxial de las hojas (Chitwood *et al.*, 2009). El papel antiviral del silenciamiento génico ha sido demostrado en varias especies de plantas (Cuadro 1) y los ARNi están involucrados también en las interacciones entre plantas y bacterias y entre plantas y hongos (Weiberg *et al.*, 2014).

## ARN NO CODIFICANTE Y PEQUEÑOS ARN INTERFERENTES EN PLANTAS

*al.*, 2011). AGO7 and AGO10 are expressed specifically in the adaxial leaf primordial and in vascular tissues. AGO7 restricts activity of micro RNA390 (miR390) and directs a gradient of trans-acting small interfering RNAs from the adaxial to the abaxial side of developing leaves (Chitwood *et al.*, 2009). The antiviral role of RNA silencing has been demonstrated in many plant species (Table 1), and regulatory siRNAs are also involved in plant-bacterial and plant-fungal interactions (Weiberg *et al.*, 2014).

## NON-CODING AND SMALL RNAS IN PLANTS

Plant genomes encode two kinds of non-coding RNAs (Figure 1): long non-coding RNAs (lncRNA) and small regulatory RNAs also called small interfering RNAs (siRNAs). LncRNAs are formed by sense or antisense transcription, from introns or intergenic regions, are longer than 200 nucleotides (nt) and have been implicated in regulation of tissue differentiation, reproductive development, stress response, vernalization, flowering time, and plant immunity (Shafiq *et al.*, 2016). Plant siRNAs range in size from 21 to 24 nt and are naturally expressed as part of the mechanisms of temporal and spatial gene regulation. Other siRNAs are produced in response to biotic (viral, bacterial or fungal infections) or abiotic stress (salt, water, heat or cold) (Axtell, 2013). Single stranded RNAs (ssRNA) that form a hairpin structure are precursors to hairpin small RNAs: microRNAs (miRNAs) and other siRNAs. Double stranded RNAs (dsRNA) are the precursors to heterochromatic siRNAs and secondary siRNAs such as trans-acting siRNAs and natural antisense transcript-derived siRNAs (Cuperus *et al.*, 2010). A comprehensive review on this subject is provided by (Axtell, 2013).

El genoma de las plantas contiene dos tipos de ARN no codificantes (Figura 1): ARN largo no codificante (ARNlnc) y pequeños ARNs interferentes (RNAi). Los ARNlnc se forman vía transcripción bipolar y a partir de intrones o regiones intergénicas. Los ARNlnc no miden más de 200 nucleótidos (nt) y han sido implicados en la diferenciación de tejidos, el desarrollo reproductivo, la respuesta a estrés, la vernalización, el tiempo de floración y en la inmunidad de plantas (Shafiq *et al.*, 2016). Los ARNi miden 21 a 24 nucleótidos (nt) se expresan de manera natural y son parte de los mecanismos de regulación temporal y espacial de genes mediante silenciamiento génico. Otros ARNi son producidos en respuesta al estrés biótico (infecciones virales, bacterianas o fungosas) o abiótico (estrés salino, hídrico, por calor o por frío) (Axtell, 2013). Los ARN monocatenarios que forman una estructura doble son precursores de pequeños ARNi: microARNs (miARNs) y otros ARNi. Los ARNs bicatenarios son precursores de ARNi heterocromáticos (ARNi-hc), ARNi antisentido (ARNi-nat) y ARNi secundarios (Figura 1) (Cuperus *et al.*, 2010). Una revisión completa del tema está disponible en el artículo de Axtell (Axtell, 2013).

**MicroARNs.** Los miARNs juegan papeles críticos en el desarrollo de órganos y tejidos de eucariotas (Cuperus *et al.*, 2011). En general, los miARNs de plantas miden 21 nt y son formados por la endonucleasa Dicer-Like 1 (DCL1) a partir de transcritos formados por la polimerasa II (Cuperus *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana*, la mayoría de los miARNs se asocian con AGO1 mientras los demás miARNs se asocian con AGO2 o AGO10 (Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011). Una alta complementariedad entre el miARN y el ARN mensajero guía el corte endonucleolítico del transcrito por las proteínas AGO y resulta en la degradación o la represión de la traducción del ARN mensajero (Carbonell *et al.*, 2012). Los miARNs involucrados

**MicroRNAs.** MicroRNAs have critical roles in organ and tissue development of eukaryotes (Cuperus *et al.*, 2011). Plant miRNAs usually measure 21 nt and are formed by endonuclease Dicer-Like I (DCL1) protein from Pol II-dependent transcripts (Cuperus *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* most miRNAs associate with AGO1, and a small number associate with AGO2 or AGO10 (Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011) to collectively target at least 250 transcripts. High complementarity between the miRNA and the target site guides transcript RNA endonucleolytic cleavage by AGO proteins and degradation or translational repression (Carbonell *et al.*, 2012). MicroRNAs involved in plant development are highly conserved (Cuperus *et al.*, 2011).

**Trans-acting small interfering RNAs (tasiRNA).** TasiRNAs function like miRNAs to repress target transcripts (Cuperus *et al.*, 2010). During tasiRNA biogenesis, specific miRNAs in association with specific AGOs facilitate cleavage of tasiRNA primary transcripts, and recruit cellular RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) and/or associated factors to the processed RNA precursor to dsRNA synthesis. Importantly, only a small subset of miRNA, most of which associate with AGO1, enable RDR6 recruitment. RDR6 recruitment by AGO1-miRNA complexes requires 22 nt long miRNAs, or 21 nt asymmetric duplexes (Cuperus *et al.*, 2010).

**Long siRNAs (lsiRNAs).** LsiRNAs are induced by bacterial infection or some stress conditions. They are 30 to 40 nucleotides long. Several R genes involved in resistance to bacteria and fungi are regulated by lsiRNAs (Padmanabhan *et al.*, 2009).

**Virus-activated siRNAs.** Infection of *Arabidopsis thaliana* with *Cucumber mosaic virus* (CMV) or



en el desarrollo están altamente conservados entre especies de plantas (Cuperus *et al.*, 2011).

**Los ARNs interferentes en trans (ARNtasi).** Los ARNtasi regulan transcritos de la misma manera que los miARNs (Cuperus *et al.*, 2010). Durante la biogénesis de los ARNtasi, miARNs específicos en asociación con proteínas AGO facilitan el corte de los transcritos precursores de ARNtasi y reclutan la polimerasa-dependiente de ARN número 6 (RDR6) al transcrito para sintetizar ARN bicatenario. Solamente algunos miARNs participan en la biogénesis de RNAi secundarios mediante amplificación por RDR6. El reclutamiento de RDR6 por los complejos AGO1-miARN necesita la presencia de miARNs que miden 22 nt o de híbridos asimétricos de miARNs/miRNA\* que midan 21 nt (Cuperus *et al.*, 2010).

**ARN largos interferentes (ARNli).** Los ARNli son inducidos por infecciones bacterianas u otras condiciones de estrés. Los ARNli miden de 30 a 40 nt y regulan varios genes de resistencia a bacterias y hongos (Padmanabhan *et al.*, 2009).

**ARN interferentes activados por virus.** En *Arabidopsis thaliana*, infección con el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) o el *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) induce la biogénesis de ARNi derivados de aproximadamente 1,000 genes celulares vía un mecanismo que depende de la polimerasa-dependiente de ARN número I (RDR1). Estos ARNi se asocian con AGO1 y AGO2 y probablemente modulan la respuesta a infecciones virales (Cao *et al.*, 2014).

**ARN interferentes derivados del virus.** Plantas infectadas acumulan ARNi derivados del virus (ARNiv) que miden de 21 a 24 nt y son formados por las proteínas Dicer-Like (DCL). Los ARNiv

*Turnip mosaic virus* (TuMV) induce the biogenesis of endogenous siRNAs from approximately 1,000 *A. thaliana* genes, by a mechanism dependent on RNA-dependent RNA polymerase 1 (RDR1). These siRNAs associate with AGO1 and AGO2 and are predicted to modulate host responses to virus infection (Cao *et al.*, 2014).

**Virus-derived siRNAs.** Infected plants accumulate virus-derived siRNAs that are generally 21 to 24 nt long and are made by Dicer-Like (DCL) proteins. The most abundant size classes are 21 and 22 nt, and are made by DCL4 and DCL2, respectively (Deleris *et al.*, 2006) (Table 1). Virus-derived siRNAs mediate antiviral defense by inducing transcriptional and post-transcriptional gene silencing of viruses (Brosseau and Moffett, 2015; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016).

#### ANTIVIRAL RNA SILENCING PATHWAYS

Antiviral RNA silencing is non-cell autonomous, initiates at the single cell level and spreads cell-to-cell and long distance through plasmodesmata and the plant vascular system (Ding and Voinnet, 2007; Molnar *et al.*, 2010). The pathway consists of four parts: Initiation, targeting, amplification, and systemic spread (Figure 2). After sensing viral RNA, siRNAs derived from viral dsRNA are made by DCL proteins (Deleris *et al.*, 2006). In the targeting phase, virus-derived siRNAs associate with ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-induced silencing complexes (RISC) and are predicted to target viral ssRNA for endonucleolytic cleavage or translational repression (Brosseau and Moffett, 2015). Initial recognition of viral RNA is necessary but not sufficient to restrict plant virus infection (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Restriction of plant virus infection requires silencing amplification by cellular RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). After moving

más abundantes miden 21 y 22 nt y son formados por DCL4 y DCL2, respectivamente (Deleris *et al.*, 2006) (Cuadro 1). Los ARNi derivados del virus regulan la defensa antiviral mediante la inducción del silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional de genes virales (Brosseau and Moffett, 2015; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016).

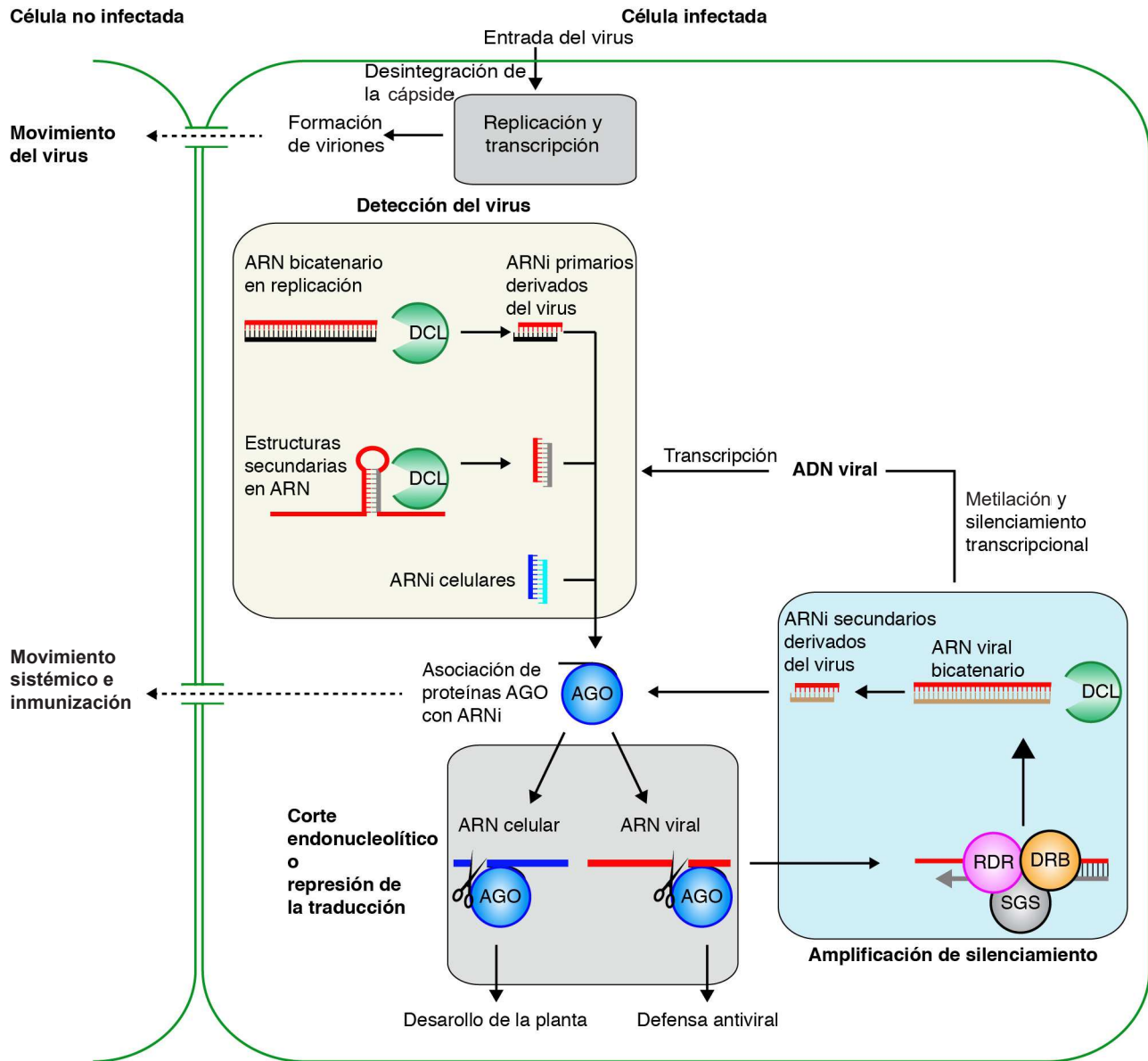
## VIAS DEL SILENCIAMIENTO GENICO ANTIVIRAL

El silenciamiento génico antiviral inicia en una célula y se mueve a otras células y a otras partes de la planta a través de los plasmodesmos y el sistema vascular (Ding and Voinnet, 2007; Molnar *et al.*, 2010). La vía consiste en cuatro partes: Inicio, degradación, amplificación y movimiento sistémico (Figura 2). Tras detectar el ARN viral, las proteínas DCL forman ARNi derivados del ARN bicatenario viral (Deleris *et al.*, 2006). Durante la etapa de degradación, los ARNi derivados del virus se asocian con las proteínas ARGONAUTAS (AGO) para formar los complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC) que llevarán a cabo el corte endonucleolítico de ARN monocatenario viral o la represión de la traducción (Brosseau and Moffett, 2015). El reconocimiento inicial del ARN viral es necesaria pero no es suficiente para restringir la infección de la planta por el virus (García-Ruiz *et al.*, 2010). Restricción de la infección viral requiere la amplificación del silenciamiento génico mediante las polimerasas dependientes de ARN (RDRs) (García-Ruiz *et al.*, 2010). Las RDRs celulares forman ARN bicatenario viral en células receptoras para amplificar el silenciamiento y establecer un estado antiviral (Figura 2). Esta amplificación contribuye a la especificidad y la fuerza del silenciamiento génico antiviral y es mediada por RDR1 y RDR6 para formar ARNi secundarios derivados del virus (Cuadro 1). Los virus de ADN expresan

out of the infected cell, in recipient cells, endogenous RDRs make viral dsRNA to amplify the silencing response and establish an antiviral state (Figure 2). This amplification contributes to the specificity and strength of antiviral RNA silencing and is mediated by RDR1 and RDR6 to form secondary virus-derived siRNAs (Table 1). DNA viruses express their genes through mRNA. Silencing is activated at the post-transcriptional level, resulting in the formation of siRNAs that guide targeting of viral RNA. Furthermore, virus-derived siRNAs in association of AGO and RDR proteins guide methylation of viral DNA, resulting in transcriptional gene silencing which prevents virus replication and movement (Raja *et al.*, 2008; Buchmann *et al.*, 2009; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016).

## VIRUS-DERIVED siRNA PROFILES

For a growing number of plant-virus combinations virus-derived siRNA populations have been profiled by next generation sequencing (Table 1). Three kinds of profiles have been described: sense and antisense strand equally represented (ambisense), and biased towards the sense or antisense polarity. For some plant positive-strand RNA viruses, virus-derived siRNAs of sense polarity are more abundant than antisense and there are fragments of the viral genome that accumulate more virus-derived siRNAs than others (Table 1). This pattern suggests that positive-strand viral RNA sequences, or structures, are recognized by DCL proteins. For most plant-virus combinations, infected plants accumulate virus-derived siRNAs from the entire viral genome in nearly equal amounts for both polarities (Table 1). Interestingly, mutant plants lacking silencing amplification proteins RDR1 or RDR6 accumulate reduced amounts of virus-derived siRNAs, implicating cellular RDRs



**Figura 2.** Componentes básicos del silenciamiento génico antiviral en plantas. Proteínas Dicer-like (DCL) cortan ARN bicatenario viral y forman ARNi primarios que se asocian con proteínas ARGONAUTA (AGO) y guían el silenciamiento de ARN viral. El corte endonucleolítico de ARN viral activa la amplificación de silenciamiento génico antiviral y resulta en la formación de ARN viral bicatenario por medio de polymerasas celulares dependientes de ARN (RDR) el cual es procesado por DCL y resulta en la formación de ARNi secundarios derivados del ARN viral. Amplificación de silenciamiento génico activa la metilación de ADN viral, estableciendo silenciamiento génico transcripcional. Los ARNi derivados del virus se mueven de una célula a otra y de manera sistémica, estableciendo un estado de inmunidad en toda la planta.

**Figure 2.** Antiviral RNA silencing pathway and basic components in plants. Dicer-like (DCL) proteins cut viral dsRNA to form primary virus-derived siRNAs that associate with ARGONAUTA (AGO) proteins and guide targeting of viral RNA. Slicing of viral RNA triggers amplification of antiviral RNA silencing resulting in the formation of viral dsRNA by cellular RNA-dependent RNA polymerases (RDR) and processed by DCL to form secondary-virus-derived siRNAs. Silencing amplification triggers methylation of viral DNA establishing transcriptional silencing. Virus-derived siRNA move cell-to-cell and systemically to establish a state of antiviral immunity away from the initial infection site.

sus genes vía ARN mensajero. El silenciamiento génico contra virus de ADN se activa a nivel post-transcripcional resultando en la formación de ARNi que guían la detección del ARN viral. Además, los ARNi derivados del virus en asociación con las proteínas AGO y RDR guían la metilación de ADN viral resultando en el silenciamiento génico transcripcional del minicromosoma viral, lo que impide la replicación y el movimiento del virus (Raja *et al.*, 2008; Buchmann *et al.*, 2009; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016).

### **POBLACIONES DE ARN INTERFERENTES DERIVADOS DE VIRUS**

En varias especies de plantas y virus, las poblaciones de ARNi derivados de virus han sido caracterizadas mediante secuenciación de nueva generación (Cuadro 1). Tres tipos de poblaciones han sido descritos: Poblaciones en las que moléculas de cadena positiva y negativa son igualmente abundantes, y en las que poblaciones de moléculas de cadena positiva son más abundantes que moléculas de cadena negativa y viceversa. Para algunos virus fitopatógenos de ARN de cadena positiva, los ARNi derivados de virus de polaridad positiva son más abundantes que los de polaridad negativa y hay fragmentos del genoma viral que acumulan más RNAi que otros (Cuadro 1). Este patrón sugiere que las secuencias de ARN viral de cadena positiva, o sus estructuras, son reconocidas por las proteínas DCL. Para la mayoría de combinaciones de virus-plantas, las plantas infectadas acumulan RNAi derivados de virus de la totalidad del genoma viral en cantidades similares para ambas polaridades (Cuadro 1). Resulta muy interesante la observación de que las plantas mutantes que carecen de polimerasas de amplificación RDR1 o RDR6, acumulan cantidades reducidas de RNAi derivados

in their biogenesis (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010).

### **TRIGGERS OF ANTIVIRAL RNA SILENCING**

The nature of the viral RNA that is recognized by the cell and triggers the antiviral response has not been determined. Based on several genetic analyses (Table 1), sources of viral substrates for DCL are cellular RDR-independent and cellular RDR-dependent (Figure 2). Viral dsRNA formed during silencing amplification is RDR-dependent. Self-complementary sequences in viral genomic RNA, viral replication intermediates, and products of overlapping or bidirectional transcription are cellular RDR-independent (Ding and Voinnet, 2007). It is widely assumed, that these RNA populations trigger the antiviral RNA silencing response and DCL proteins form primary virus-derived siRNAs (Ding and Voinnet, 2007). Alternatively, or in addition, viral RNA could be recognized by translational repressors arrested and routed to DCL processing or directed to cellular RDR-dependent dsRNA synthesis (Luo and Chen, 2007). A surveillance mechanism could also be formed by AGO proteins loaded with endogenous siRNAs with complementarity to viral RNA to trigger the antiviral RNA silencing pathway as described for artificial micro RNAs targeting viral RNA (Niu *et al.*, 2006).

### **SMALL RNAS DIRECT ANTIVIRAL IMMUNITY**

Virus-derived siRNAs associate with AGO proteins and are the specificity determinant guiding translational repression or cleavage of viral RNA with sequence complementarity to

de virus, implicando a las RDRs celulares en su biogénesis (García-Ruiz *et al.*, 2010).

### ACTIVACION DE SILENCIAMIENTO GENICO ANTIVIRAL

La naturaleza del RNA viral que es reconocido por la célula y que activa el silenciamiento génico antiviral no se ha identificado. Con base en varios análisis genéticos (Cuadro 1), las fuentes de substratos virales para las proteínas DCL se puede dividir en dos grupos: Dependientes o independientes de las RDR celulares (Figura 2). Los RNA bicatenarios virales formados durante la amplificación de silenciamiento génico son dependientes de RDR celulares. Las secuencias auto-complementarias en el ARN genómico viral, productos intermedios de la replicación viral y los productos de transcripción bidireccional son independientes de RDR celulares (Ding y Voinnet, 2007). En general se asume, que estas poblaciones de ARN activan el silenciamiento génico antiviral y las proteínas DLC forman ARNi primarios derivados de virus (Ding y Voinnet, 2007). Alternativamente, o además, el ARN viral podría ser reconocido por represores de traducción que envían el ARN viral para ser procesado por proteínas DCL, o dirigidos a la síntesis de ARN bicatenario por RDR celulares (Luo y Chen, 2007). Un mecanismo de vigilancia también podría estar formado por proteínas AGO cargadas con ARNi celulares con complementariedad al ARN viral y activar silenciamiento génico antiviral como sucede con los microARNs artificiales dirigidos contra ARN viral (Niu *et al.*, 2006).

### INMUNIDAD ANTIVIRAL DIRIGIDA POR ARN INTERFERENTE

Los ARNi derivados de virus y que se asocian con proteínas AGO determinan la especificidad

the siRNA (Schuck *et al.*, 2013). In a variation of the pathway targeting DNA viruses, silencing complexes formed by virus-derived siRNAs and AGO4 direct methylation of viral DNA to prevent transcription (Raja *et al.*, 2008). The end result is the establishment of a virus resistant state that inhibits virus replication and movement. Several phenomena in plant-virus interactions involve gene silencing such as cross protection, symptom recovery, synergism, and non-host resistance.

Cross protection occurs when infection by a mild virus strain prevents subsequent infection by a second virus of the same or closely related species (Kung *et al.*, 2014). Although not all cross-protection cases are explained, according to the antiviral RNA silencing model, siRNAs-derived from the mild virus strain directs targeting of viruses with sequence similarity, thus creating a state of immunity (Kung *et al.*, 2014). Symptom recovery has been described for several plant-virus combinations. Infected plants accumulate high virus titers and develop visible symptoms. However, the upper leaves of those plants contain low virus titers and do not develop symptoms. Virus-derived siRNAs formed in the lower part of the plant move systemically to the meristem to direct viral RNA targeting and prevent virus invasion of the meristem. Leaves formed after that harbor virus-derived siRNAs that mediate virus downregulation (Ma *et al.*, 2015).

Viral synergism occurs when co-infection by two viruses results in disease with more severe symptoms than single virus infection (Xia *et al.*, 2016). Most documented cases of viral synergism involve viruses in the Potyvirus genus and depend on silencing suppressors HC-Pro or P1 (Chavez-Calvillo *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2016). Potyviral HC-Pro binds both endogenous and virus-derived siRNAs (García-Ruiz *et al.*, 2015). Based on the silencing model (Figure 2), potyviral RNA

del silenciamiento génico antiviral guiando represión de la traducción o el corte endonucleolítico de ARN viral con complementariedad a los ARNis (Schuck *et al.*, 2013). En una variación del sistema, en el caso de virus de ADN, los complejos de silenciamiento formados por ARNi derivados de virus y AGO4 guían la metilación de ADN viral, lo cual bloquea la transcripción (Raja *et al.*, 2008). El resultado final es el establecimiento de un estado de resistencia viral que inhibe la replicación y movimiento virus.

En las interacciones virus-plantas, varios fenómenos pueden ser explicados con base en silenciamiento génico antiviral, tales como la protección cruzada, recuperación de síntomas, sinergismo y la resistencia de no hospedantes. La protección cruzada ocurre cuando la infección por una cepa de virus previene la infección posterior por un segundo virus de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada (Kung *et al.*, 2014). Aunque no todos los casos de protección cruzada se han explicado, de acuerdo con el modelo de silenciamiento génico antiviral, los ARNAi derivados del virus que causa la primera infección dirigen el corte o represión de la traducción de virus similares al intentar establecer una segunda infección, creando así un estado de inmunidad (Kung *et al.*, 2014). La recuperación de los síntomas se ha descrito para varias combinaciones de virus-planta. Las plantas infectadas acumulan altas cantidades de virus y desarrollan síntomas visibles. Sin embargo, las hojas superiores de dichas plantas contienen bajas cantidades de virus y no desarrollan síntomas. Los ARNi derivados del virus y formados en la parte inferior de la planta se mueven sistémicamente al meristemo para guiar el corte o represión de la traducción de ARN viral lo cual evita la invasión del meristemo por el virus. Las hojas formadas después de estos eventos acumulan bajas cantidades de virus y no presentan síntomas (Ma *et al.*, 2015).

silencing suppressors bind siRNAs derived from co-infecting viruses, preventing targeting of viral RNA and resulting in severe symptoms and higher accumulation of the non-potyvirus (Xia *et al.*, 2016).

Several mechanisms explain non-host resistance, such as antiviral RNA silencing, host genetic determinants of viral RNA translation, replication or movement (Ivanov *et al.*, 2014). Viral RNA targeting by endogenous siRNAs or virus activated siRNAs supports non-host resistance (Ding and Voinnet, 2007).

### SUPPRESSION OF RNA SILENCING BY VIRUSES

In order to replicate and move cell-to-cell and systemically, plant viruses must protect themselves from antiviral defense responses. At least two mechanisms have been described: evasion and suppression of RNA silencing. Positive-strand RNA viruses replicate in membrane bound compartments that sequester replication intermediates. Negative-strand RNA viruses and dsRNA viruses replicate in the nucleus or in enveloped vesicles. These structures might prevent access to viral dsRNA by the RNA silencing machinery (Laliberte and Sanfacon, 2010).

Most plant and some insect viruses encode silencing suppressors that inactivate RNA silencing by multiple mechanisms such as inhibition of siRNA biogenesis, sequestration of virus-derived siRNAs, triggering degradation of AGO or DCL proteins, and blocking RNA silencing amplification (Table 2). Virus-encoded silencing suppressors also bind cellular miRNAs and other siRNAs. Similarly effects on AGO, DCL, RDR and their accessory proteins affects biogenesis and activity of cellular miRNAs and siRNAs (Chapman *et al.*, 2004). Gene silencing regulates plant development. Thus,

El sinergismo viral se produce cuando una infección simultánea por dos virus resulta en una enfermedad con síntomas más severos que infección por un solo virus (Xia *et al.*, 2016). La mayor parte de los casos documentados de sinergismo incluyen a los virus del género *Potyvirus* y dependen de los supresores de silenciamiento HC-Pro o P1 (Chávez-Calvillo *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2016). El supresor HC-Pro se asocia tanto con los ARNi celulares como con los ARNi derivados de virus (García-Ruiz *et al.*, 2015). Basado en el modelo de silenciamiento génico (Figura 2), los supresores del silenciamiento génico se unen a los ARNi derivados de ambos virus presentes en la misma planta, bloqueando tanto el silenciamiento génico antiviral como el silenciamiento de genes celulares, lo cual resulta en síntomas severos, así como en mayor acumulación de los virus que acompañan al potyvirus (Xia *et al.*, 2016).

Varios mecanismos que explican la resistencia de no hospedante, tales como silenciamiento génico antiviral y determinantes genéticos del hospedante necesarios para la replicación o movimiento de virus (Ivanov *et al.*, 2014). Silenciamiento génico antiviral dirigido por ARNi celulares o activados por infecciones virales pueden ser responsables de la resistencia de no hospedante (Ding y Voinnet, 2007).

### **SUPRESION DE SILENCIAMIENTO GENICO POR VIRUS**

Con el fin de replicarse y moverse de célula a célula y sistémicamente, los virus de plantas deben protegerse de las respuestas de defensa antivirales, incluyendo el silenciamiento génico. Se han descrito al menos dos mecanismos: la evasión y la supresión de silenciamiento génico. Los virus de ARN de cadena positiva se replican en vesículas membranosas que contienen ARN bicatenario que

perturbación de silenciamiento conduce a cambios en la expresión de genes del hospedante y es, al menos en parte, responsable del desarrollo de síntomas (Chapman *et al.*, 2004). Debido a que el silenciamiento antiviral resulta en metilación de DNA virus minichromosomas, geminiviruses codifican proteínas supresoras que interfieren con la metilación de DNA (Tabla 2).

### **GENETIC ENGINEERING OF VIRUS RESISTANCE**

Para algunas combinaciones de plantas-virus, fuentes de resistencia genética natural han sido identificadas e introducidas mediante cruce en cultivares comerciales. Sin embargo, para la mayoría de las combinaciones de plantas-virus, la resistencia genética natural no ha sido identificada (Mehta *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Varios enfoques basados en silenciamiento de RNA han sido utilizados para diseñar resistencia a virus en plantas mediante transgenes que expresan dsRNA, RNA de sentido simple o antisense, RNA artificial (amiRNAs), o tasiRNAs (Figura 3 y Tabla 3). Secuencias derivadas del virus se integran en DNA cassettes bajo el control de un promotor constitutivo o específico de tejido. El transcrito forma dsRNA que es procesado en siRNAs que programan el targeting de RNA viral, creando un estado de inmunidad.

Estas plantas muestran un fenotipo que varía desde inmunidad hasta tolerancia. Las áreas más diana son la proteína de la envoltura viral, la RNA polimerasa dependiente de RNA, el supresor de silenciamiento, o el sitio de inicio de replicación del geminivirus (Tabla 3).

Los CRISPR, que consisten en secuencias de DNA bacteriano que contienen repeticiones cortas separadas por una secuencia espaciadora, se integran en el genoma bacteriano y son procesados por nucleasas Cas en guías de RNA pequeñas. Las nucleasas

se forma durante la replicación. Los virus de ARN de cadena negativa y los virus de ARN bicatenario se replican en el núcleo o en vesículas membranosas. Estas estructuras pueden proteger el ARN viral del silenciamiento génico (Laliberté y Sanfacon, 2010).

El genoma de la mayoría de los virus de plantas y algunos virus de insectos codifica supresores que inactivan el silenciamiento génico mediante múltiples mecanismos, tales como la inhibición de la biogénesis de los ARNi, asociación con ARNi derivados de virus, degradación de proteínas AGO y DCL, o bloqueando la amplificación del silenciamiento (Cuadro 2). Los supresores virales de silenciamiento génico también se asocian con miARNs y otros ARNi celulares. Del mismo modo, efectos sobre AGO, DCL, RDR y sus proteínas accesorias afecta la biogénesis y la actividad de los miARNs y ARNi celulares (Chapman *et al.*, 2004). El silenciamiento génico regula el desarrollo de plantas. Por lo tanto, la perturbación de las rutas de silenciamiento génico conduce a cambios en la expresión génica del hospedante y es, al menos en parte, responsable del desarrollo de síntomas visibles en plantas infectadas por virus (Chapman *et al.*, 2004). Dado que el silenciamiento génico antiviral resulta en la metilación de minicromosomas de virus de ADN, los geminivirus codifican proteínas supresoras que interfieren con la metilación del ADN (Cuadro 2).

## INGENIERIA GENETICA DE RESISTENCIA A VIRUS

Para algunas combinaciones de virus-planta, fuentes de resistencia genética se han identificado e introducido mediante mejoramiento en variedades comerciales. Sin embargo, para muchas combina-

Cas9 associates with guide RNAs and specifically cuts DNA with sequence complementarity to the guide RNA. Interestingly, this specific RNA-guided DNA-nuclease provides antiviral immunity in bacteria (Horvath and Barrangou, 2010). This system has been adapted to design the most powerful genome editing tool available today with endless applications in functional genomics of eukaryotes, including humans, insects, nematodes, fungi, and plants (Ali *et al.*, 2015). The CRISPER/Cas9 system has recently been used to design antiviral resistance against geminiviruses (Table 4) and will be part of current efforts to identify or validate plant susceptibility genes, leading to genetic engineering of antiviral resistance without transgenes.

## FUTURE CHALLENGES

Research efforts are currently focused on the identification of additional genetic components, identification and characterization of silencing suppressor proteins, and RNAs. Basic mechanisms expected to be elucidated in the near future include initial sensing of viral RNA by the cell, genetic determinants and mechanism of silencing amplification, downregulation of viral RNA by cleavage or translational repression, and the roles of virus-derived siRNAs in transcriptional reprogramming of infected cells. A challenge for plant pathologists is to translate basic knowledge into practical applications.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research in the Garcia-Ruiz laboratory is supported by an NIH grant (RO1GM120108).

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



**Cuadro 2.** Ejemplos representativos de proteínas virales supresoras de silenciamiento génico organizados con base en su mecanismo de actividad.

**Tabla 2.** Representative virus-encoded gene silencing suppressors.

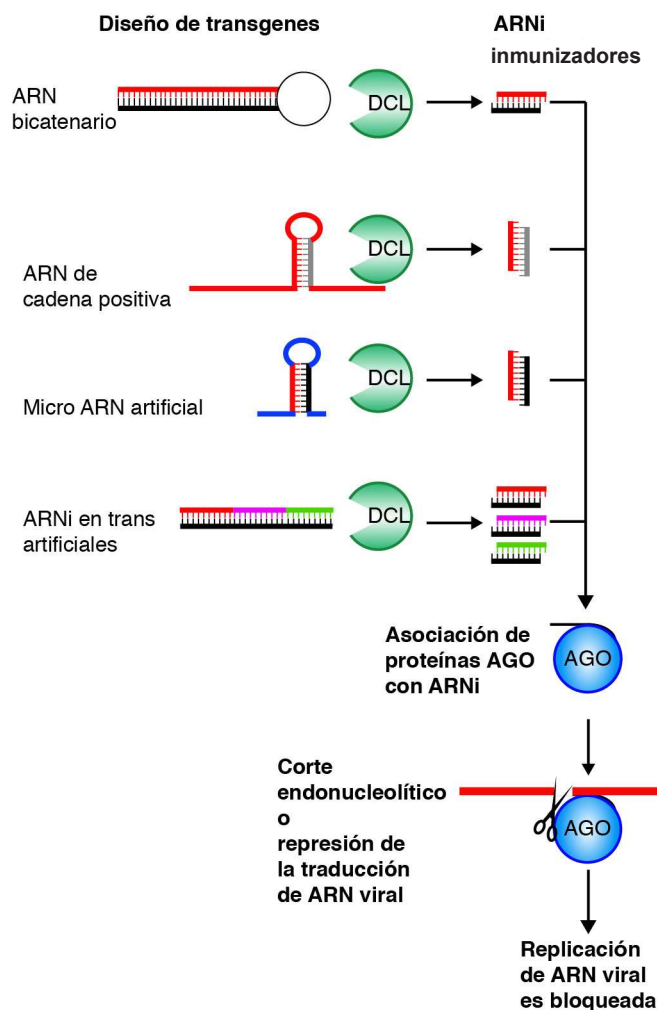
| Virus                                                   | Supresor                    | Mecanismo                             | Otras funciones                                                                 | Referencias                      |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Asociación con ARNi pequeños</b>                     |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| Potyvirus                                               | HC-Pro                      | ARNi de cadena doble o sencilla       | Movimiento del virus, desarrollo de los síntomas, determinante de patogenicidad | García-Ruiz <i>et al.</i> , 2015 |
| TBSV                                                    | P19                         | ARNi de cadena doble                  | Movimiento del virus, desarrollo de los síntomas, determinante de patogenicidad | Chapman <i>et al.</i> , 2004     |
| BYV                                                     | P21                         | ARNi de cadena doble                  | Requerido para la replicación                                                   | Chapman <i>et al.</i> , 2004     |
| RDV                                                     | PNS10                       | ARNi de cadena doble                  | ND                                                                              | Ren <i>et al.</i> , 2010         |
| <b>Asociación con ARN bicatenario largo</b>             |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| TCV                                                     | P38 CP                      | ARN bicatenario                       | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Meraí <i>et al.</i> , 2006       |
| <b>Degradación o inhibición de AGO</b>                  |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| CMV                                                     | 2b                          | AGO1<br>AGO4                          | Movimiento de virus                                                             | Zhang <i>et al.</i> , 2006       |
| ToRSV                                                   | CP                          | AGO1                                  | Formación de viriones                                                           | Karran and Sanfacon, 2014        |
| TCV                                                     | P38 CP                      | AGO1<br>AGO2                          | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Azevedo <i>et al.</i> , 2010     |
| <b>Inhibición de DCL</b>                                |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| RYMV                                                    | P1                          | DCL4                                  | Patogénesis, desarrollo de síntomas                                             | Lacombe <i>et al.</i> , 2010     |
| TCV                                                     | P38 CP                      | DCL2                                  | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Azevedo <i>et al.</i> , 2010     |
| <b>Inhibición de la amplificación de silenciamiento</b> |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| RDV                                                     | PNS10                       | Reducción de la expresión de RDR6     | ND                                                                              | Ren <i>et al.</i> , 2010         |
| <b>Interferencia con la metilación de ADN</b>           |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| TGMV                                                    | AL2                         | Inhibición de la quinasa de adenosina | Patogénesis                                                                     | Buchmann <i>et al.</i> , 2009    |
| BCTV                                                    | L2                          |                                       |                                                                                 |                                  |
| <b>ARN disfrazados</b>                                  |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| CaMV                                                    | Traducción líder de 35S ARN | Sobrecarga de DCL                     | Traducción y transcripción reversa                                              | Blevins <i>et al.</i> , 2011     |

**Virus.** *Virus del rizado de la remolacha azucarera (BCTV)*, *Virus del amarillamiento de la remolacha azucarera (BYV)*, *Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)*, *Virus del mosaico del pepino (CMV)*, *Phytoreovirus del enanismo del arroz (RDV)*, *Virus del moteado amarillo del arroz (RYMV)*, *Virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV)*, *Virus mosaico dorado del tomate (TGMV)*, *Virus de la mancha anular del tomate (ToRSV)*, *Virus del encrespado del nabo (TCV)* / **Viruses.** *Beet curly top virus (BCTV)*, *Beet yellows virus (BYV)*, *Cauliflower mosaic virus (CaMV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Rice dwarf phytoreovirus (RDV)*, *Rice yellow mottle virus (RYMV)*, *Tomato bushy stunt virus (TBSV)*, *Tomato golden mosaic virus (TGMV)*, *Tomato ringspot virus (ToRSV)*, *Turnip crinkle virus (TCV)*.

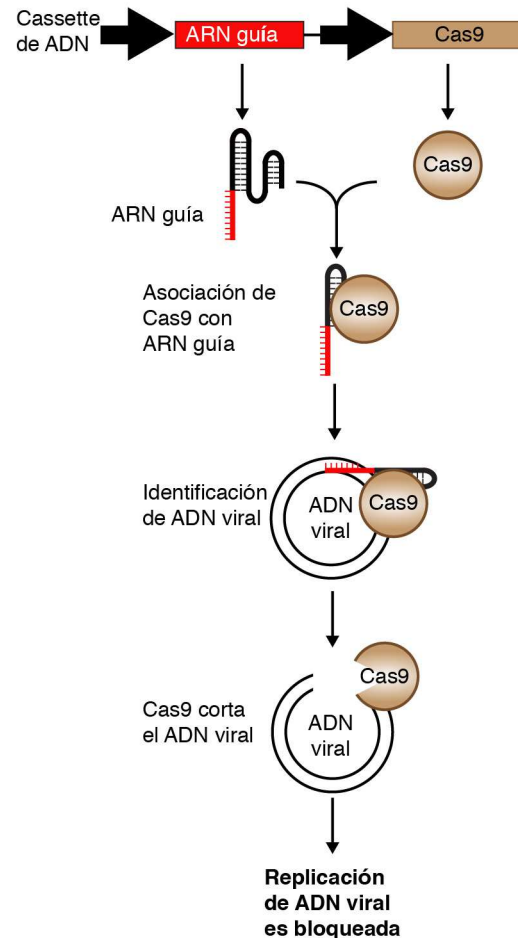
ciones de planta-virus, resistencia genética natural no ha sido identificada (Mehta *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Varios enfoques basados en el silenciamiento génico se han utilizado para obtener resistencia a virus en plantas utilizando transge-

nes que expresan ARN bicatenario, ARN monocatenario de cadena positiva o negativa, microARNs artificiales, o ARN interferentes en trans artificiales (Figura 3 y Cuadro 3). Las secuencias derivadas del virus se integran en cassettes de ADN bajo el

**A Resistencia contra ARN viral**



**B Resistencia contra ADN viral**



**Figura 3.** Ingeniería genética de resistencia antiviral en plantas por medio de silenciamiento génico o edición del genoma. **A.** Producción de ARNi inmunizadores activada por transgenes de origen viral que forma ARN bicatenario y es procesado por proteínas DCL. **B.** Diseño de resistencia antiviral contra virus de ADN usando el sistema CRISPR/Cas9. La proteína Cas9 se asocia con ARN guía (20 a 24 nt) y de manera específica corta ADN, evitando la replicación de virus de ADN.

**Figure 3.** Genetic engineering of antiviral immunity in plants by RNA silencing or DNA editing. **A.** Production of immunizing antiviral siRNAs is triggered by transgenes of viral origin forming dsRNA processed by Dicer-like proteins (DCL). **B.** Design of antiviral resistance against DNA viruses using the CRISPR/Cas9 system. Cas9 protein associates with the guide RNA (20 to 24 nt) to specifically cut DNA targets, preventing DNA replication.

control de un promotor constitutivo o específico de algún tejido. El transcrito forma ARN bicatenario que es procesado por proteínas DCL formando ARNi que programan el corte o represión de traducción de RNA viral. Estas plantas muestran un

fenotipo que varía de inmunidad a tolerancia. Los fragmentos virales mas usados son la proteína de la cápside viral, la replicasa, los supresores de silenciamiento, o el sitio de iniciación de la replicación en geminivirus (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Ejemplos representativos de plantas resistentes a virus desarrolladas mediante silenciamiento génico o edición del genoma. Los ejemplos están agrupados con base en el diseño del transgen.

**Table 3.** Representative virus resistant plants developed by RNA silencing or genome editing approaches.

| Especies                                 | Resistencia a                                         | Silenciamiento de                                      | Fase         | Referencias                          |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| <b>ARN de cadena positiva</b>            |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomate                                   | TMV                                                   | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Abel <i>et al.</i> , 1986            |
| Papaya                                   | PRSV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Comercial    | Fitch <i>et al.</i> , 1993           |
| Tabaco                                   | TEV                                                   | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Lindbo <i>et al.</i> , 1993          |
| Calabacita                               | ZYMV y WMV                                            | Proteína de la cápside                                 | Comercial    | Fuchs and Gonsalves, 1995            |
| <b>ARN de cadena positiva y negativa</b> |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomato                                   | ToRV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Yepes <i>et al.</i> , 1996           |
| <b>ARN bicatenario</b>                   |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Frijol común                             | BGMV                                                  | AC1                                                    | Experimental | Bonfim <i>et al.</i> , 2007          |
| Arroz                                    | RGSV                                                  | Nucleocápside<br>Proteína de movimiento                | Experimental | Shimizu <i>et al.</i> , 2013         |
| Ciruela                                  | PPV                                                   | eiFiso4E *                                             | Experimental | Wang <i>et al.</i> , 2013            |
| <b>ARN que forma una horquilla</b>       |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Ciruela                                  | PPV                                                   | 5' UTR-P1                                              | Experimental | Di Nicola-Negri <i>et al.</i> , 2010 |
| Trigo                                    | WSMV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Cruz <i>et al.</i> , 2014            |
| <b>miARN artificiales</b>                |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Arabidopsis                              | TuYMV<br>TuMV                                         | P69, HC-PRO                                            | Experimental | Niu <i>et al.</i> , 2006             |
| Yuca africana                            | CBSV                                                  | P1, Nib, y proteína de la cápside                      | Experimental | Wagaba <i>et al.</i> , 2016          |
| <b>ARNtasi</b>                           |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomate                                   | ToLCNDV                                               | AC2 and AC4                                            | Experimental | Singh <i>et al.</i> , 2015           |
| Tabaco                                   | ToLCNDV                                               | AC2 and AC5                                            | Experimental | Singh <i>et al.</i> , 2015           |
| <b>CRISR/Cas9</b>                        |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Arabidopsis                              | TuMV                                                  | eiFiso4E*                                              | Experimental | Pyott <i>et al.</i> , 2016           |
| Algodón                                  | Complejo de enfermedades del enrollamiento de la hoja | Sitio de inicio de la replicación, replicasa, proteína | Experimental | Iqbal <i>et al.</i> , 2016           |

**Virus.** *Virus del mosaico dorado del frijol* (BGMV), *Virus del rayado marrón de la yuca africana* (CBSV), *Virus del mosaico del pepino* (CMV), *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV), *Virus de la sharka de la ciruela* (PPV), *Virus del enanismo del arroz* (RGSV), *Virus del grabado del tabaco* (TEV), *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Virus de Nueva Delhi del rizado de la hoja del tomate* (ToLCNDV), *Virus de la mancha anular del tomate* (ToRV), *Virus del mosaico del nabo* (TuMV), *Virus del mosaico amarillo del nabo* (TuYMV), *Virus del mosaico de la sandía* (WMV), *Virus del mosaico estriado del trigo* (WSMV), *Virus del mosaico amarillo de la calabaza* (ZYMV).

Complejo de enfermedades del enrollamiento de la hoja del algodón: *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Alabad* (CLCuAIV), *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Bangalore* (CLCuBaV), *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Kokhran* (CLCuKoV), *CLCuKoV-Bu* (cepa de Burewala), *Virus del enrollamiento de la hoja del algodón de Multan* (CLCuMuV) y *Virus del enrollamiento de la hoja del algodón* (CLCuRaV) / **Virus.** *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Cassava brown streak virus* (CBSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Plum pox virus* (PPV), *Rice grassy stunt virus* (RGSV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Tomato ringspot virus* (ToRV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TuYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV).

Cotton leaf curl disease complex: *Cotton leaf curl Alabad virus* (CLCuAIV), *Cotton leaf curl Bangalore virus* (CLCuBaV), *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKoV), *CLCuKoV-Bu* (Burewala strain), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) and *Cotton leaf curl Rajasthan virus* (CLCuRaV).

**Hospederos.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Yuca africana (*Manihot esculenta*), Frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Algodón (*Gossypium hirsutum*), Papaya (*Carica papaya*), Ciruela (*Prunus spp*), Arroz (*Oryza sativa*), Calabacita (*Cucurbita pepo*), Tabaco (*Nicotiana tabacum*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Trigo (*Triticum aestivum L.*) / **Hosts.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Cassava (*Manihot esculenta*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), Cotton (*Gossypium hirsutum*), Papaya (*Carica papaya*), Plum (*Prunus spp*), Rice (*Oryza sativa*), Squash (*Cucurbita pepo*), Tobacco (*Nicotiana tabacum*), Tomato (*Solanum lycopersicum*), Wheat (*Triticum aestivum L.*).

**Gene silenciado.** Nombre de los genes virales o de la planta (\*) sometidos a silenciamiento génico o edición del genoma / **Target gene.** Name of the viral or host genes (\*) targeted for silencing or genome editing.

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) son segmentos de ADN bacteriano que contienen repeticiones cortas separadas por una secuencia espaciadora. Los CRISPR se derivan de virus bacteriófagos, o plásmido de ADN, integrado en el genoma bacteriano, y son procesados por nucleasas Cas para formar guías de ARN pequeño. La nucleasa Cas9 se asocia con RNAs guía y específicamente corta ADN con secuencia complementaria al ARN guía. Este sistema proporciona inmunidad antiviral en bacterias (Horvath y Barrangou, 2010) y ha sido adaptado para diseñar la herramienta de edición de genomas más poderosa y disponible en la actualidad con un sin fin de aplicaciones en la genómica funcional de eucariotas, incluyendo humanos, insectos, nematodos, hongos y plantas (Ali *et al.*, 2015). El sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado recientemente para diseñar resistencia antiviral contra geminivirus (Cuadro 3) y será parte de los esfuerzos actuales para identificar o validar los genes de susceptibilidad en plantas, dirigiendo la ingeniería genética de resistencia antiviral sin necesidad de hacer plantas transgénicas.

## RETOS FUTUROS

Los esfuerzos de investigación se centran actualmente en la identificación de los componentes genéticos del sistema de silenciamiento génico, así como en la identificación y caracterización de ARNs y proteínas virales supresoras de silenciamiento. Se espera que en un futuro cercano se definan los mecanismos básicos responsables de la detección inicial de ARN viral por la célula, los determinantes genéticos y el mecanismo de amplificación del silenciamiento génico, corte y degradación o represión de traducción de ARN viral, y los roles de los ARNi derivados de virus en la reprogramación transcripcional de las células infectadas.

Un reto especial para los fitopatólogos es traducir el conocimiento básico en aplicaciones prácticas.

## AGRADECIMIENTOS

La investigación en el laboratorio del Dr. H. Garcia-Ruiz es financiada por un proyecto con el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos, NIH (RO1GM120108).

## LITERATURA CITADA

- Abel PP, Nelson RS., De B, Hoffmann, N, Rogers SG, Fraley, RT and Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743. PMID: 3457472
- Akbergenov R, Si-Ammour A, Blevins T, Amin I, Kutter C, Vanderschuren H, Zhang P, Gruissem W, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2006. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res* 34, 462-471. DOI: 10.1093/nar/gkj447
- Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M and Mahfouz MM. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol* 16, 238. DOI: 10.1186/s13059-015-0799-6
- Axtell, MJ. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 137-159. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge, S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T and Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24, 904-915. DOI: 10.1101/gad.1908710
- Blevins T, Rajeswaran R, Aregger M, Borah BK, Scheptilnikov M, Baerlocher L, Farinelli L, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2011. Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Res* 39, 5003-5014. DOI: 10.1093/nar/gkr119
- Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34, 6233-6246. DOI: 10.1093/nar/gkl886
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA and Aragao FJ. 2007. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 20, 717-726. DOI: 10.1094/MPMI-20-6-0717
- Brosseau C and Moffett P. 2015. Functional and Genetic

- Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *Plant Cell* 27, 1742-1754. DOI: 10.1105/tpc.15.00264
- Buchmann RC, Asad S, Wolf JN, Mohannath G and Bisaro DM. 2009. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 83, 5005-5013. DOI: 10.1128/JVI.01771-08
- Cao M, Du P, Wang X, Yu YQ, Qiu YH, Li W, Gal-On A, Zhou C, Li Y and Ding SW. 2014. Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 14613-14618. DOI: 10.1073/pnas.1407131111
- Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT and Carrington JC. 2012. Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *The Plant cell* 24, 3613-3629. DOI: 10.1105/tpc.112.099945
- Ceniceros-Ojeda EA, Rodriguez-Negrete EA and Rivera-Bustamante RF. 2016. Two Populations of Viral Minichromosomes Are Present in a Geminivirus-Infected Plant Showing Symptom Remission (Recovery). *J Virol* 90, 3828-3838. DOI: 10.1128/JVI.02385-15
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV and Carrington JC. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18, 1179-1186. DOI: 10.1101/gad.1201204
- Chavez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, Noa-Carrazana JC, Serrano-Rubio AA, Dinkova TD, Carrillo-Tripp M and Silva-Rosales L. 2016. Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in Carica papaya is determined by their order of infection. *Virology* 489, 179-191. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.026
- Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington, JC and Timmermans MC. 2009. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev* 23, 549-554. DOI: 10.1101/gad.1770009
- Cruz LF, Rupp JLS, Trick HN and Fellers JP. 2014. Stable resistance to Wheat streak mosaic virus in wheat mediated by RNAi. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50, 665-672. DOI: 10.1007/s11627-014-9634-0
- Cuperus JT, Fahlgren N and Carrington JC. 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant cell* 23, 431-442. DOI: 10.1105/tpc.110.082784
- Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA and Carrington JC. 2010. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nature structural & molecular biology* 17, 997-1003. DOI: 10.1038/nsmb.1866
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC and Voinnet O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71. DOI: 10.1126/science.1128214
- Di Nicola-Negri E, Tavazza M, Salandri L and Ilardi V. 2010. Silencing of Plum pox virus 5'UTR/P1 sequence confers resistance to a wide range of PPV strains. *Plant cell reports* 29, 1435-1444. DOI: 10.1007/s00299-010-0933-6
- Ding SW and Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.039
- Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D and Slightom JL. 1993. Transgenic papaya plants from Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Plant cell reports* 12, 245-249. DOI: 10.1007/BF00237128
- Fuchs M and Gonsalves D. 1995. Resistance of Transgenic Hybrid Squash Zw-20 Expressing the Coat Protein Genes of Zucchini Yellow Mosaic-Virus and Watermelon Mosaic-Virus-2 to Mixed Infections by Both Potyviruses. *Bio-Technology* 13, 1466-1473. DOI: 10.1038/nbt1295-1466
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Bremel KJ and Carrington JC. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481-496. DOI: 10.1105/tpc.109.073056
- Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, Garcia Ruiz, MT, McGinn MG, Lowery N, Martinez Baladejo MT and Carrington JC. 2015. Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathog* 11, e1004755. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004755
- Hong W, Qian D, Sun R, Jiang L, Wang Y, Wei C, Zhang Z and Li Y. 2015. OsRDR6 plays role in host defense against double-stranded RNA virus, Rice Dwarf Phyto-reovirus. *Sci Rep* 5, 11324. DOI: 10.1038/srep11324
- Horvath P and Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170. DOI: 10.1126/science.1179555
- Iqbal Z, Sattar MN and Shafiq M. 2016. CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease. *Frontiers in plant science* 7, 475. DOI: 10.3389/fpls.2016.00475
- Ivanov KI, Eskelin K, Lohmus A and Makinen K. 2014. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol* 95, 1415-1429. DOI: 10.1099/vir.0.064220-0
- Karran RA and Sanfacon H. 2014. Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 933-943. DOI: 10.1094/MPMI-04-14-0099-R
- Kung YJ, Lin PC, Yeh SD, Hong SF, Chua NH, Liu LY, Lin CP, Huang YH, Wu HW, Chen CC and Lin SS. 2014. Genetic analyses of the FRNK motif function of Turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 944-955. DOI: 10.1094/MPMI-04-14-0116-R
- Lacombe S, Bangratz M, Vignols F and Brugidou C. 2010. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J* 61, 371-382. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04062.x
- Lablerte JF and Sanfacon H. 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 48, 69-91. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114239
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM and Dougherty WG. 1993. Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene

- Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759. DOI: 10.1105/tpc.5.12.1749
- Luo Z and Chen Z. 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 943-958. DOI: 10.1105/tpc.106.045724
- Ma X, Nicole MC, Meteignier LV, Hong N, Wang G and Moffett P. 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of experimental botany* 66, 919-932. DOI: 10.1093/jxb/eru447
- Mehta R, Radhakrishnan T, Kumar A, Yadav R, Dobaría JR, Thirumalaisamy PP, Jain RK and Chigurupati P. 2013. Coat protein-mediated transgenic resistance of peanut (*Arachis hypogaea* L.) to peanut stem necrosis disease through Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Indian J Virol* 24, 205-213. DOI: 10.1007/s13337-013-0157-9
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L and Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80, 5747-5756. DOI: 10.1128/JVI.01963-05
- Minoia S, Carbonell A, Di Serio F, Gisel A, Carrington JC, Navarro B and Flores R. 2014. Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J Virol* 88, 11933-11945. DOI: 10.1128/JVI.01404-14
- Mitter N, Koundal V, Williams S and Pappu H. 2013. Differential expression of tomato spotted wilt virus-derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS One* 8, e76276. DOI: 10.1371/journal.pone.0076276
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R and Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872-875. DOI: 10.1126/science.1187959
- Navarro B, Pantaleo V, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Di Serio F and Burgyan J. 2009. Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS One* 4, e7686. DOI: 10.1371/journal.pone.0007686
- Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD and Chua NH. 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 24, 1420-1428. DOI: 10.1038/nbt1255
- Padmanabhan C, Zhang X and Jin H. 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12, 465-472. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.005
- Pantaleo V, Saldarelli P, Miozzi L, Giampetruzzi A, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G and Burgyan J. 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology* 408, 49-56. DOI: 10.1016/j.virol.2010.09.001
- Pyott DE, Sheehan E and Molnar A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Mol Plant Pathol*. DOI: 10.1111/mpp.12417
- Qu F, Ye X and Morris, TJ. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14732-14737. DOI: 10.1073/pnas.0805760105
- Raja P, Sanville BC, Buchmann RC and Bisaro, DM. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* 82, 8997-9007. DOI: 10.1128/JVI.00719-08
- Ren B, Guo Y, Gao F, Zhou P, Wu F, Meng Z, Wei C and Li Y. 2010. Multiple functions of Rice dwarf phytoevirus Pns10 in suppressing systemic RNA silencing. *J Virol* 84, 12914-12923. DOI: 10.1128/JVI.00864-10
- Schuck J, Gursinsky T, Pantaleo V, Burgyan J and Behrens SE. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res* 41, 5090-5103. DOI: 10.1093/nar/gkt193
- Shafiq S, Li J and Sun Q. 2016. Functions of plants long non-coding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 1859, 155-162. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.06.009
- Shimizu T, Ogamino T, Hiraguri A, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T, Nakajima M, Akutsu K, Omura T and Sasaya T. 2013. Strong resistance against Rice grassy stunt virus is induced in transgenic rice plants expressing double-stranded RNA of the viral genes for nucleocapsid or movement proteins as targets for RNA interference. *Phytopathology* 103, 513-519. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0165-R
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burgyan J and Masuta C. 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS pathogens* 7, e1002021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002021
- Singh A, Taneja J, Dasgupta I and Mukherjee SK. 2015. Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA. *Mol Plant Pathol* 16, 724-734. DOI: 10.1111/mpp.12229
- Urayama S, Moriyama H, Aoki N, Nakazawa Y, Okada R, Kiyota E, Miki D, Shimamoto K and Fukuhara T. 2010. Knock-down of OsDCL2 in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa* endornavirus. *Plant Cell Physiol* 51, 58-67. DOI: 10.1093/pcp/pep167
- Wagaba H, Patil BL, Mukasa S, Alicai T, Fauquet CM and Taylor NJ. 2016. Artificial microRNA-derived resistance to Cassava brown streak disease. *J Virol Methods* 231, 38-43. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.02.004
- Wang X, Kohalmi SE, Svircev A, Wang A, Sanfacon H and Tian L. 2013. Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers plum pox virus resistance in plum. *PLoS One* 8, e50627. DOI: 10.1371/journal.pone.0050627
- Weiberg A, Wang M, Bellinger M and Jin H. 2014. Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* 52, 495-516. DOI: 10.1146/annurev-phyto-102313-045933
- Wu J, Yang Z, Wang Y, Zheng L, Ye R, Ji Y, Zhao S, Ji S, Liu R, Xu L, Zheng H, Zhou Y, Zhang X, Cao X, Xie L, Wu Z, Qi Y and Li Y. 2015. Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *Elife* 4. DOI: 10.7554/eLife.05733

- Xia Z, Zhao Z, Chen L, Li M, Zhou T, Deng C, Zhou Q and Fan Z. 2016. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Sci Rep* 6, 20520. DOI: 10.1038/srep20520
- Yepes LM, Fuchs M, Slightom JL and Gonsalves D. 1996. Sense and antisense coat protein gene constructs confer high levels of resistance to tomato ringspot nepovirus in transgenic *Nicotiana* species. *Phytopathology* 86, 417-424. DOI: 10.1094/Phyto-86-417
- Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ and Chua NH. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20, 3255-3268. DOI: 10.1101/gad.1495506.

# Detection of *Iris yellow spot virus* in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico

## Detección de *Iris yellow spot virus* en cebolla cultivada en Tepalcingo, Morelos, México

Sergio Ramírez-Rojas\*, Katya Ornelas-Ocampo, Felipe de Jesús Osuna-Canizalez, Juan Carlos Bartolo-Reyes y Vicente Varela-Loza, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Km. 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. C. P. 62780, Colonia Centro Zacatepec, Morelos, México. Jesús Hernández-Romano, Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Bulevard Cuahunahuac #566, C.P. 62550, Colonia Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, México. Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, C.P. 56230 México.

\*Correspondencia: sergioinifap@yahoo.com.mx

Recibido: 01 de abril de 2016

Aceptado: 15 de junio de 2016

Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez FJ, Bartolo-Reyes JC, Varela-Loza V, Hernández-Romano J y Ochoa-Martínez DL. 2016. Detection of *Iris yellow spot virus* in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 308-315.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1604-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-1)

Primera publicación DOI: 16 de junio 2016

First DOI publication: June 16th, 2016

**Resumen.** En el estado de Morelos recientemente se han observado enfermedades virales en cebolla (*Allium cepa*); una de ellas es la mancha amarilla causada por el *Iris yellow spot virus* perteneciente a la familia *Bunyaviridae* del género *Tospovirus*, el cual se trasmite a la cebolla por *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae). En el 2012 la incidencia de esta enfermedad fue de 100 % en las 2,500 ha cultivadas en la entidad con una severidad superior a 90 %. El objetivo de este trabajo fue detectar mediante RT-PCR en tiempo real y secuen-

**Abstract.** In Morelos state, recently have been observed viral diseases in onion (*Allium cepa*); one of them is caused by the *Iris yellow spot virus* (IYSV) which belong to the *Bunyaviridae* family and the *Tospovirus* gender and is transmitted by *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) to onion plants. In 2012, there was a 100 % incidence of IYSV and severity of over 90 % on 2,500 ha of commercial crop. The objective of this research was to identify the presence of IYSV through real time RT-PCR and sequencing of the virus. To accomplish this, leaves were sampled from commercial fields at Tepalcingo, Morelos, from transplanting to harvest. Total RNA extraction was done with TRIzol® Reagent. Virus detection was done using specific primers for the nucleoprotein gen of IYSV giving as a result the amplification of a specific product through real-time RT-PCR, and an expected strip of 896 bp, which after sequencing confirmed 99 % identity with the nucleoprotein gen of the virus. The IYSV virus was detected in onion plants from Tepalcingo, Morelos and the sequence



ciar la presencia de IYSV. Para su identificación se tomaron muestras de hojas de cebolla con manchas amarillentas alargadas, desde el trasplante hasta la cosecha en Tepalcingo, Morelos. La extracción de ARN total se realizó utilizando TRIzol® Reagent. La detección del virus se realizó con primers específicos al gen de la nucleoproteína de IYSV dando como resultado la amplificación de un producto específico mediante RT-PCR en tiempo real y una banda esperada de 896 pb la cual mediante secuenciación confirmó 99 % de identidad con el gen de la nucleoproteína de este virus. El IYSV fue detectado en plantas de cebolla en Tepalcingo, Morelos y su secuencia se registró en la base de datos del GenBank (JX946658).

**Palabras clave:** RT-PCR en tiempo real, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, Mancha amarilla de la cebolla.

La cebolla es un cultivo de importancia económica del cual se cosechan anualmente 53 millones de toneladas de bulbos de los casi 3 millones de hectáreas sembradas en todo el mundo (Gent *et al.*, 2006). En Latinoamérica, México es el mayor productor de cebolla con 77,328 t cosechadas en 7,400 ha; además, es el décimo exportador a nivel mundial (FAO, 2011). Es el quinto cultivo más importante de las hortalizas; en Morelos se cosecha 10 % de la superficie sembrada en el país, lo que lo convierte en el cuarto mayor productor a nivel nacional (SIAP, 2012).

Entre las enfermedades que afectan al cultivo se encuentran las de índole viral, especialmente el *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Gent *et al.*, 2006).

El IYSV infecta a varias especies del género *Allium* incluyendo a la cebolla (*Allium cepa*) causando la mancha amarilla de la cebolla. Este virus pertenece al género *Tospovirus* de la familia *Bunyaviridae* (Gent *et al.*, 2006). Su presencia se ha detectado desde 1981 en Brasil y Estados Unidos

obtainado was registered in the database of the GenBank (JX946658).

**Additional Keywords:** Real time RT-PCR, *Tospovirus*, *Thrips tabaci*, Onion yellow spot.

The onion plant is an economically important plant, with 53 million tons of bulbs harvested from the nearly 3 million hectares planted worldwide (Gent *et al.*, 2006). In Latin America, Mexico is the largest onion producer with 77,328 t harvested in 7,400 ha; it is also the tenth exporter worldwide (FAO, 2011). It is the fifth most important vegetable crop; in Morelos, 10 % of the country's production is harvested, which makes it the fourth largest producer on a national scale (SIAP, 2012).

Some of the diseases that affect the crop include viral diseases, particularly the *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Gent *et al.*, 2006).

The IYSV infects various species of the genus *Allium*, including onions (*Allium cepa*), causing the onion yellow spot. This virus belongs to the genus *Tospovirus* of the family *Bunyaviridae* (Gent *et al.*, 2006). Its presence has been detected since 1981 in Brazil and the United States (Cortês *et al.*, 1998.). IYSV has extended to important onion-producing regions worldwide (Bulajić *et al.*, 2009; Córdoba *et al.*, 2005; Du Toit *et al.*, 2004; Gent *et al.*, 2006; Gera *et al.*, 2004; Nischwitz *et al.*, 2007; Pozzer *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006).

In Mexico this virus has been identified in onion plantations and greenhouses in Zacatecas (Velásquez and Reveles, 2011; Velásquez *et al.*, 2016).

IYSV is transmitted by *Thrips tabaci*, main pest of this crop (Riley *et al.*, 2011). Kritzma *et al.* (2001) found a relation between the populations of *T. tabaci* and the incidence of infection of IYSV, and showed that the highest concentrations of the virus are near the neck of the plant, which is the site

(Cortês *et al.*, 1998.). El IYSV se ha propagado a importantes regiones productoras de cebolla a nivel mundial (Bulajić *et al.*, 2009; Córdoba *et al.*, 2005; Du Toit *et al.*, 2004; Gent *et al.*, 2006; Gera *et al.*, 2004; Nischwitz *et al.*, 2007; Pozzer *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006).

En México este virus se ha identificado en plantaciones y viveros de cebolla de Zacatecas (Velásquez y Reveles, 2011; Velásquez *et al.*, 2016).

El IYSV es transmitido por *Thrips tabaci*, principal plaga de este cultivo (Riley *et al.*, 2011). Kritzman *et al.* (2001) encontraron una relación entre las poblaciones de *T. tabaci* y la incidencia de la infección de IYSV, y demostraron que las concentraciones más elevadas del virus están en el área cercana al cuello de la planta, el cual es el sitio de alimentación y protección de trips.

La incidencia de IYSV aumenta después de la iniciación de la formación del bulbo con un incremento de 40 % comparado con 3 % antes de esta etapa (Fichtner *et al.*, 2004; Hammon 2004), y a menudo alcanza niveles de 50 a 60 % (Kritzman *et al.*, 2001), en países como Brasil ha llegado a niveles de 100 % provocando pérdidas totales de producción tanto de semilla como de bulbos (Pozzer *et al.*, 1999).

El daño causado por el virus propicia el secado del follaje y la detención del crecimiento de los bulbos. Por lo tanto, el principal impacto económico de esta enfermedad está asociado con la reducción del tamaño de bulbo y en consecuencia la disminución del rendimiento (Gent *et al.*, 2004). Además, la infección hace más susceptible a la planta de cebolla a condiciones adversas como sequía, exceso de riego, temperaturas altas, daño de minadores y trips, entre otros (Velásquez *et al.*, 2016).

En México, el cultivo de esta hortaliza se realiza en dos ciclos agrícolas, el más importante es el de otoño-invierno donde se obtiene 60 % de la producción total, pero los síntomas de IYSV han sido observados en los dos ciclos mencionados (Osuna

for the feeding and protection of thrips.

The incidence of IYSV increases after the bulb begins to form, by 40 %, compared with 3 % before this stage (Fichtner *et al.*, 2004; Hammon 2004), and it often reaches levels of 50 to 60 % (Kritzman *et al.*, 2001). In countries such as Brazil it has reached levels of 100 % causing complete losses of both seeds and bulbs (Pozzer *et al.*, 1999).

The damage caused by the virus leads to the drying of the leaves and stops bulb growth. Therefore, the main economic impact of this is related to the reduction in bulb size and consequently the reduction of yield (Gent *et al.*, 2004). Likewise, the infection makes the onion plant more vulnerable to adverse conditions such as drought, excess irrigation, high temperatures, damage of leaf miners and thrips, and others (Velásquez *et al.*, 2016).

In Mexico, this plant is produced in two agricultural cycles, the most important of which is autumn-winter, in which 60 % of the total production is obtained, although the symptoms of IYSV have been observed in the two cycles mentioned (Osuna and Ramírez, 2013). The aim of this study was to detect the presence of IYSV, using RT-PCR in real time, in onion plants from Tepalcingo, Morelos

RNA extraction was performed on a total of five onion plants in the phase of bulb formation with symptoms attributed to IYSV, as observed in Figure 1, using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). The cDNA synthesis was carried out using 1 µg of total RNA with the package QuantiTect Reverse Transcription kit<sup>®</sup> (QIAGEN) using primers IYSV-465c and IYSV-239f, specific for the detection of IYSV (Pappu *et al.*, 2008). The reaction of PCR in real time was carried out using the package QuantiFast<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR (QIAGEN) with 10 ng of cDNA. Each sample was analyzed three times. The real time PCR program consisted of an initial step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with

y Ramírez, 2013). El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de IYSV, mediante RT-PCR en tiempo real, en plantas de cebolla provenientes de Tepalcingo, Morelos.

Se realizó la extracción de RNA total a cinco plantas de cebolla en la fase de formación de bulbo con síntomas atribuidos a IYSV, como se observa en la Figura 1, utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen). La síntesis de cDNA se llevó a cabo con 1 µg de RNA total con el paquete QuantiTect Reverse Transcription kit® (QIAGEN) utilizando los iniciadores IYSV-465c e IYSV-239f, específicos para la detección de IYSV (Pappu *et al.*, 2008). La reacción de PCR en tiempo real se realizó con el paquete QuantiFast® SYBR® Green PCR (QIAGEN) con 10 ng de cDNA. Cada muestra se analizó por triplicado. El programa de PCR en tiempo real consistió de un paso inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos con tres pasos: 95 °C 10 s, 61 °C 15 s, 72 °C 10 s. La ganancia de optimización fue registrada entre los 72 y 95 °C para la curva de disociación. La secuenciación parcial del gen N de la nucleoproteína se realizó utilizando los iniciadores IYSV917L e IYSV56U (Robène-Soustrade *et al.*, 2006). El programa CLC Sequence Viewer 6.7 se utilizó para realizar el análisis filogenético entre la secuencia parcial del gen de la nucleoproteína de IYSV identificada en Tepalcingo, Morelos, con otras muestras reportadas en las bases de datos del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). El análisis se realizó con el algoritmo UPGMA con 100 repeticiones.

Los síntomas encontrados en los cultivos de cebolla relacionados con IYSV fueron manchas cloróticas, amarillentas o blancas, secas y alargadas. Las hojas maduras con los síntomas antes descritos presentaban manchas alargadas de diferentes tamaños, las cuales ocuparon hasta 70 % de su superficie (Figura 1).

Para confirmar la presencia del IYSV, se hizo PCR en tiempo real en plantas con síntomas, obte-

three steps: 95 °C 10 s, 61 °C 15 s, 72 °C 10 s. The increase in optimization was registered between 72 and 95 °C for the dissociation curve. The partial sequencing of the gene N of the nucleoprotein was carried out using the primers IYSV917L and IYSV56U (Robène-Soustrade *et al.*, 2006). The program CLC Sequence Viewer 6.7 was used to carry out the phylogenetic analysis between the partial sequence of the gene of the nucleoprotein of IYSV identified in Tepalcingo, Morelos, with other samples reported in the databases of the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). The analysis was carried out using the algorithm UPGMA with 100 replications.

The symptoms found in the onion crops related to IYSV were yellow or white chlorotic spots, dry and long. Mature leaves with these symptoms presented long spots of different sized, which covered up to 70 % of their surface (Figure 1).

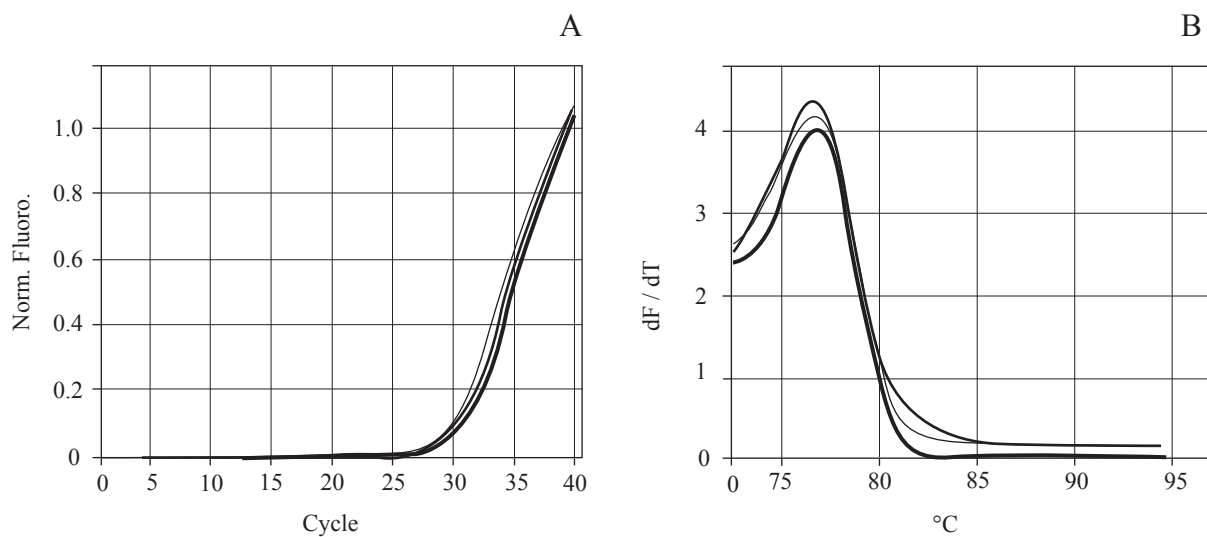
To confirm the presence of the IYSV, a PCR was carried out in real time on plants with symptoms, obtaining a specific amplification (Figure 2A). The dissociation analysis showed only one peak which corresponded to the amplification of a fragment of a gene of the nucleocapsid of the virus (Figure 2B), which shows that the amplification was specific to this test.

The sequence of the gene of the nucleocapsid of the IYSV detected in onion plants was registered in GenBank with the access number JX946658. The homology analysis confirmed a 99 % identity with previously reported sequences of the gene of the nucleoprotein of the IYSV. The phylogenetic analysis showed that the virus in Tepalcingo, Morelos (JX946658) has a higher similarity with those reported in Europe and Asia. The analysis shows that there is no association between the sequence of the virus and its geographic location, which limits its traceability (Figure 3). The viral genomes of RNA naturally present a high mutation rate during the replication process (Elena *et al.*,



**Figura 1.** Síntomas asociados a la infección por *Iris yellow spot virus* en plantas de cebolla: a) y b) manchas cloróticas al inicio de la infección; c) manchas alargadas de color pajizo; d) coalescencia de lesiones principalmente en la base de las hojas.

**Figure 1.** Symptoms related to the infection by *Iris yellow spot virus* in onion plants: a) and b) chlorotic spots in early stages of the infection; c) long hay-colored stains; d) coalescence of damages, mainly on the base of the leaves.



**Figura 2.** Detección de *Iris yellow spot virus* (IYSV) por PCR en tiempo real. A. Amplificación de un fragmento del gen de la nucleocápside del virus, a partir de lesiones en hojas de cebolla. B. Curva de disociación específica de la amplificación del gen de la nucleocápside del mismo virus.

**Figure 2.** Detection of the *Iris yellow spot virus* (IYSV) by PCR in real time. A. Amplification of a fragment of the gene of the nucleocapsid of the virus, from damages in onion leaves. B. Specific dissociation curve of the amplification of the gene of the nucleocapsid of the same virus.

niéndose una amplificación específica (Figura 2A). El análisis de disociación mostró un solo pico correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen de la nucleocápside del virus (Figura 2B), lo cual demuestra que la amplificación fue específica para esta prueba.

La secuencia del gen de la nucleocápside del IYSV detectado en las plantas de cebolla, fue registrada en GenBank con el número de acceso JX946658. Mediante el análisis de homología se confirmó 99 % de identidad con secuencias previamente reportadas del gen de la nucleoproteína de IYSV. El análisis filogenético mostró que el aislamiento del virus en Tepalcingo, Morelos (JX946658) tiene mayor similitud con los reportados en Europa y Asia. El análisis muestra que no existe una asociación entre la secuencia del virus y su origen geográfico lo que limita su rastreabilidad (Figura 3). De manera natural los genomas virales de RNA presentan alta tasa de mutación durante el proceso de replicación (Elena *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta ahora el análisis global de IYSV muestra un flujo de genes restringido debido al confinamiento geográfico dando como resultado dos genotipos, IYSV-NL e IYSV-BR, siendo el primero hasta ahora el único presente en América, mientras que el segundo se encuentra principalmente en aislamientos asiáticos (Iftikhar *et al.*, 2014).

De acuerdo con Pappu *et al.* (2008), se ha comprobado que la técnica de RT-PCR en tiempo real es una técnica rápida y altamente confiable para detectar la presencia de IYSV en cebolla.

## CONCLUSIONES

Se comprobó la presencia de IYSV en plantas de cebolla cultivadas en Tepalcingo, Morelos mediante RT-PCR en tiempo real.

### Agradecimientos

A los productores de cebolla de Morelos, México y al proyecto apoyado por FOMIX MOR-2010-01 clave 148902.  
VOLUMEN 34, NÚMERO 3, 2016

2008). However, the global IYSV analysis has so far shown a restricted gene flow due to the geographic confinement, giving two genotypes as a result: IYSV-NL and IYSV-BR, the former being, up to now, the only one present in the American continent, whereas the latter is found mainly in Asian isolations (Iftikhar *et al.*, 2014).

According to Pappu *et al.* (2008), the RT-PCR technique in real time has been proven to be quick and highly efficient to detect the presence of IYSV in onions.

## CONCLUSIONES

The presence of IYSV was verified in onion plants grown in Tepalcingo, Morelos by RT-PCR in real time.

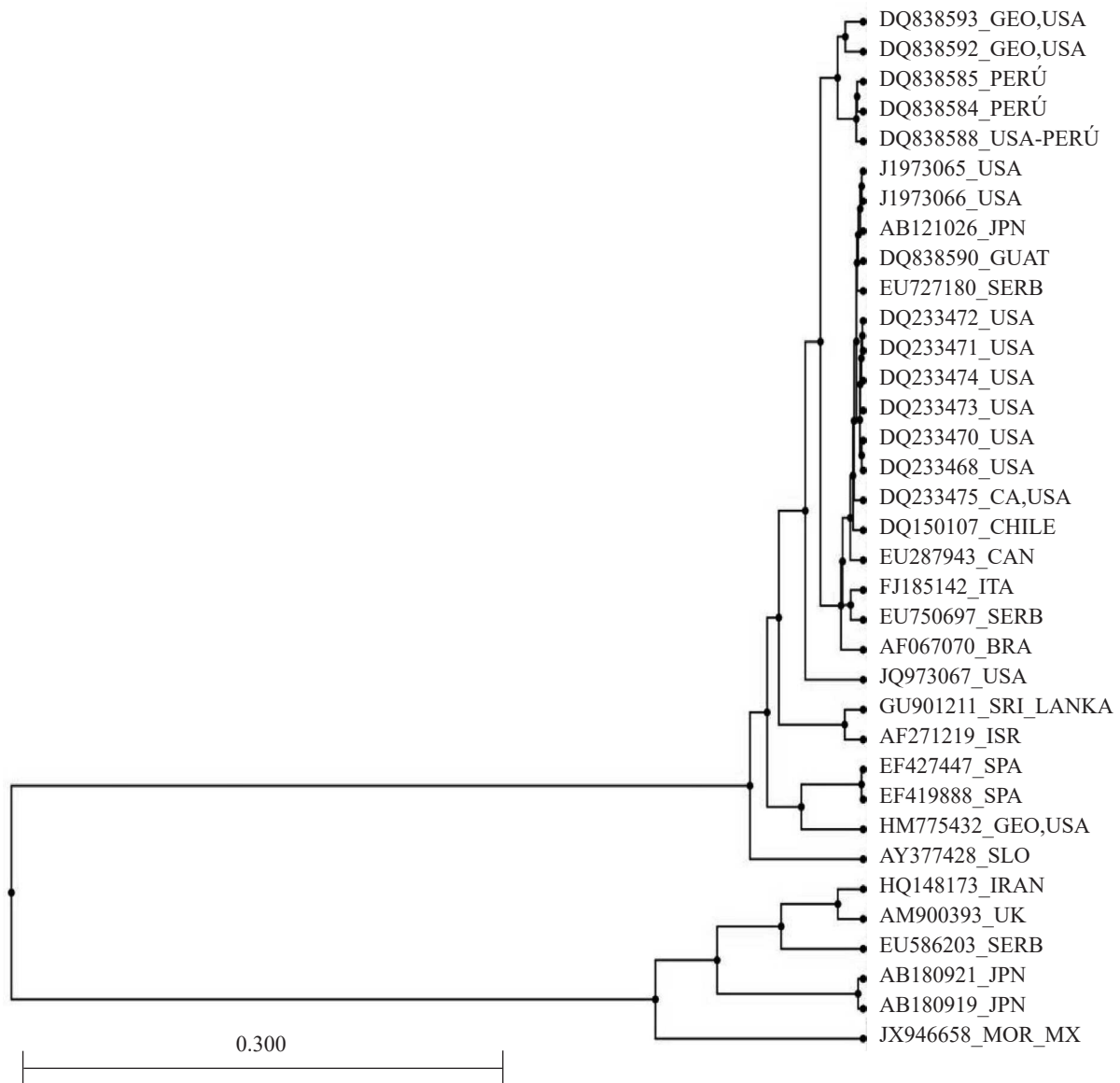
### ACKNOWLEDGEMENT

To the onion farmers in Morelos, Mexico and the project supported by FOMIX MOR-2010-01 code 148902.

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

## LITERATURA CITADA

- Bulajić, A., Djekić, I., Jović, J., Krnjajić, S., Vučurović, A., and Krstić, B. 2009. Incidence and distribution of *Iris yellow spot virus* on onion in Serbia. *Plant Dis.* 93:976-982. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-93-10-0976>
- Córdoba, S.; L. Martínez P.; R. M. Muñoz G.; M. L. Lerma T.; C. J. G. 2005. *Iris yellow spot virus* (IYSV): A new virus disease in the spanish onions. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 425-430. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-89-1243a>
- Cortés, I., Livieratos, I. C., Derks, A., Peters, D., and Kormelink, R. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct *tospovirus* species. *Phytopathology* 88:1276-1282. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.1998.88.12.1276>
- Du Toit, L. J., Pappu, H. R., Druffel, K. L., Pelter, G. Q. 2004. *Iris yellow spot virus* in onion bulb and seed crops in Washington. *Plant Dis.* 88:222. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2004.88.2.222a>



**Figura 3.** Relaciones filogenéticas de las secuencias registradas de *Iris yellow spot virus* en el GeneBank de diferentes partes del mundo, con respecto a la secuencia obtenida en plantas de cebolla de Morelos, México (JX946658\_IYSV\_MEX).

**Figure 3.** Phylogenetic relations of the *Iris yellow spot virus* sequences registered in the GeneBank of different parts of the world, in regard to the sequence obtained in onion plants from Morelos, Mexico (JX946658\_IYSV\_MEX).

Elena, S. F., Agudelo R. P., Carrasco P., Codoner F. M., Martin S., Torres B. C., and Sanjuán R. (2008). Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity*, 100(5), 478-483. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6801088>

Fichtner, S. M., Gent, D. H., Schwartz, H. F., Cranshaw, W. S., Mahaffey, L., and Khosla, R. 2004. Geospatial relationships of *Iris yellow spot virus* and thrips to onion production in Colorado. Pages 149-151 in: *Proc. Natl. Allium Res.*

Conf., Grand Junction, CO. Colorado State University, Fort Collins. <http://dx.doi.org/10.1094/php-2010-0820-01-rs>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FAOSTAT consultado en el año 2011. Disponible en línea: <http://faostat.fao.org/>

Gent, D. H., Du Toit, L. J., Fichtner, S. F., Krishna Mohan, S.,

- Pappu, H. R. and Schwartz, H. F. 2006. *Iris yellow spot virus*: an emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Dis.* 90:1468–1480. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-90-1468>
- Gent, D. H., Schwartz, H. F., and Khosla, R. 2004. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. *Plant Dis.* 88:446-452. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2004.88.5.446>
- Gera, A., Cohen, J., Salomon, R. and Racciah, B. 2004. *Iris Yellow Spot Tospovirus* detected in Onion (*Allium cepa*) in Israel. *Plant Dis.* 82:127. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1998.82.1.127b>
- Hammon, R. 2004. Managing Thrips in western Colorado onions. Page 107 in: Proc. 2004 Natl. *Allium* Res. Conf., Grand Junction, CO. Colorado State University, Fort Collins. Disponible en línea: <http://www.colostate.edu/Orgs/VegNet/Resources/2009%20Straw%20Mulch.pdf>
- Iftikhar, R., Ramesh S. V., Bag S., Ashfaq M., and Pappu, H. R. 2014. Global analysis of population structure, spatial and temporal dynamics of genetic diversity, and evolutionary lineages of *Iris yellow spot virus* (Tospovirus: Bunyaviridae). *Gene*, 547(1), 111-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.036>
- Kritzman, A., Lampel, M., Racaah, B., and Gera, A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Dis.* 85:838-842. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2001.85.8.838>
- Nischwitz, C., Pappu, H. R., Mullis, S. W., Sparks A. N., Langston, D. R., Csinos A. S. and Gitaiti, R. D. 2007. Phylogenetic Analysis of *Iris yellow spot virus* Isolates from Onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. *J. Phytopathology* 155, 531–535. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01272.x>
- Osuna C. F.J. y Ramírez R. S. 2013. Manual para cultivar cebolla con fertirriego y riego por gravedad en el estado de Morelos. SAGARPA. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Zacatepec. Libro Técnico No. 12. 155 p. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/profile/Felipe\\_Osuna3/publication/279852442\\_Manual\\_para\\_cultivar\\_cebolla\\_con\\_fertirriego\\_y\\_riego\\_por\\_gravedad\\_en\\_el\\_estado\\_de\\_Morelos/links/559c166208ae898ed650fe32.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Felipe_Osuna3/publication/279852442_Manual_para_cultivar_cebolla_con_fertirriego_y_riego_por_gravedad_en_el_estado_de_Morelos/links/559c166208ae898ed650fe32.pdf)
- Pappu, H. R., Rosales, I. M., and Druffel, K. L. 2008. Serological and molecular assays for rapid and sensitive detection of *Iris yellow spot virus* infection of bulb and seed onion crops. *Plant Dis.* 92:588-594. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-4-0588>
- Pozzer, L., Bezerra, I. C., Kormelink, R., Prins, M., Peters, D., Resende, R. de O., and de Ávila, A. C. 1999. Characterization of a *tospovirus* isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Dis.* 83:345-350. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1999.83.4.345>
- Riley, D. G., Joseph, S. V., Srinivasan, R., and Diffie, S. (2011). Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.1603/ipmap10020>
- Robène, S. I., Hostachy B, Roux, C. M., Minatchy, J., Hédont, M., Pallas, R., Couteau, A., Cassam, N., Wuster, G., 2006. First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb and seed production fields in Reunion Island. *Plant Pathology* 55, 288. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01262.x>
- Schwartz, H. F., Brown, W. M., Blunt, T., Gent, D. H. 2002. *Iris yellow spot virus* on onion in Colorado. *Plant Dis.* 86:560. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2002.86.5.560d>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola por cultivo. consultado en el año 2012. Disponible en línea: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350)
- Smith, T. N., Wylie, S. J., Coutts, B. A., and Jones, R. A. C. 2006. Localized distribution of *Iris yellow spot virus* within leeks and its reliable large-scale detection. *Plant Dis.* 90:729-733. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-90-0729>
- Velásquez V. R. y Reveles H. M., 2011. Detección del *Iris yellow spot virus* en el cultivo de cebolla en Zacatecas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(6), 971-978. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342011000600013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342011000600013&script=sci_arttext)
- Velásquez V. R., Reveles T. L. R., Salas M. S., Mauricio C. J. A., and Pappu, H. R. 2016. First Confirmed Report of *Iris yellow spot virus* in Onion Nurseries in Zacatecas, México. *Plant Dis.* <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-16-0061-pdn>

# Histopathology of the infection process of *Colletotrichum truncatum* in papaya and pea leaves

## Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo

Indira Rojo-Báez, Raymundo S. García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas, Raúl Allende-Molar\* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán. Carretera Culiacán-Eldorado km 5.5, Campo el Diez, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. \*Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 14 de Abril, 2016

Aceptado: 18 de Junio, 2016

Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 316-325.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1604-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3)

Primera publicación DOI: 21 de Junio, 2016

First DOI publication: June 21st, 2016

**Resumen.** *Colletotrichum truncatum* es un hongo patógeno causante de antracnosis en diversos hospedantes; se desconoce el proceso de infección de este patógeno en hojas de papaya, así como el comportamiento de una misma cepa de *C. truncatum* en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir, mediante técnicas histológicas, el proceso de infección de una cepa de *C. truncatum* en hojas de papaya y chícharo. En los dos hospedantes, la penetración del hongo ocurrió de manera directa por medio de apresorios alrededor de las 20 h después de la inoculación (hdi). En papaya, las hifas crecieron intercelularmente a las 24-60 hdi; la colonización necrotrófica inició a las 60 hdi; hifas intracelulares crecieron en células del

**Abstract.** *Colletotrichum truncatum* is a pathogenic fungus causing anthracnose in several hosts; the infection process of this pathogen in papaya leaf as well as studies of the same strain of *C. truncatum* in different hosts is unknown. The aim of this study was to describe the infection process of a *Colletotrichum truncatum* strain by histological techniques in papaya and pea leaves. In both hosts, direct penetration occurred through appressoria around 20 h after inoculation (hai). In papaya, intercellular hyphae grew at 24-60 hai; the necrotrophic colonization began at 60 hai; intracellular hyphae grew in mesophyll cells causing extensive cellular degradation; in contrast, in pea primary infection hyphae began at 36 hai, secondary infection hyphae (necrotrophic state) began at 72 hai. In both hosts, the acervuli were observed at 96 hai, which was associated with typical anthracnose lesions. *C. truncatum* behaved as intramural subcuticular pathogen in papaya and as intracellular pathogen in pea; so that, the infection strategy is dependent on the host.

**Keywords:** *Carica papaya*, *Pisum sativum*,



mesófilo causando una extensiva degradación celular; en contraste, en chicharo se observaron hifas primarias de infección a partir de las 36 hdi, las hifas secundarias de infección (estado necrótico) se observaron a las 72 hdi. En ambos hospedantes, los acérvulos se observaron a las 96 hdi, lo cual se asoció con la producción de lesiones típicas de antracnosis. *Colletotrichum truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chicharo; por lo que la estrategia de infección es dependiente del hospedante.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, *Pisum sativum*, patógeno intramural, patógeno intracelular.

*Colletotrichum* spp., agentes causales de la antracnosis, afectan a un amplio rango de hospedantes en pre y poscosecha. Las especies de *Colletotrichum* emplean diferentes estrategias de infección: intramural subcuticular o intracelular; incluso, ambas en distintos órganos del mismo hospedero (Perfect *et al.*, 1999; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Las estrategias de infección están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), por lo que es importante conocer el proceso de infección para determinar el ciclo biológico de la enfermedad, lo que podría sugerir el uso adecuado de una estrategia de control al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante. La antracnosis es una de las principales enfermedades en el cultivo de papaya. En México, las pérdidas reportadas superan el 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* se reportó en 2008 como causante de antracnosis en papaya (*Carica papaya*) en México (Tapia-Tusell *et al.*, 2008), con una incidencia de hasta 40 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). Esta especie utiliza mecanismos de infección distintos, ya que se comporta como

intramural pathogen, intracellular pathogen.

*Colletotrichum* spp., causal agents of anthracnose, affect a wide range of hosts in both pre- and post-harvest. The species of *Colletotrichum* use different infection strategies: intramural subcuticular or intracellular, or even both in different organs of the same host (Perfect *et al.*, 1999; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Infection strategies are correlated with the specificity in the host (Pring *et al.*, 1995), which is why it is important to know the infection process to determine the biological cycle of the disease, which could suggest the adequate use of a control strategy once we know the period in which the pathogen is developed in the host.

Anthracnose is one of the main diseases in papaya crops. In Mexico, reported losses are above 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* was reported in 2008 as the cause of anthracnose in papaya (*Carica papaya*) in Mexico (Tapia-Tusell *et al.*, 2008), with an incidence of up to 40 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). This species uses different infection mechanisms, since it behaves like an intracellular hemibiotrophic pathogen in pea (*Pisum sativum*), broad bean (*Vicia faba*), and lentil plants (*Lens culinaris*) (O'Connell *et al.*, 1993; Latunde-Dada and Lucas, 2007), and as a subcuticular intramural pathogen in chili pepper (*Capsicum annum*), chickpea (*Cicer arietinum*), peanut (*Arachis hypogaea*), and bean plants (*Phaseolus vulgaris*) (Pring *et al.*, 1995; Ranathunge *et al.*, 2012). Although there are diverse studies related to this species, the process of pathogenesis is unknown for papaya leaves; also, there is scarce information describing the infection process of a same strain of the pathogen in different hosts. The aim of this study was to describe the histological changes presented during the infection of papaya and pea leaves by *C. truncatum*.

We used healthy Maradol papaya (three months

patógeno hemibiotrófico intracelular en chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y lenteja (*Lens culinaris*) (O'Connell *et al.*, 1993; Latunde-Dada y Lucas, 2007) y como patógeno intramural sub-cuticular en chile (*Capsicum annuum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Pring *et al.*, 1995; Rathanunge *et al.*, 2012). Aunque existen diversos estudios relacionados con esta especie, se desconoce el proceso de patogénesis en hojas de papaya; además, existe escasa información en donde se describa el proceso de infección de una misma cepa del patógeno en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir los cambios histológicos que se presentan durante la infección de hojas de papaya y chícharo por *C. truncatum*.

Se utilizaron hojas de plantas sanas de papaya Cv. Maradol (tres meses de edad) y chícharo Cv. Lincoln (tres semanas de edad). La cepa CCM de *C. truncatum* se utilizó como inóculo. Previamente se aisló de un fruto de papaya con síntomas de antracnosis, se purificó mediante cultivo monospórico y se caracterizó molecularmente (KF147902). La suspensión de conidios se preparó a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL a partir de un cultivo de siete días de crecimiento en PDA. La superficie abaxial de 15 hojas de papaya y 30 hojas de chícharo, previamente desinfectadas con etanol al 70 %, se inoculó en seis y tres puntos de  $1 \text{ cm}^2$  respectivamente, por deposición de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de inóculo. Como tratamiento testigo, se colocaron alícuotas de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de agua destilada estéril en cinco hojas de papaya y 10 hojas de chícharo. Las hojas de papaya se colocaron en bolsas de polietileno con papel absorbente humedecido con agua destilada (Pandey *et al.*, 2012) y las de chícharo en cajas Petri de vidrio con papel filtro Whatman N° 2 esterilizado y humedecido con agua destilada para incrementar la humedad relativa. Todas las hojas se incubaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante seis días. Se tomaron sec-

old) and Lincoln pea leaves (three months old). The CCM strain of *C. truncatum* was used as an inoculum. Beforehand, it was isolated from a papaya fruit with anthracnose symptoms, purified using monosporic cultivation, and characterized molecularly (KF147902). The conidia suspension was prepared at a concentration of  $1 \times 10^6$  spores/mL from a culture grown for 7 days in PDA. The abaxial surfaces of 15 papaya leaves and 30 pea leaves, previously disinfected with ethanol at 70 %, were inoculated in six and three points of  $1 \text{ cm}^2$  respectively, by depositing  $10 \text{ }\mu\text{L}$  of inoculant. As a control treatment,  $10 \text{ }\mu\text{L}$  aliquots of sterile distilled water were placed on five papaya leaves and 10 pea leaves. The papaya leaves were placed in polyethylene bags with pieces of paper towels moistened with distilled water (Pandey *et al.*, 2012), and the pea leaves were placed in glass Petri dishes with N° 2 Whatman filter paper, sterilized and moistened with distilled water to increase the relative humidity. All leaves were incubated at  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  for six days. Sections of  $5 \text{ mm}$  of tissue were taken from the inoculated areas at 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, and 148 hours after inoculation (hai), and placed in plastic cassettes to include them in paraffin. The samples were submerged in an FAA fixing solution (10 % formaldehyde, 5 % acetic acid, 50 % ethanol at 96%) for at least 24 h. Later, the tissues were gradually dehydrated with ethyl alcohol (50, 70, 80, 96, and 100 %) and filtrated in (Leica) paraffin for 3 h, after having been transferred in absolute alcohol-xylene (v/v) and xylene (twice) (Rodríguez-López *et al.*, 2013). The samples were kept in the solutions for 3 h and finally shaken twice in a centrifugal tissue processor (Thermo Scientific, STP 120, GER).

In an embedding workstation (Thermo Scientific, HistoStar, UK), the samples were placed in metallic molds with molten paraffin, they were

ciones de 5 mm de tejido de las áreas inoculadas a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 148 horas después de la inoculación (hdi), y se colocaron en casetes de plástico para incluirlas en parafina. Las muestras se sumergieron en solución fijadora FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético, 50 % etanol al 96%) durante al menos 24 h. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron gradualmente con alcohol etílico (50, 70, 80, 96 y 100 %) y se infiltraron en parafina (Leica) durante 3 h, previa transferencia en alcohol absoluto-xileno (v/v) y xileno (dos veces) (Rodríguez-López *et al.*, 2013). Las muestras permanecieron en las soluciones durante 3 h y finalmente, se agitaron dos veces en un procesador de tejidos centrífugo (Thermo Scientific, STP 120, GER).

En un centro de inclusión (Thermo Scientific, HistoStar, UK), las muestras se colocaron en moldes metálicos con parafina fundida, se les colocó un casete de plástico, se agregó parafina fundida y se dejaron enfriar. Las muestras se cortaron longitudinalmente y transversalmente con respecto a la nervadura central a 6  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótomó semiautomático (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER). Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina (Sigma) al 1 % en alcohol etílico al 50 % y verde-rápido (Sigma) al 1 % en etanol al 96 %, se montaron en resina Entellan (Merck) y se secaron durante 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). Las laminillas se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss AxioStar Imager A2 con cámara integrada para identificar los daños en tejido. Se realizaron 36 observaciones por muestra. Los apresorios se midieron con el software ZEN 2012 (blue edition).

Entre las 2 y 18 hdi sólo se observaron conidios de *C. truncatum* sin germinar en la superficie de la hoja. La germinación inició a partir de las 20 hdi, y en el extremo apical de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café

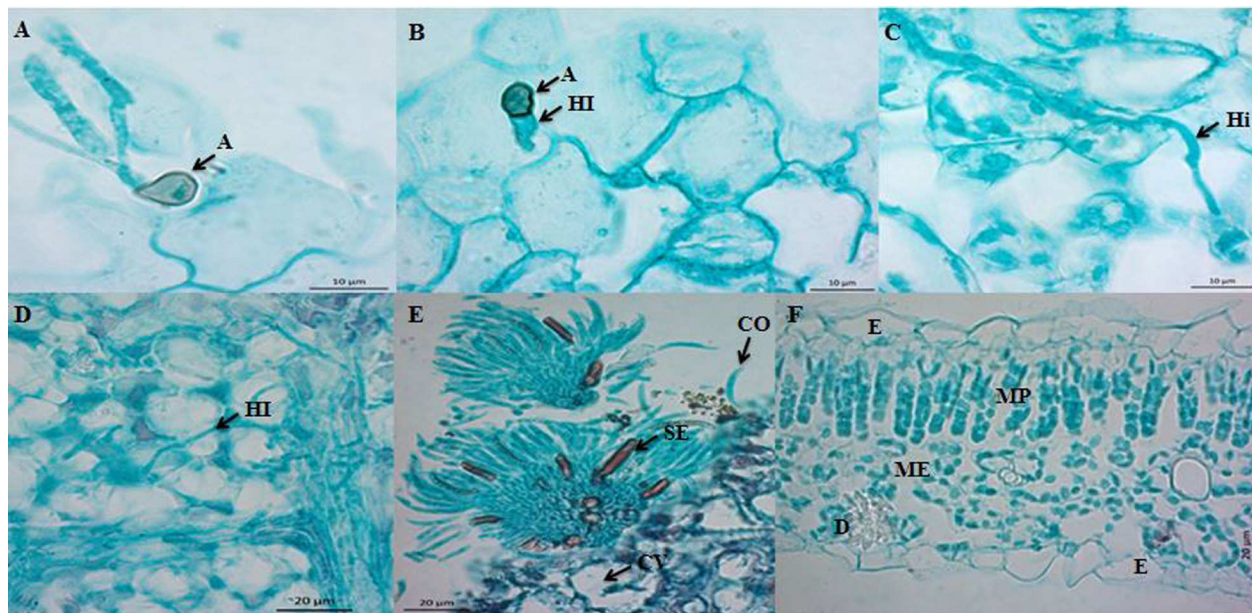
added a in plastic cassettes, molten paraffin was added, and they were left to cool. The samples were cut longitudinally and transversely to the 6  $\mu\text{m}$  thick midrib in a semiautomatic microtome (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER). The sections obtained were dyed with safranin (Sigma) at 1 % in ethyl alcohol at 50 % and fast green (Sigma) at 1 % in ethanol at 96 %, they were mounted on Entellan resin (Merck) and left to dry for 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). The lamellae were observed under a Carl Zeiss AxioStar Imager A2 optical microscope with an integrated camera to identify tissue damage. Thirty-six observations were carried out for every sample. The appressoria were measured using the software ZEN 2012 (blue edition).

Between 2 and 18 hai only non-germinated *C. truncatum* conidia were observed on the surface of the leaf. Germination began after 20 hai, and on the apical end of the germination tubes, dark brown melanized appressoria were formed, balloonlike to irregularly shaped, and on average, 7.67 x 5.26  $\mu\text{m}$  (Figura 1A). *C. truncatum* formed melanized appressoria to improve adhesion and penetration, by mechanical action and enzyme lysis (Kubo *et al.*, 2000). The first infection hyphae emerged from the appressoria 24-48 hai (Figure 1B). In the interval of 24-60 hai, intramural hyphae were observed, which grew on cell walls (Figure 1C). At 60 hai we observed the start of the necrotrophic state, since intracellular hyphae were observed (Figure 1D); also, cavities were observed (Figure 1E), which according to Pring *et al.* (1995) are indicative of cell wall degradation. The acervuli (Figure 1E) were related to the dark coloration on the surface of the host in contrast with the control leaf, which showed no symptoms (Figure 1F). At 96 hai, the pathogen completed its life cycle and produced acervuli with conidia, which are the inoculum source for infections in new tissues (Ranathunge

oscuro, de forma globosa a irregular, y de  $7.67 \times 5.26 \mu\text{m}$  en promedio (Figura 1A). *C. truncatum* formó apresorios melanizados para facilitar la adhesión y la penetración, por medio de acción mecánica y lisis enzimática (Kubo *et al.*, 2000). Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios a partir de las 24-48 hdi (Figura 1B). En el lapso de 24-60 hdi se observaron hifas intramurales, las cuales crecieron en las paredes celulares (Figura 1C). A las 60 hdi se observó el inicio del

*et al.*, 2012). The cell damage and the production of acervuli were associated with the appearance of dark, brown to black semicircular lesions, on the third day after inoculation (Figure 2A), in contrast with the control leaf (Figure 2B).

The infection strategy of *C. truncatum* in pea leaves was different. The conidia did not germinate until 12 hai. At 18 hai, the germination tubes emerged in a polar and lateral way. From the germination tubes, dark brown melanized appressoria were



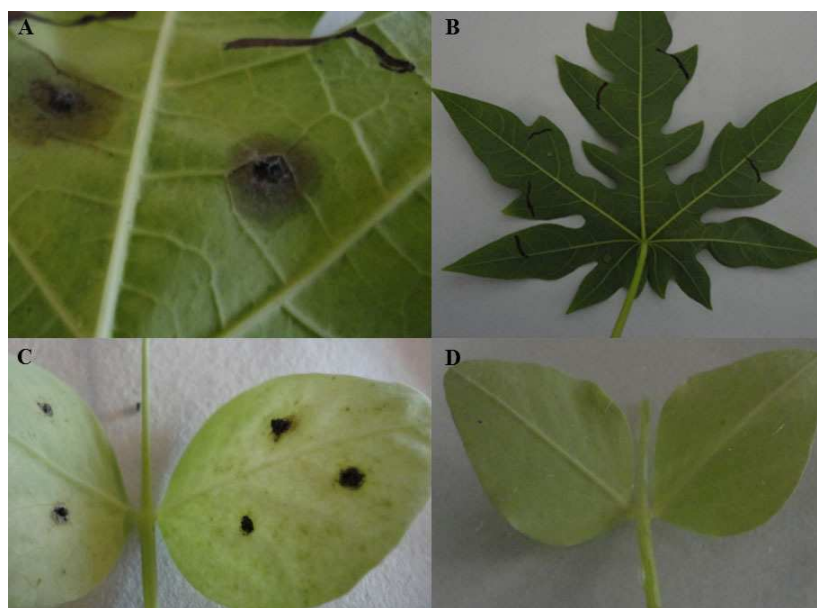
**Figura 1.** Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de papaya cv Maradol. A) Corte longitudinal de hoja a las 20 hdi, formación de apresorios melanizados (A) a partir de tubos germinativos polares de conidios. Barra =  $10 \mu\text{m}$ . B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 24 hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra =  $10 \mu\text{m}$ . C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intramural (Hi). Barra =  $10 \mu\text{m}$ . D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intracelular (HI). Barra =  $20 \mu\text{m}$ . E) Corte trasversal de hoja de papaya infectada por *C. truncatum* 96 hdi, formación de acérvulo en el hospedante, conidióforos (CO), setas incrustadas (SE) y cavidades (CV). Barra =  $20 \mu\text{m}$ . F) Corte trasversal de hoja sana. Epidermis (E), mesófilo en empalizada (MP), mesófilo esponjoso (ME) y drusa (D). Barra =  $20 \mu\text{m}$ .

**Figure 1.** Microphotographs of the infection process of *C. truncatum* on detached Maradol papaya leaves. A) Longitudinal cut of a leaf 20 hai, formation of melanized appressoria (A) from polar germination tubes from conidia. Bar =  $10 \mu\text{m}$ . B) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 24 hai. First infection hyphae (IH) emerging from appressoria (A). Bar =  $10 \mu\text{m}$ . C) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 60 hai. Intramural hypha (iH). Bar =  $10 \mu\text{m}$ . D) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 60 hai. Intracellular hypha (HI). Bar =  $20 \mu\text{m}$ . E) Transversal cut of a papaya leaf infected by *C. truncatum* 96 hai, formation of acervulus in the host, conidiophores (CO), embedded setae (SE), and cavities (CV). Bar =  $20 \mu\text{m}$ . F) Transversal cut of a healthy leaf. Epidermis (E), palisade mesophyll (MP), spongy mesophyll (ME), and druse (D). Bar =  $20 \mu\text{m}$ .

estado necrótico, ya que se observaron hifas intracelulares (Figura 1D); además, se observaron cavidades (Figura 1E), que de acuerdo con Pring *et al.* (1995) son indicativas de la degradación de paredes celulares. Los acérvulos (Figura 1E) se asociaron con la coloración oscura en la superficie del hospedante en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas de enfermedad (Figura 1F). A las 96 hdi, el patógeno completó su ciclo de vida al producir acérvulos con conidios, los cuales son la fuente de inóculo para infecciones en nuevos tejidos (Ranathunge *et al.*, 2012). El daño celular y la producción de acérvulos se asociaron con la aparición de lesiones oscuras semicirculares de coloración marrón a negro, al tercer día después de inoculación (Figura 2A), en contraste con la hoja testigo (Figura 2B).

La estrategia de infección de *C. truncatum* en ho-

formed, balloonlike to irregularly shaped, and measuring  $8.24 \times 5.92 \mu\text{m}$  on average. The first infection hyphae emerged from the appressoria between 18 and 20 hai, unlike what occurred in the papaya leaf (Figure 3A). We observed lobulated, intracellular branched (primary) hyphae between 36 hai and 60 hai (Figure 3B). Although the primary infection hyphae appeared in the cell lumen, no lysis was observed. The main characteristic of the intracellular invasion is the formation of primary infection hyphae, which can have different morphologies depending on the species (O'Connell *et al.*, 2000). The primary hypha of *C. truncatum* is multilobulated, branched, and large (Latunde-Dada and Lucas, 2007). During the biotrophic state, the primary hypha was invaginated towards the cell lumen (Figure 3B). According to O'Connell *et al.* (2000), the primary hypha forms an interfacial



**Figura 2.** Síntomas de antracnosis ocasionados por la cepa CCM de *C. truncatum* en distintos hospedantes. A) Hoja de papaya Maradol con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; B) Hoja de papaya testigo; C) Hoja de chícharo Lincoln con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; D) Hoja de chícharo testigo.

**Figure 2.** Anthracnose symptoms by the CCM strain of *C. truncatum* in different hosts. A) Maradol papaya leaf with symptoms of anthracnose 148 hai; B) Control papaya leaf; C) Lincoln pea leaf with anthracnose symptoms 148 hai; D) Control pea leaf.

jas de chicharo fue distinta. Los conidios permanecieron sin germinar hasta las 12 hdi. A las 18 hdi, los tubos germinativos emergieron de manera polar y lateral. A partir de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café oscuro, de forma globosa a irregular, y de  $8.24 \times 5.92 \mu\text{m}$  en promedio. Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios entre las 18 y 20 hdi a diferencia de lo que ocurrió en hoja de papaya (Figura 3A). Se observaron hifas lobuladas, ramificadas intracelulares (hifas primarias) de las 36 hdi hasta las 60 hdi (Figura 3B). A pesar de que las hifas primarias de infección se presentaron en el lumen celular, no se observó lisis. La principal característica de la invasión intracelular es la formación de hifas primarias de infección; éstas pueden tener diferente morfología según la especie (O'Connell *et al.*, 2000). La hifa primaria de *C. truncatum* es multilobulada, ramificada y grande (Latunde-Dada y Lucas, 2007). Durante el estado biótrofo, la hifa primaria se invaginó hacia el lumen celular (Figura 3B). De acuerdo con O'Connell *et al.* (2000), la hifa primaria forma una matriz interfacial compuesta de glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina que separa a la hifa de la membrana plasmática del hospedante.

Se observaron hifas de infección delgadas (hifas secundarias), las cuales emergieron de hifas primarias de infección a las 72 hdi (Figura 3C). Según Bhadauria *et al.* (2011), la transición del estado biótrofo al necrótrofo se asocia con el desarrollo de hifas secundarias delgadas, las cuales maceran los tejidos del hospedante. Las hifas secundarias colonizaron células de manera intracelular, lo cual ocasionó daño celular con la formación de cavidades celulares (Figura 3D). De acuerdo con Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) las cavidades celulares indican disolución celular. La formación de acérvulos inició a partir de las 96 hasta las 148 hdi y éstos contenían conidióforos, setas melanizadas y con-

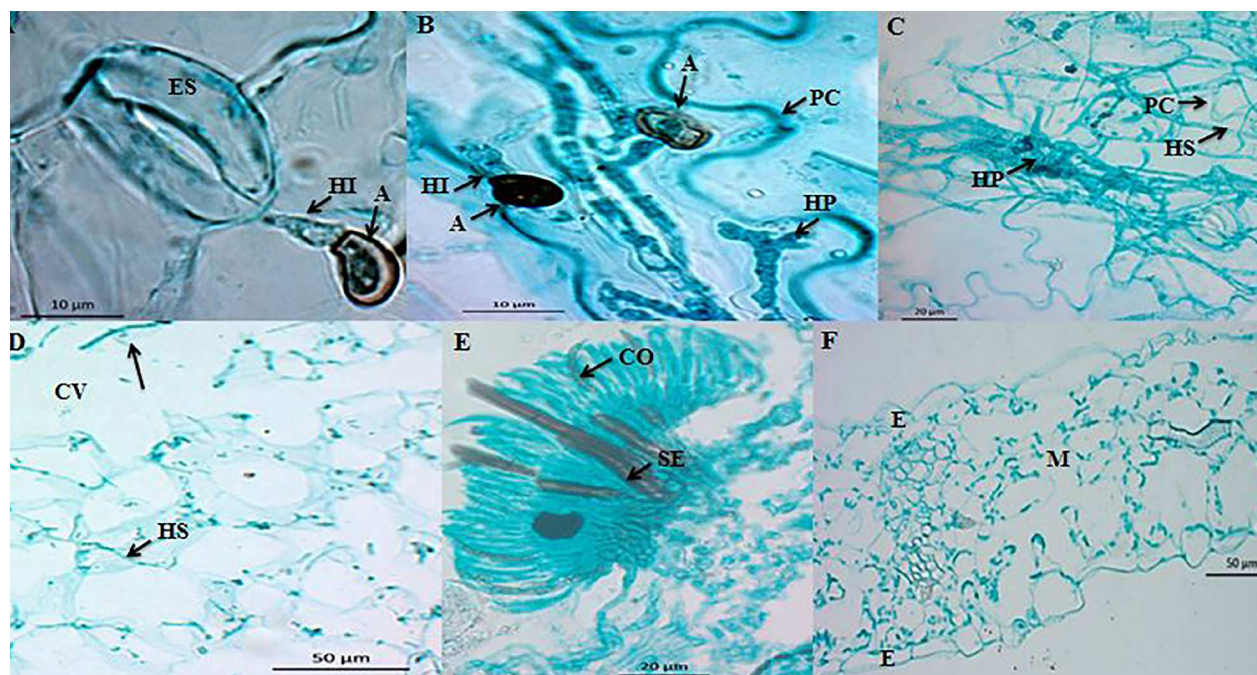
matrix composed of glycoproteins, rich in proline and hydroxyproline that separates the plasmatic membrane from the host.

We observed thin infection hyphae (secondary hyphae), which emerged from the primary infection hyphae 72 hai (Figure 3C). According to Bhadauria *et al.* (2011), the transition from the biotrophic state to the necrotrophic state is associated with the growth of thin secondary hyphae, which soften the host's tissues. The secondary hyphae colonized cells intracellularly, which caused cell damage with the formation of cell cavities (Figure 3D). According to Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) cell cavities indicate cell dissolution. The formation of acervuli began 96 hai until 148 hai and they contained conidiophores, melanized setae and conidia (Figure 3E), in contrast with the healthy leaf (Figure 3F). Cell damage was associated with the symptoms of anthracnose (Figure 2C), in contrast with the control leaf, which presented no symptoms (Figure 2D). Unlike the study carried out by O'Connell *et al.* (1993), the strain of *C. truncatum* used in this investigation produced acervuli in pea. The acervuli with conidia were produced starting at 96 hai, thus concluding the life cycle of the pathogen. The symptoms of anthracnose in pea leaves at 148 hai were limited in extension, in contrast to those observed in papaya, probably due to the strain originally being isolated from the papaya fruit.

## CONCLUSION

This study showed that the CCM strain of *C. truncatum* behaved as a subcuticular intramural pathogen in papaya, and as an intracellular hemibiotrophe in pea, therefore the infection process depends on the host.

## ACKNOWLEDGEMENTS



**Figura 3.** Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de chícharo cv Lincoln. A) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 18 hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra = 10  $\mu$ m. B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 36 hdi. Hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A), así como hifa primaria (HP) lobulada delimitada por la pared celular (PC) del hospedante. Barra = 10  $\mu$ m. C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias (HS) emergiendo de hifas primarias (HP), las cuales atraviesan las paredes celulares (PC) del hospedante. Barra = 20  $\mu$ m. D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias de infección (HS) invadiendo intracelularmente. Se observan cavidades (CV) durante el estado necrótico. Barra = 50  $\mu$ m. E) Corte transversal de hoja de chícharo a las 96 hdi. Formación de acérvulo en la superficie del hospedante. Presencia de conidióforos (CO) y setas incrustadas (SE). Barra = 20  $\mu$ m. F) Corte transversal de hoja sana. Epidermis (E) y mesófilo (M). Barra = 50  $\mu$ m.

**Figure 3.** Microphotographs of the infection process of *C. truncatum* in detached Lincoln pea leaves. A) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 18 hai. First infection hyphae (HI) emerging from appressoria (A). Bar = 10  $\mu$ m. B) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 36 hai. Infection hyphae (HI) emerging from appressoria (A), as well as from a lobulated primary hypha (HP) limited by the cell wall (CW) of the host. Bar = 10  $\mu$ m. C) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 72 hai. Secondary hyphae (SH) emerging from primary hypha (HP), which penetrate the cell walls (CW) of the host. Bar = 20  $\mu$ m. D) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 72 hai. Secondary infection hyphae (HS) invading intracellularly. Cavities (CV) are observed during the necrotrophic state. Bar = 50  $\mu$ m. E) Transversal cut of a pea leaf 96 hai. Formation of acervulus on the surface of the host. Presence of conidiophores (CO) and embedded setae (SE). Bar = 20  $\mu$ m. F) Transversal cut of a healthy leaf. Epidermis (E) and mesophyll (M). Bar = 50  $\mu$ m.

dios (Figura 3E), en contraste con la hoja sana (Figura 3F). El daño celular se asoció con los síntomas de antracnosis (Figura 2C), en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas (Figura 2D). A diferencia del estudio realizado por O'Connell *et al.* (1993), la cepa de *C. truncatum* utilizada en la presente investigación produjo acérvulos en

To the project 2011-163213 "El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador" financed by SAGARPA, to CONACyT for funding the studies for I. Rojo-Báez, and to Dr. Apolinar Santamaría Miranda of the CIIDIR-IPN Sinaloa for her support in performing the histopathological analysis in her laboratory.

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

chícharo. Los acérvulos con conidios se produjeron a partir de las 96 hdi, concluyendo así el ciclo de vida del patógeno. Los síntomas de antracnosis en hoja de chícharo a las 148 hdi fueron limitados en extensión, en contraste con los observados en papaya, probablemente debido a que la cepa originalmente se aisló de fruto de papaya.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que la cepa CCM de *C. truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chícharo, por lo que el proceso de infección es dependiente del hospedante.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez y a la Dra. Apolinar Santamaría Miranda del CIIDIR-IPN Sinaloa por su apoyo para realizar el análisis histopatológico en su laboratorio.

## LITERATURA CITADA

Bhadauria V, Banniza S, Vandenberg A, Selvaraj G and Wei Y. 2011. Cataloging proteins putatively secreted during the biotrophy-necrotrophy transition of the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. *Plant Signaling & Behavior*. 6:1457-1459. Disponible en línea: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/psb.6.10.17700>

Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutiérrez-Alonso G. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20: 88-93. Disponible en línea: <http://www.socmexfito.org/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya-carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeosporioides-penz>

Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Soto-Estrada A and Adaska-veg, JE. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*. 95:751-758. <http://dx.doi.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0751>

Kubo Y, Takano Y, Tsuji G, Horino O and Furusawa I. 2000. Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium* 99p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). *In: Colletotrichum Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS press, Minnesota, USA. 399 p.

Latunde-Dada AO and Lucas JA. 2007. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology*. 56:437-44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x/epdf>

O'Connell RJ, Uronu AB, Waksman G, Nash C, Keon JPR and Bailey JA. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology*. 42:774-783. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01564.x>

O'Connell RJ, Perfect S, Hughes B, Carzaniga R, Bailey J and Green J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. 55-77p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). *In: Colletotrichum Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS press, Minnesota, USA. 399 p.

Pandey A, Pandey BK, Muthukumar M, Yadava LP and Chauhan UK. 2012. Histopathological study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. on *Mangifera indica* L. *Plant Pathology Journal*. 11:18-24. <http://dx.doi.org/ppj.2012.18.24&linkid=pdf>

Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ and Green JR. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 27:186-198. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>

Pring RJ, Nash C, Zakaria M and Bailey JA. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46:137-152. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1995.1011>

Ranathunge NP, Mongkolporn O, Ford R and Taylor PWJ. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. *Australasian Plant Pathology*. 41:463-473. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>

Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 35:898-905. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a7.pdf>

Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Pérez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum*



*capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. Molecular Biotechnology. 40:293-298. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>  
Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and

genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). European Journal of Plant Pathology. 135:67-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>