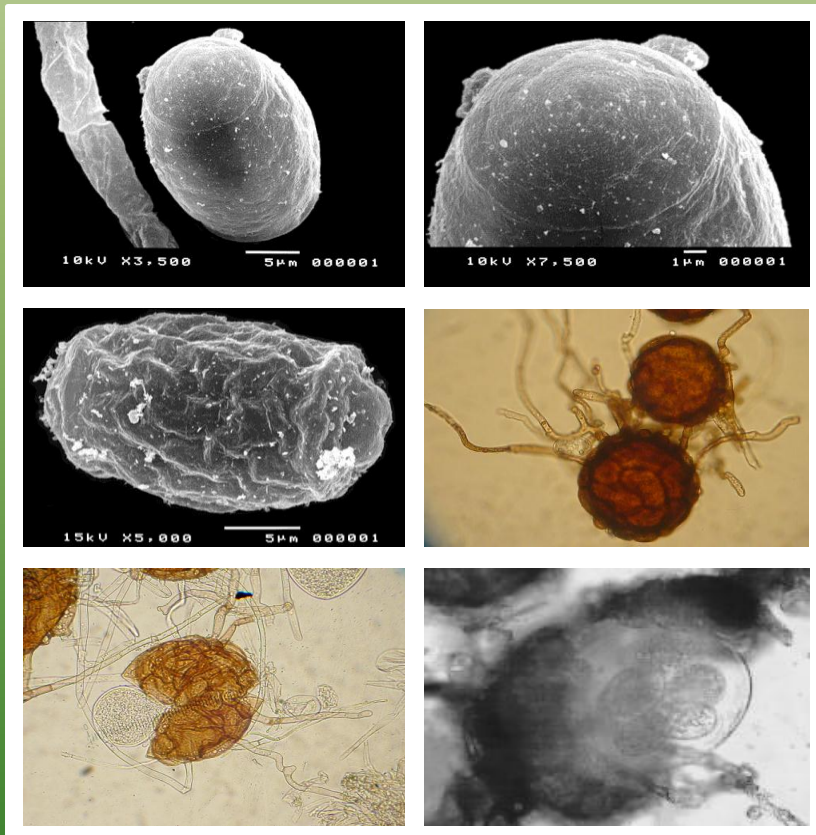


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 35, NÚMERO 1, Enero 2017



**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

Tec. Noemi De La Rosa Sánchez, 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. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, 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

Dr. Oscar Pérez Hernández, University of Central Missouri.

Dr. Ángel Ramírez Suárez, CENAM-CONACYT.

Dr. Moisés Roberto Vallejo Pérez, CONACY.

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, CIATEJ.

Dr. Raúl Allende Molar, CIAD.

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM.

Dr. David Espinosa Victoria, COLPOS.

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, UACH.

Portada: Micrografía con microscopía electrónica de barrido de *Podosphaera xanthii* en calabaza.

Original: Rubén Félix Gastélum

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Mulberry (*Morus alba*) leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit** * Extractos de hojas de morera (*Morus alba*) como una alternativa de control del moho azul en frutos de manzana en postcosecha. 1
Landro-Valeznuela N, Lara-Viveros FM, Nieto-Angel D, Aguado-Rodríguez J, Callejas-Hernández J.
- Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley** * *Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* aisladas de canales de irrigación del Valle de Culiacán. 20
Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB, León-Félix J, Allende-Molar R, Fernández-Pavia SP.
- Severity of a *Phytophthora capsici* isolate in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level** * Severidad de una cepa de *Phytophthora capsici* en plantas de chayote *Sechium edule* a nivel de cámara de crecimiento. 40
Andrade-Luna MI, Espinosa-Victoria D, Gómez-Rodríguez O, Cadena-Iñiguez J, Arévalo-Galarza ML, Trejo-Téllez LI, Delgadillo-Martínez J.
- Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*** * Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. 58
García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR, Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ, González-Esquivel CE.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN * REVIEW ARTICLES

- Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification** * Extracción y purificación de dsRNAs largos de plantas infectadas con virus y hongos; aplicación en la detección e identificación de virus. 80
Valverde RA, De La Torre-Almaraz R.
- Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines** * Las cenicillas en cultivos agrícolas de Sinaloa: Situación actual sobre su identificación y líneas futuras de investigación. 106
Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Beltran-Peña H, Apodaca-Sánchez MA, Espinoza-Matías S, Martínez-Valenzuela MC, Longoria-Espinoza RM, Olivas-Peraza NG.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Looking for natural antifungal agent: Sensitive assay to detect fungal endo-1,3- β -glucanase inhibitors from crude plant extracts** * Buscando agentes antifúngicos naturales: Ensayo sensible para detectar inhibidores de endo-1,3- β -glucanasa en extractos crudos de plantas. 130
Vargas-Arispuro I, Fraijo-Martínez M, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez-Téllez, MA.
- In vitro* first report of nutrients and silicon effect over the growth of *Phaeocryptopus gaeumannii* a pathogen of *Pseudotsuga menziesii*** * *In vitro* primer reporte del efecto de nutrientes y del silicio en el crecimiento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, un patógeno de *Pseudotsuga menziesii*. 139
Velázquez-Mendoza J, Salgado-Feregrino OJ, Yáñez Morales MJ, Jiménez-Casas M.
- First record of *Fusarium solani* and *F. equiseti* in plantations of *Jatropha curcas* in Mexico** * Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. 150
Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Martínez-Bolaños M, Hernández-Arenas M, López-Guillén G.

Mulberry (*Morus alba*) leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit

Extractos de hojas de morera (*Morus alba*) como una alternativa de control del moho azul en frutos de manzana en postcosecha

Nadia Landero-Valenzuela, Francisco M. Lara-Viveros*, CONACYT-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México; Daniel Nieto-Angel, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km. 36.5. 56230, Montecillo, Estado de México, México; Javier Aguado-Rodríguez, CONACYT-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México, Judith Callejas-Hernández, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Domicilio conocido. 42660, Tepatepec, Hidalgo, México. *Autor para correspondencia: fmlara@upfim.edu.mx.

Recibido: 10 de mayo, 2016.

Aceptado: 5 de agosto, 2016.

Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Nieto-Angel D, Aguado-Rodríguez J, Callejas-Hernández J. 2017. Mulberry (*Morus alba*) leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 1-19.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-2)

Primera publicación DOI: 22 de Octubre, 2016.

First DOI publication: October 22, 2016.

Resumen. *Penicillium expansum*, agente causal del moho azul en manzana, causa pérdidas significativas en frutos de manzana en postcosecha, y es controlado mayormente con fungicidas sintéticos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar extractos de hojas de morera (*Morus alba*) como una alternativa de control del moho azul en frutos de manzana en postcosecha. Once tratamientos, incluyendo un testigo químico (Imazalil) y otro sin

Abstract. *Penicillium expansum*, causal agent of blue mold on apple, causes significant postharvest losses in apple. This fungus is largely controlled with synthetic fungicides. The goal of this study was to evaluate the effect of leaf extracts of mulberry (*Morus alba*) as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruits. Eleven treatments including a chemical and an untreated control, were evaluated *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* experiments, mycelial growth and sporulation of the fungus were measured, and in the *in vivo* experiments severity and fruit decoloration were measured by image analysis. For the leaf extracts, asymptomatic mulberry leaves were collected, crushed and placed in a methanol or ethyl acetate as the solvent phase separation, or distilled water, each at concentrations of 4, 8 and 12%. The results showed that the extract methanol based at 4 % and 12 % inhibited mycelial growth. A treatment with 12 % aqueous extract had the same effect. As for

tratar, se evaluaron *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro* se midieron el crecimiento micelial y la esporulación del hongo, y en los experimentos *in vivo* se midieron la severidad y cambio de color del fruto mediante el análisis de imágenes. Para obtener los extractos de las hojas, se colectaron hojas asintomáticas de morera, se trituraron, y se pusieron en agua destilada esterilizada, metanol y acetato de etilo como solventes de separación de fases, o agua destilada, cada uno a concentraciones de 4, 8 y 12 %. Los resultados demostraron que el extracto obtenido con metanol a 4 y 12 %, y el extracto acuoso a 12 %, inhibieron el crecimiento micelial. En cuanto a la esporulación del hongo, ésta fue menor en los extractos a base de metanol a 4 y 12 % y el de acetato de etilo a 8 %, igualando al testigo químico. La severidad de la enfermedad en frutos inoculados fue menor en el tratamiento con Imazalil, seguido por el extracto acuoso al 4 %. Solo el tratamiento con acetato de etilo al 8 % cambió la coloración de los frutos.

Palabras clave: *Malus domestica*, *Morus alba*, *Penicillium expansum*, pérdidas postcosecha.

La manzana (*Malus domestica*) es uno de los frutos de mayor producción en el mundo, con un volumen global de cosecha de aproximadamente 80.8 millones de toneladas en 2013 (FAO, 2013). El principal productor de esta especie es China, con una producción anual de 39.6 millones de toneladas (49% de la producción mundial; FAO, 2013). La Unión Europea y los Estados Unidos ocupan el segundo y tercer lugar respectivamente (FAO, 2013). La producción de estas cantidades de manzana demanda el uso de plaguicidas (Sauphanor *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011) tanto en el campo como en el almacenamiento y transporte (Ticha *et al.* 2008). Uno de los fungicidas más ampliamente

the sporulation of the fungus, it was also observed that the extract methanol based at 4 and 12 % decreased sporulation, and the separated phase with ethyl acetate to 8 %, equaling the chemical control. The severity of disease on inoculated fruits was inhibited by Imazalil with 75.1 %, followed by extract (4 %) with a 40.3 % effectiveness. Only treatment with ethyl acetate at 8 % caused changes on the color of the fruits.

Additional key words: *Malus domestica*, *Morus alba*, *Penicillium expansum*, postharvest losses.

The apple (*Malus domestica*) is one of the most widely produced fruits in the world, with a global harvest volume of approximately 80.8 million tons in 2013 (FAO, 2013). The main producer of this species is China, with a worldwide production of 39.6 million tons (49% of the worldwide production; FAO, 2013). The European Union and the United States are the second and third largest producers, respectively (FAO, 2013). The production of these amounts of apples demands the use of pesticides (Sauphanor *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011), both on the field and in storage and transportation (Ticha *et al.* 2008). One of the fungicides that are most widely used to extend the shelf life of apples is Tiabendazole (He *et al.*, 2014). The tolerance to residues in the fruit of this product is of 5 µg/g in the United States (U.S. Government Publishing Office (GPO), 2015). Many times, with the intention of achieving a better disease control, fungicides are applied in higher doses than are recommended, surpassing the maximum residue tolerance, thus becoming a risk for consumers. Several fungicides have been related to the cause of several diseases in humans, such as cancer, reproductive damages, and endocrine disruption (Baldi *et al.*, 2001). Due to the knowledge of this information, consumers are

aplicados para extender la vida de anaquel de las manzanas es Tiabendazol (He *et al.*, 2014). La tolerancia de residuos en frutos de este producto es de 5 µg/g en los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. Government Publishing Office (GPO), 2015). Muchas veces, con la intención de lograr mejor control de enfermedades, se aplican fungicidas a dosis más altas de las recomendadas, sobrepasando la tolerancia máxima de residuos, y representando así un riesgo de daño a los consumidores. Varios fungicidas se han asociado a la causa de un gran número de enfermedades que afectan la salud humana tales como cáncer, daños reproductivos y disrupción endócrina (Baldi *et al.*, 2001). Debido al conocimiento de esta información los consumidores son más conscientes de su alimentación y demandan productos más saludables, mínimamente procesados, y sin residuos químicos o que hayan sido tratados con productos alternativos a los productos sintéticos (Saucedo *et al.*, 2009, Volk *et al.*, 2015). Uno de los principales patógenos que afectan a la manzana en postcosecha es *Penicillium expansum*, conocido comúnmente como moho azul. Este microorganismo causa las mayores pérdidas en frutos de manzana (Sanzani *et al.*, 2010), y es controlado principalmente mediante el uso de fungicidas sintéticos (Zhang *et al.*, 2011). Una alternativa a los tratamientos químicos es el uso de protectantes vegetales con actividad antimicrobial, algunos de los cuales son efectivos en el control de enfermedades en postcosecha (Kim *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007), tienen menos efectos ambientales, y no dañan o incluso mejoran la salud humana (Paranagama *et al.*, 2003). La morera (*M. alba*) ha sido aprovechada en medicina humana para controlar patógenos fúngicos y bacterianos, y su composición química ha sido estudiada ampliamente (Park *et al.*, 2003; Omidiran *et al.*, 2012). Al respecto, Park *et al.* (2003) encontraron que un compuesto conocido como kuwanon extraído de raíces

more aware of their nutrition and demand healthier products, processed at a minimum, and without chemical residues, or treated with products that are not synthetic (Saucedo *et al.*, 2009, Volk *et al.*, 2015). One of the main pathogens that affect apples in postharvest is *Penicillium expansum*, commonly known as the blue mold. This microorganism causes the greatest losses in apple fruits (Sanzani *et al.*, 2010), and is controlled mainly with the use of synthetic fungicides (Zhang *et al.*, 2011). An alternative to chemical treatments is the use of plant protectors with antimicrobial activity, some of which are effective in controlling diseases in postharvest (Kim *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007), they have less environmental effects, and don't damage, or may even improve, human health (Paranagama *et al.*, 2003). The mulberry (*M. alba*) has been used in human medicine to control fungal pathogens, and its chemical composition has been widely studied (Park *et al.*, 2003; Omidiran *et al.*, 2012). In this regard, Park *et al.* (2003) found that a chemical known as kuwanon, taken from mulberry roots, inhibited the growth of *Streptococcus sobrinus* y *S. sanguinis* significantly in mouth infections. Other chemical compounds identified in the leaves of this species are alkaloids, saponins, tannins, phenolic compounds, terpenes, glycosides, and flavonoids, all considered to have antimicrobial activity (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). 2-arilbenzofuran is a compound found in *M. alba* leaves and is reported as an effective agent in the control of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Fukai *et al.*, 2005).

Other bacteria controlled with *M. alba* derivatives are *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, (Fukai *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Proteus vulgaricus* (Omidiran *et al.*, 2012). The effect of some derivatives of *M.*

de morera inhibió significativamente el desarrollo de *Streptococcus sobrimus* y *S. sanguinnis* en infecciones bucales. Otros compuestos químicos que han sido identificados en hojas de esta misma especie son alcaloides, saponinas, taninos, compuestos fenólicos, terpenos, glucósidos y flavonoides, considerándose estos con actividad antimicrobial (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). El 2-arilbenzofuran es un compuesto encontrado en hojas de *M. alba* que se reporta como un agente efectivo de control de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Fukai *et al.*, 2005).

Otras bacterias que han sido controladas con derivados de *M. alba* son *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, (Fukai *et al.*, 2005, Rao *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Proteus vulgaricus* (Omidiran *et al.*, 2012). El efecto de algunos derivados de *M. alba* en hongos se ha estudiado en medicina humana en *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Rao *et al.*, 2012), *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* y *P. oxalicum* (Omidiran *et al.*, 2012). No obstante, poco se sabe sobre el efecto de extractos de esta especie vegetal en el control de hongos fitopatógenos. En la literatura solo se reportan estudios sobre el control de *A. niger* (Rao *et al.*, 2012), *F. guttiforme*, *Charala paradoxa* (Cerqueira *et al.*, 2016), *F. oxysporum* y *P. oxalycum* (Omidiran *et al.*, 2012). El entendimiento del efecto de extractos de morera en el control de hongos fitopatógenos podría constituir una alternativa sustentable de control del moho azul en manzana en postcosecha así como en campo y en otros cultivos.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de extractos de hojas de morera (*M. alba*) en el control de *P. expansum in vitro* y en frutos de manzana en postcosecha (*in vivo*).

alba on fungi has been studied in human medicine in *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Rao *et al.*, 2012), *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* and *P. oxalicum* (Omidiran *et al.*, 2012). However, little is known of the effect of the extracts of this plant species in the control of plant pathogenic fungi. Bibliography only reports studies on the control of *A. niger* (Rao *et al.*, 2012), *F. guttiforme*, *Charala paradoxa* (Cerqueira *et al.*, 2016), *F. oxysporum*, and *P. oxalycum* (Omidiran *et al.*, 2012). Understanding the effect of the mulberry extracts on the control of pathogenic fungi could constitute a sustainable alternative for the control of the blue mold in apples in postharvest, as well as on the field and in other crops.

The aim of this investigation was to evaluate the effect of mulberry (*M. alba*) leaves on the control of *P. expansum in vitro* and on apple fruits postharvest (*in vivo*).

MATERIALS AND METHODS

Investigation work was carried out in the year 2015, in the Francisco I. Madero Polytechnic University, specifically in the experimentation area, located at a latitude of 20.227044° and a longitude of -99.089386°, in the municipal area of Tepatepec, Hidalgo, Mexico.

Pathogen isolation and pathogenicity tests. The *P. expansum* fungus was isolated from apple fruits with typical blue mold symptoms gathered in the Central Market (central de abasto) of Mexico City. Fruit fragments (5 x 5 mm) with approximately 20 % symptomatic tissue and 80 % asymptomatic tissue were cultivated in Petri dished with Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at room temperature (26±2 °C) for 10 days. After incubation, a portion

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el año 2015, en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, específicamente en el área de experimentación ubicada en 20.227044° de latitud y -99.089386° de longitud, en el municipio de Tepatepec, Hidalgo, México.

Aislamiento del patógeno y pruebas de patogenicidad. El hongo *P. expansum* fue aislado de frutos de manzana con síntomas característicos de moho azul colectados en la central de abasto de la Ciudad de México. Fragmentos (5 x 5 mm) de frutos con aproximadamente 20 % de tejido sintomático y 80 % de tejido sano se sembraron en cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente (26±2 °C) durante 10 días. Después de la incubación, una porción de micelio se transfirió a otra caja de Petri con PDA para purificar las cepas. Una vez confirmada la identidad de *P. expansum* mediante las claves morfológicas de Seifer *et al.*, (2011), la cepa se sembró en medio de cultivo PDA, donde se desarrolló por un período de siete días a 28 °C en condiciones de oscuridad en una incubadora (Thermo scientific®). Al término del periodo de incubación, se preparó una suspensión de esporas (conidios) para inocular frutos de manzana sanos y para verificar la patogenicidad del aislamiento. La suspensión conidial se preparó raspando el micelio y los conidios, filtrando la suspensión, y ajustándola a una concentración de 1x10⁶ conidios mL⁻¹ mediante el uso de una cámara Neubauer. Frutos de manzana (*M. domestica*) variedad Golden Delicious fueron seleccionados de un comercio de frutas en el municipio de Actopan, Hidalgo, México. Todos los frutos seleccionados tuvieron más o menos el mismo tamaño y color y se encontraban libres de daños y signos de infección. Diez frutos se lavaron y desinfectaron con

of mycelium was transferred to another Petri dish with PDA to purify the strains. Once the identity of *P. expansum* was confirmed via the morphological keys by Seifer *et al.*, (2011), the strain was planted in a PDA culture, where it grew for 7 days at 28 °C in the dark in an incubator (Thermo scientific®). At the end of the incubation period, a suspension was prepared with spores (conidia) to inoculate healthy apple fruits and to verify the pathogenicity of the isolation. The conidial suspension was prepared by scraping the mycelium and the conidia, filtering the suspension, and adjusting it to a concentration of 1x10⁶ conidia mL⁻¹ using a Neubauer chamber. Apple (*M. domestica*) fruits of the variety Golden Delicious were selected in a fruit vending venue in Actopan, Hidalgo, Mexico. All fruits chosen were of approximately the same size and free of damage or signs of infections. Ten fruits were washed and disinfected with a 3 % v/v sodium hypochlorite solution, and two cuts, each 2 mm in diameter and 2 mm deep, were made using a sterilized dissection needle. Later, using a micropipette, 20 µL were deposited from the conidial suspension in the incision to reproduce the symptoms of the blue mold, in order to corroborate the pathogenicity of *P. expansum*. Distilled-sterilized water was added to five control fruits. Several Petri, dishes in which the fungus was cultivated, were kept for use in *in vitro* and *in vivo* experiments described in this study.

Plant material and preparation of extracts. The mulberry leaves used for the extracts were taken from plants grown in 2012 in the planting area of the Francisco I. Madero Polytechnic University. From the middle section of the canopy, healthy-looking and uniform leaves in color and size were selected and washed with distilled water to eliminate surface residues. One kilogram of leaves was weighed, and bit by bit, they were blended in a kitchen blender

una solución de hipoclorito de sodio al 3 % v/v, y se les realizaron dos heridas de 2 mm de diámetro y 2 mm de profundidad con una aguja de disección esterilizada. Posteriormente, usando una micropipeta, se depositaron 20 µL de la suspensión conidial en la herida para reproducir los síntomas del moho azul y así corroborar la patogenicidad de *P. expansum*. A cinco frutos testigo se les depositó agua destilada-esterilizada. Varias cajas Petri en las que cultivó el hongo, se mantuvieron para usarse en los experimentos *in vitro* e *in vivo* que se describen este estudio.

Material vegetal y preparación de los extractos.

Las hojas de morera usadas para los extractos se colectaron de plantas establecidas en el año 2012 en el área de cultivo de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. De la parte media del dosel de las plantas se seleccionaron hojas visualmente sanas y uniformes en color y tamaño, y una vez colectadas se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo en la superficie. Se pesó 1 kg de hojas, y en varias porciones se trituraron en una licuadora durante un minuto hasta que se observó savia. Las trituraciones obtenidas se mezclaron y distribuyeron por peso en cuatro frascos de vidrio ámbar de un litro para evitar la luz. En cada frasco se vertieron 600 mL de agua destilada cubriendo todas las hojas trituradas. La mezcla se dejó reposar durante 72 horas para arrastrar los metabolitos mediante la polaridad del agua. Pasado este tiempo se eliminaron los sólidos con papel filtro Whatman® grado 54 y se obtuvo una solución madre del extracto (se mezclaron los extractos obtenidos de los cuatro frascos) que se consideró como el extracto acuoso o extracto sin solvente. Después se procedió a separar las fases de dicha solución usando dos solventes diferentes: metanol y acetato de etilo. Para esto, en un matraz de separación de fases, se vertieron 100 mL del extracto acuoso y 100 mL de

for one minute until sap was observed. The product was mixed and distributed by weight in four one-liter amber glass jars to avoid the entrance of light. In each jar we poured 600 mL of distilled water, covering all the blended leaves. The mixture was left to settle for 72 hours to drag the metabolites with the polarity of water. After this time, solids were removed using degree 54 Whatman® filter paper, and a mother solution was obtained from the extract (the extracts obtained from the four jars were mixed), which was considered the aqueous extract or the extract without a solvent. Later, the phases of the solution were separated using two different solvents: methanol and ethyl acetate. To do this, 100 mL of aqueous extract and 100 mL of ethyl acetate or methanol (of a reactive degree, 99 % pure) were poured into a phase separation beaker. The solution was left to settle until we noticed the complete separation of both phases. Using the valve of the beaker, we discarded the bottom phase and kept the one which contained the solvent with the possible antimicrobial metabolites (Bresin *et al.*, 2015). The fractions obtained with each solvent (methanol and ethyl acetate) were concentrated in a vacuum rotary evaporator (Ika®) to obtain the extract free of the extraction solvents. The extracts were stored at a temperature of 4 °C until they were to be used for the experiments. Later, for simplicity and clarity of the extracts, they were labeled aqueous extract, extract obtained in methanol and extract obtained in ethyl acetate.

Control of *P. expansum* *in vitro*. This phase of the experiment tested 11 treatments in culture medium: PDA + aqueous extract, PDA + extract obtained in methanol, and PDA + extract obtained in ethyl acetate (each at concentrations of 4, 8 and 12 %), PDA + Imazalil 500 mg L⁻¹ as a chemical control, and PDA + distilled water as an absolute control. To prepare these solutions, in separate beakers

acetato de etilo o metanol (de grado reactivo, con una pureza del 99 %). La solución se dejó reposar hasta que se observó la separación completa de dos fases. Empleando la válvula del matraz se eliminó la fase inferior y se obtuvo aquella que contenía el solvente con los posibles metabolitos antimicrobiales (Bresin *et al.*, 2015). Las fracciones obtenidas con los respectivos solventes (metanol y acetato de etilo) fueron concentradas en un rotavapor a presión reducida (Ika®) para obtener el extracto libre de los solventes de extracción. Los extractos se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta que se requirieron para los experimentos. En lo sucesivo, por simplicidad y claridad los extractos se denominan extracto acuoso, extracto obtenido en metanol y extracto obtenido en acetato de etilo.

Control de *P. expansum* in vitro. En esta fase del experimento se probaron 11 tratamientos en medio de cultivo: PDA + extracto acuoso, PDA + extracto obtenido en metanol, y PDA + extracto obtenido en acetato de etilo (cada uno a concentraciones de 4, 8 y 12 %), PDA + Imazalil 500 mg L⁻¹ como testigo químico, y PDA + agua destilada como testigo absoluto. Para preparar estas soluciones, en matraces separados conteniendo la cantidad complementaria de PDA sin solidificar se vertieron las cantidades correspondientes de los extractos para obtener las concentraciones deseadas (en la concentración al 4 % se vaciaron 4 mL de la solución madre obtenida con cada solvente en 96 mL de medio de PDA para completar 100 mL, y así sucesivamente con las otras concentraciones). Cada solución se vació en cajas Petri debidamente etiquetadas y se dejó solidificar el medio. Después, en el centro de cada caja se transfirió un disco de micelio de *P. expansum* de 5 mm de diámetro, el cual se obtuvo de las cajas que se prepararon anteriormente en las pruebas de patogenicidad. Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente al azar con cinco

with the complementary amount of unsolidified PDA, we poured the corresponding amounts of the extracts to obtain the desired concentrations (in the 4 % concentration, we poured 4 mL of the mother solution obtained with each solvent in 96 mL of PDA medium to complete 100 mL, and so on with the other concentrations). Each solution was poured into a Petri dish, properly labelled, and the medium was left to solidify. Next, in the center of each dish, we placed a *P. expansum* mycelium disc, 5 mm in diameter, obtained from the dishes prepared earlier in the pathogenicity tests. The treatments were laid out in a totally random design with five repetitions. The Petri dishes were incubated at 28 °C (Thermo Scientific® Incubator) for eight days in the dark.

To determine the efficiency of each treatment in the control of *P. expansum*, the radial growth of the fungal colonies were measured every 24 horas, and the fungal sporulation (concentration of conidia in the culture medium) was evaluated after 10 días. Each Petri dish was rinsed with distilled-sterilized water, the surface was scraped with a glass rod and filtered through a sterilized cotton mesh. Aliquots of 0.5 mL were transferred from each dish to a Neubauer chamber and the conidia were counted. The complete experiment was repeated 48 hours after the first was concluded.

Control of *P. expansum* in vivo. We selected apple fruits of the variety Golden Delicious without damages or signs of infections (healthy looking) and similarly sized and colored to be artificially inoculated with *P. expansum*. The fruits were disinfected with a 2 % sodium hypochlorite solution for three minutes, rinsed with distilled water, and dried at room temperature using paper towels. At the same time, we prepared a suspension of *P. expansum* spores at a concentration of 1x10⁶ conidia mL⁻¹, as well as concentrations of 4, 8, and 12 % of the aqueous extract and the extracts

repeticiones. Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C (Incubadora Thermo Scientific®) durante ocho días, en oscuridad.

Para determinar la eficacia de cada tratamiento en el control de *P. expansum*, se midió el crecimiento radial de las colonias del hongo cada 24 horas, y se evaluó la esporulación del hongo (concentración de conidios en el medio de cultivo) a los 10 días. Cada caja Petri se enjuagó con agua destilada-esterilizada, la superficie se raspó con una varilla de vidrio y se filtró a través de una malla de algodón esterilizada. Alícuotas de 0.5 mL de cada caja fueron transferidas a una cámara de Neubauer y se contaron los conidios. El experimento completo se repitió una vez más a las 48 horas de haberse concluido el primero.

Control de *P. expansum* in vivo. Se seleccionaron frutos de manzana Var. Golden Delicious sin daño o signos de infección (aparentemente sanos) y de coloración y tamaño similar para inocularse artificialmente con *P. expansum*. Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante tres minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente sobre papel secante. De manera paralela se preparó una suspensión de esporas de *P. expansum* a concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} , así como concentraciones a 4, 8 y 12 % del extracto acuoso y de los extractos obtenidos en metanol y acetato de etilo en agua esterilizada, para lo cual se determinó la cantidad total por tratamiento de solución requerida para cubrir las manzanas, y basado en ello se calculó la cantidad de cada extracto que debería mezclarse con el agua esterilizada para asperjar. Al igual que en el experimento *in vitro*, se incluyó Imazalil 500 mg L^{-1} como testigo químico, y agua destilada como testigo absoluto. Las soluciones se asperjaron sobre los frutos desinfectados en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por

obtaind in methanol and ethyl acetate in sterilized water, and for this, the total amount was determined of solution required per treatment to cover the apples, and based on that, we calculated the amount of each extract to be mixed with the sterilized water and sprayed. As with the experiment *in vitro*, we included Imazalil 500 mg L^{-1} as a chemical control and distilled water as an absolute control. The solutions were sprayed on the disinfected fruits in a completely random design with five repetitions per treatment (five fruits, each with two artificial incisions). Twenty four hours after spraying, we inoculated the pathogen on the fruits. For this, and using a sterilized dissection needle, two 2 mm deep incisions were made on the fruit (just to ensure the symptom, since the fungus needs no incisions to penetrate) and on these incisions, we deposited 20 μL of the conidial suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) of the pathogen with a micropipette (20,000 spores). The fruits were placed in a wet chambers (sealed plastic containers) at 26 ± 2 °C, and after incubation, we calculated the diameter of the incision, measuring the radius of the incision every 24 h using a digital caliper. The entire experiment was redone 48 hours after concluding the first one. The effectiveness was calculated using the following formula:

$$\frac{\text{Values of the control} - \text{Values of the treatment}}{\text{Values of the control}} \times (100)$$

Color change in fruits. To determine if there were any effects of the extracts on the coloring of the fruits treated, photographs were taken on a daily basis of the fruits incubated in the wet chambers (sealed plastic containers) using a 12 megapixel Fujifilm® camera. The photographs were taken at a distance of 30 cm with lighting provided by

tratamiento (cinco frutos, cada uno con dos heridas artificiales). Veinticuatro horas después de la aspersión se procedió a inocular el patógeno sobre los frutos. Para ello, con una aguja de disección esterilizada se hicieron dos heridas de 2 mm de profundidad (solo para asegurar el síntoma, ya que el hongo no necesita de heridas para penetrar) y sobre dichas heridas se depositaron 20 µL de la suspensión conidial (1×10^6 conidios mL^{-1}) del patógeno con una micropipeta (20,000 esporas). Los frutos fueron colocados en cámara húmeda a temperatura de 26 ± 2 °C, y después de la incubación se calculó el diámetro de la lesión midiendo el radio de la herida cada 24 horas con un vernier digital. Todo el experimento se repitió 48 horas después de concluirse el primero. La efectividad fue calculada con la fórmula:

$$\frac{\text{Valor del testigo} - \text{Valor del tratamiento}}{\text{Valor del testigo}} \times (100)$$

Cambio de color en frutos. Para determinar si hubo algún efecto de los extractos en la coloración de los frutos tratados, se tomaron diariamente fotografías de los frutos incubados en la cámara húmeda usando una cámara marca Fujifilm® de 12 megapíxeles. Las fotografías se tomaron a una distancia de 30 cm con iluminación proporcionada por una lámpara fluorescente de 20 w. El ángulo entre la lente de la cámara y la fuente de la iluminación fue de aproximadamente 45°. La apertura del diafragma utilizada fue f/2.8 y la velocidad del obturador de 1/30 s. Estos parámetros se mantuvieron constantes durante la toma de todas las imágenes, y éstas se guardaron en formato JPEG. Las medias de los valores correspondientes a rojo, verde y azul

a 20 w fluorescent lamp. The angle between the lens of the camera and the source of lighting was of approximately 45°. The aperture used in the camera was f/2.8 and the shutter speed was 1/30 s. These parameters were kept constant during the capture of all the images, which were kept in a JPEG format. The averages of the values corresponding to red, green, and blue (RGB) which make up the real color of the apple fruit, were analyzed statistically using the programa Adobe® Photoshop® CS5 version 12.0.4. The values closest to the absolute control (without treating) correspond to the color demanded in markets for the species and the variety (Landeró *et al.*, 2013).

Statistical analysis. Using the data of the experiment *in vitro* (length of the mycelial growth), we calculated the Area Under the Curve (AUC) using the polygon method (Liengme, 2013). The AUC of each treatment underwent an analysis of variance. For the growth of the fungus with time, we obtained averages of each of the treatments for each of the days in which the evaluation was carried out, undergoing analyses of variance and Tukey multiple average separation tests. For the variable whose data were not normal, these were transformed using the square root $\sqrt{\cdot}$. Using the severity data (diameter of the incision) of the experiment *in vivo* we determined the AUC of the disease using the method described above. The results underwent analyses of variance and Tukey multiple average separation tests using the program SAS v.9 for Windows®. To evaluate color change in the fruits, the values of R, G, and B were evaluated separately, and they underwent analyses of variance and Tukey multiple average separation tests, using the program mentioned above.

(RVA) que conforman el color real del fruto de manzana, se analizaron estadísticamente mediante el programa Adobe® Photoshop® CS5 versión 12.0.4. Los valores más cercanos a los del testigo absoluto (sin tratar) corresponden a la coloración exigida en los mercados para la especie y variedad (Landeró *et al.*, 2013).

Análisis estadístico. Con los datos del experimento *in vitro* (longitud del crecimiento micelial) se calculó el área bajo la curva (ABC) usando el método de los polígonos (Liengme, 2013). El ABC de cada tratamiento se sometió a análisis de varianza. Para el crecimiento del hongo a través del tiempo, se obtuvieron medias de cada uno de los tratamientos por cada uno de los días en que se llevó a cabo la evaluación, sometándose a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey. Para la variable cuyos datos no fueron normales, éstos se transformaron con la raíz cuadrada $\sqrt{\cdot}$. Con los datos de severidad (diámetro de la lesión) del experimento *in vivo* se determinó el ABC de la enfermedad mediante el método antes descrito. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey mediante el programa SAS v.9 para Windows®. Para evaluar el cambio de color en los frutos, los valores de R, G y B fueron evaluados por separado, y sometidos a análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias de Tukey, empleando el programa mencionado previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de *P. expansum in vitro*. El crecimiento micelial del hongo en PDA varió significativamente ($P < 0.0001$) entre tratamientos, siendo significativamente menor en las cajas que contenían la fase metanólica al 4 y 12 %, así como la fase acuosa a

RESULTS AND DISCUSSION

Control of *P. expansum in vitro*. The mycelial growth of the fungus in PDA varied significantly ($P < 0.0001$) between treatments, and was significantly lower in the dishes that contained the methanolic phase at 4 and 12 %, as well as the aqueous phase at these same percentages. The greatest fungal growth rate was observed in the absolute control (Table 1). According to Chon *et al.* (2009), the greatest content of phenols was determined when methanol was used as a solvent to perform the extraction in mulberry leaves, which is important when considering phenols as secondary metabolites with antimicrobial properties (Wang *et al.*, 2012). However, this study obtained similar results in the tests which used methanol and water as solvents, therefore we can infer that another unknown metabolite or metabolites, different to phenols, could be responsible for the observed antimicrobial effect. In this regard, Ayoola *et al.* (2011) mention that when they used water and ethanol as solvents to obtain a crude *M. alba* leaf extract, the analysis indicated the presence of phenolic compounds and flavonoids, which have been reported as having antimicrobial activity, (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006). According to Ayoola *et al.* (2011), the crude extract inhibited the growth of the fungi *A. niger*, *A. tamari*, *F. oxysporum* and *P. oxalycum*. It is important to mention that for this variable the chemical control no showed control, making it similar to the absolute control.

When the comparison of averages was performed by the group of solvents used for the extraction, we also found a statistical difference between treatments ($P < 0.0001$); showing the least mycelial growth where these were prepared based on an aqueous extract, as well as when the extract was made with methanol (Table 1). The absolute

esos mismos porcentajes. El mayor crecimiento del hongo fue observado en el testigo absoluto (Cuadro 1). Según Chon *et al.* (2009), el mayor contenido de fenoles fue determinado cuando se empleó metanol como solvente para realizar el extracto en hojas de morera, lo cual es de importancia al considerar a los fenoles como metabolitos secundarios que

control was the only one that showed a difference with all the treatments, showing the greatest mycelial growth. Asli *et al.* (2014) reported that the extract obtained with methanol from *M. alba* leaves presented antimicrobial activity against *C. albicans* and *A. niger*, which confirms the results of this study.

Cuadro 1. Crecimiento micelial de *Penicillium expansum* *in vitro* bajo diferentes tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 1. Mycelial growth of *Penicillium expansum* *in vitro* under different treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias de ABC del C.M.	Tratamientos	Medias del ABC** del C.M. de acuerdo al solvente usado
TA	18.310 a*	TA	18.310 a*
TQ	12.870 ba	TQ	12.870 b
MET8 %	11.080 bc	AC	9.200 bc
AC4 %	9.9 bc	MET	7.819 c
AC8 %	8.4 bc	EXT	6.853 c
EXT4 %	7.9 bc	P	<0.0001
EXT 8 %	6.6 c	DMS	4.1102
MET 4 %	6.3 c		
EXT12 %	6.2 c		
MET 12 %	5.3 c		
P	<0.0001		
DMS	6.195		

*Letras iguales indican ausencia de diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$). **El área bajo la curva se presenta en valores adimensionales / *Same letters indicate and absence of a significant statistical difference (Tukey, $P \leq 0.05$). **The area under the curve is presented in adimensional values.

TA= control sin tratar, TQ= Testigo químico, MET8 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 8% en medio de cultivo PDA, AC4 %= Separación de fase empleando acetato de etilo, a una concentración de 4% en medio de cultivo PDA, AC8 %= Separación de fase empleando acetato de etilo, a una concentración de 8 % en medio de cultivo PDA, EXT4 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 4 % en medio de cultivo PDA, EXT8 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 8 % en medio de cultivo PDA, MET4 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 4 % en medio de cultivo PDA, EXT12 %= Extracto de *Morus alba* a una concentración de 12 % en medio de cultivo PDA, MET12 %= Separación de fase con metanol, a una concentración de 12 % en medio de cultivo PDA. C.M.=Crecimiento micelial. DMS=Diferencia mínima significativa / TA= untreated control, TQ= chemical control, MET8 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 8 % in a PDA culture medium, AC4 %= Phase separation using ethyl acetate, at a concentration of 4 % in PDA culture medium, AC8 %= Phase separation using ethyl acetate, at a concentration of 8 % in PDA culture medium, EXT4 %= *Morus alba* extract at a concentration of 4 % in PDA culture medium, EXT8 %= *Morus alba* extract at a concentration of 8 % in PDA culture medium, MET4 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 4 % in PDA culture medium, EXT12 %= *Morus alba* extract at a concentration of 12 % in PDA culture medium, MET12 %= Phase separation with methanol, at a concentration of 12 % in PDA culture medium. C.M.=Mycelial growth. DMS=Minimum significant difference.

poseen propiedades antimicrobiales (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente trabajo, se obtuvieron resultados similares en los ensayos en los que se empleó el metanol y el agua como solventes, por lo que se infiere que otro u otros metabolitos desconocidos diferentes a los fenoles podrían ser los responsables del efecto antimicrobial observado. Al respecto Ayoola *et al.* (2011) mencionan que cuando emplearon agua y etanol como solventes para obtener extracto crudo de hojas de *M. alba* el análisis mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, que han sido reportados con actividad antimicrobial (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006). De acuerdo a Ayoola *et al.* (2011), el extracto crudo inhibió el crecimiento de los hongos *A. niger*, *A. tamari*, *F. oxysporum* y *P. oxalycum*. Es de importancia mencionar que para esta variable el testigo químico no tuvo control alguno, siendo similar al testigo absoluto.

Cuando la comparación de medias se llevó a cabo por el grupo de solventes empleados para la extracción, también se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos ($P < 0.0001$); presentándose el menor desarrollo del micelio cuando éstos fueron preparados a base de extracto acuoso, así como cuando la extracción fue hecha con metanol (Cuadro 1). El testigo absoluto fue el único que mostró diferencia con todos los tratamientos, mostrando el mayor crecimiento micelial. Asli *et al.* (2014) reportaron que el extracto obtenido con metanol de hojas de *M. alba* exhibieron actividad antimicrobial en contra de *C. albicans* y *A. niger*; lo cual corrobora lo obtenido en el presente estudio.

Se puede observar que con los extractos acuosos y metanólicos se obtuvo la menor ABC (Cuadro 1), esto coincide con los tratamientos con los cuales se obtuvo el menor crecimiento micelial del patógeno. Omidirán *et al.* 2012, mencionan que al aplicar extractos acuosos de *M. alba* sobre hongos o bacterias, estos tuvieron un menor crecimiento

The use of aqueous and methanolic extracts evidently produced the lowest AUC (Table 1), which coincides with the treatments which produced the lowest mycelial growth in the pathogen. Omidirán *et al.* 2012, mention that when applying aqueous extracts of *M. alba* on fungi or bacteria, these had a lower growth rate than the applications with ethanolic extracts, which reinforces the results obtained in this investigation.

In the analysis of fungal development in time, it was observed that the increase in the intensity of the disease was homogenous. After the second evaluation, all the treatments showed significant statistical differences between them. The absolute control showed the highest values for mycelial growth in each of the readings taken (Figure 1). The treatments based on aqueous and methanolic extract remained as the ones that showed the least pathogen development in time; only during readings 3 and 5 were all treatments equal, with the exception of the absolute control, which displayed the highest values.

The treatments that showed the lowest number of conidia per mL were those for which the culture medium was mixed with a 4 % aqueous extract, ethyl acetate at 8 % and aqueous extract at 12 %, statistically equaling the chemical control (DMS=63.01; Table 2). This is relevant because spores are an effective dispersal and infection mechanism, and with the application of the treatments mentioned earlier, these are reduced. This may be due to the fact that methanol was the solvent with one of the best results, and used for the extraction of *M. alba* leaves, it presents an drag of phenolic compounds, which, as we mentioned earlier, have antimicrobial activity (Chon *et al.*, 2009). This is also confirmed with the mycelial inhibition of the pathogen when the same solvent was used. On the other hand, the greatest amount of conidia was observed in the absolute control. As for the favorable result with the application of the

que cuando se hicieron aplicaciones de extractos etanólicos, lo cual refuerza lo obtenido en el presente trabajo.

En el análisis del desarrollo del hongo a través del tiempo se observó que el incremento en intensidad de la enfermedad fue homogéneo. A partir de la segunda evaluación, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellas. El testigo absoluto mostró los mayores valores de crecimiento micelial en cada una de las lecturas tomadas (Figura 1). Los tratamientos a base de extracto acuoso y metanólico se mantuvieron como los que mostraron el menor desarrollo del patógeno a lo largo del tiempo, únicamente durante las lecturas tres y cinco todos los tratamientos fueron iguales, a excepción del testigo absoluto que presentó los mayores valores.

Los tratamientos en los que se observó el menor número de conidios por mL fueron aquellos para los cuales el medio de cultivo fue mezclado con extracto acuoso al 4%, acetato de etilo al 8% y extracto acuoso al 12%, igualando estadísticamente al testigo químico (DMS=63.01; Cuadro 2). Lo anterior es relevante, ya que las esporas son

aqueous extract, Cerqueira *et al.* (2016) found that the inhibition halos on *F. guttiforme* were observed precisely in the treatment based on aqueous extract of the *Bonetia stricta* leaf. Regarding this, we can mention that an extract is the complete mixture of the metabolites that plant leaves contain, and this condition may be what causes the lower mycelial growth or the lower number of spores in the pathogen; although the application of only one metabolite may be less effective, this is not the case in all extracts.

The sporulation of *P. expansum* was significantly different between the treatments with two solvents (ethyl acetate and methanol). However, sporulation was lower in both solvents than in the untreated control. Results indicate that the aqueous extract was statistically different to the absolute control, though no better than the extract obtained with methanol and with ethyl acetate (Table 2). In this case, the chemical control displayed the greatest effectiveness, with no spores presented.

Control of *P. expansum* in vivo. The results showed statistical differences between treatments

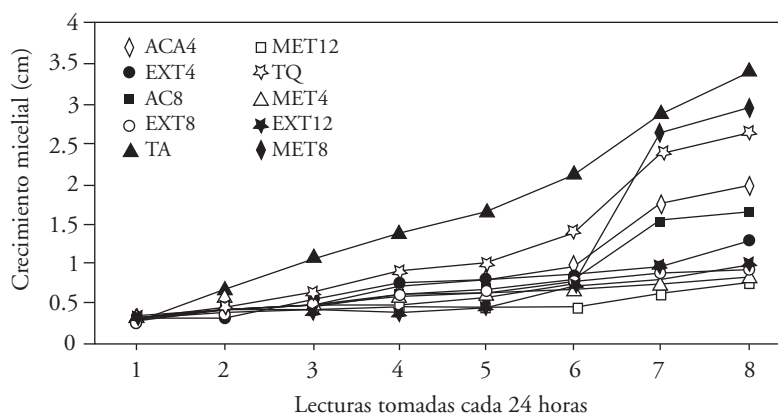


Figura 1. Crecimiento micelial por lectura de *Penicillium expansum* bajo diferentes concentraciones de extractos de *Morus alba* obtenidos con tres solventes. Cada línea con diferente color indica un tratamiento.

Figure 1. Mycelial growth by reading of *Penicillium expansum* under different concentrations of *Morus alba* extracts obtained with three solvents. Each line with a different color indicates a treatment.

Cuadro 2. Número medio de esporas de *Penicillium expansum* debido a diferentes tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 2. Average number of *Penicillium expansum* spores due to different treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias del número de esporas	Tratamientos	Medias del número de esporas de acuerdo al solvente usado
TA	137.7 a*	TA	137.7 a*
EXT8%	101.5 ba	EXT	55.3 b
MET8%	61.8 bc	MET	48.1 cb
MET4%	42.4 bc	AC	33.3 cb
MET12%	40.2 bc	TQ	0.0 c
AC4%	38.5 bc	P	<0.0001
EXT12%	36.88 c	DMS	54.3
AC8%	28.22 c		
EXT4%	27.44 c		
TQ	0.0 c		
P	0.001		
DMS	63.013		

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$). Datos fueron transformados a $\sqrt{}$, se muestran los valores reales para una mejor comprensión / *Same letters do not indicate significant difference (Tukey, $P \leq 0.05$). Data were converted to $\sqrt{}$, real values showed for a better comprehension.

un mecanismo de dispersión e infección efectivo, y con la aplicación de los tratamientos mencionados anteriormente, estas disminuyen. Lo anterior puede deberse a que el metanol que fue el solvente con uno de los mejores resultados y utilizado para la extracción de hojas de *M. alba* presenta un arrastre de compuestos fenólicos, los cuales ya se ha mencionado previamente tienen actividad antimicrobial (Chon *et al.*, 2009), esto se confirma también con la inhibición del crecimiento micelial del patógeno cuando se empleó el mismo solvente. Por otro lado, la mayor cantidad de conidios se observó en el testigo absoluto. En cuanto al favorable resultado con la aplicación del extracto acuoso, Cerqueira *et al.* (2016) encontraron que los mayores halos de inhibición sobre *F. guttiforme* se observaron precisamente con tratamiento a base de extracto acuoso de hoja de *Bonetia stricta*. Al respecto se puede mencionar que un extracto es la mezcla completa de

($P < 0.0001$). The treatment with the lowest area under the disease progression curve was the one which used 4 % aqueous extract (Table 3), surpassed only by the chemical control. The extract of the leaves from the species under study was tested against *A. niger* and *C. albicans*, revealing that all concentrations presented a notorious antimicrobial activity (Rao *et al.*, 2012). It is worth mentioning that *M. alba* has been widely studied in its phytochemical composition, as well as its effect on pathogenic human microorganisms (Cushnie and Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011 Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013). However, the information on its effect on microorganisms that cause losses in agriculture is precarious. This work documents information on the effect of leaf extracts on an economically important plant pathogen. Likewise, antibacterial activity has also been reported, due to Kuwanon G,

los metabolitos que poseen las hojas de la planta, pudiendo ser esta condición lo que logra el menor crecimiento micelial o menor número de esporas del patógeno; mientras que la aplicación de un solo metabolito es posible que sea menos efectiva, esto no aplica en todos los casos de extractos.

La esporulación de *P. expansum* fue significativamente diferente entre los tratamientos con dos solventes (acetato de etilo y metanol). Sin embargo, en ambos solventes la esporulación fue menor comparada con el testigo sin tratar. En lo que respecta al extracto acuoso, los resultados indican que fue estadísticamente diferente al testigo absoluto pero no mejor que el extracto obtenido con metanol y con acetato de etilo (Cuadro 2). En este caso el testigo químico mostró la mayor efectividad, sin presentarse esporas.

Control de *P. expansum* in vivo. Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.0001$). El tratamiento con la menor ABC del progreso de la enfermedad fue aquel donde se utilizó el extracto acuoso al 4 % (Cuadro 3), solo siendo superado por el testigo químico. El extracto de hojas de la especie en estudio fue probado en contra de *A. niger* y *C. albicans*, revelando que todas las concentraciones mostraron una notoria actividad antimicrobiana (Rao *et al.*, 2012). Cabe mencionar que *M. alba* ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su composición fitoquímica, así como su efecto sobre microorganismos humanos patógenos (Cushnie y Lamb, 2006; Soetan *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2011; Omidiran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013); sin embargo, la información acerca de su efecto en microorganismos que causan pérdidas en la agricultura es precaria. El presente trabajo documenta información sobre el efecto de extractos de hoja en un fitopatogeno de importancia económica. De igual manera, actividad antibacteriana también ha sido reportada, debida

a un compuesto aislado de *M. alba* raíces (Rao *et al.*, 2012).

On the other hand, the treatment with the highest area concerned the extract obtained with ethyl acetate at 12 %, which favored the development of the pathogen, while the rest of the treatments and the untreated control displayed a similar behavior amongst them, including the extract obtained with methanol, which, in mycelial growth and production of spores, was one of the treatments which produced the lowest growth values. Ethyl acetate is a solvent of medium polarity that extracts more compounds than methanol or other solvents. Among these are carbohydrates (Mumammad *et*

Cuadro 3. Severidad media causada por *Penicillium expansum* en frutos de manzana tratados con extractos de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Table 3. Average severity caused by *Penicillium expansum* in apple fruits with extracts of *Morus alba* leaves as aqueous, methanolic, and with ethyl acetate.

Tratamientos	Medias de severidad del ABCPE**
AC12	201.6 a*
AC8	185.2 ba
AC4	184.5 ba
EXT12	174.6 bac
MET12	170.2 bac
MET4	168.1 bac
EXT8	156.9 bac
TA	155.0 bac
MET8	120.2 bc
EXT4	92.6 c
TQ	38.6 d
P	<0.0001
DMS	46.173

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) / *Same letters do not indicate statistical significance (Tukey, $P \leq 0.05$).

**Los valores mostrados para ABCPE son adimensionales. ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad / **The values showed for ABCPE are adimensional. AUDPC= area under the disease progress curve.

a Kuwanon G, compuesto aislado de raíces de *M. alba* (Rao *et al.*, 2012).

Por otro lado, el tratamiento en el que se observó un área mayor fue el extracto obtenido con acetato de etilo al 12 %, que favoreció el desarrollo del patógeno, el resto de los tratamientos así como el testigo sin tratar mostraron un comportamiento similar entre ellos, incluyendo extracto obtenido con metanol que en crecimiento micelial y producción de esporas fue de los tratamientos donde se obtuvieron los menores valores de crecimiento. El acetato de etilo es un solvente de mediana polaridad que extrae más compuestos que el metanol u otros solventes. Dentro de ellos se encuentran los carbohidratos (Mumammad *et al.*, 2014) que sirven como fuente de alimento y crecimiento para microorganismos, tales como los hongos. El testigo químico mostró el menor desarrollo de la enfermedad (75.09 % de efectividad), seguido por el tratamiento en el cual se empleó extracto acuoso al 4 % para control de la enfermedad (40.26 % de efectividad), estos resultados concuerdan con lo obtenido por Omidiran *et al.* (2012), quien encontró que al aplicar extractos acuosos de *M. alba* sobre ciertos hongos y bacterias, estos se vieron inhibidos en su crecimiento.

El análisis de imágenes para evaluar el cambio de coloración en los frutos mostró que el tratamiento extracto obtenido con acetato de etilo al 8% causó decoloración de frutos comparado con testigo absoluto, el cual no indujo ningún cambio de color y tiene la coloración requerida por el mercado (Cuadro 4). El resto de los tratamientos se mostraron estadísticamente similar al testigo sin tratar, que indica que no se presentaron cambios en la coloración debida a los tratamientos. El cambio en la coloración en los frutos por el extracto obtenido con acetato de etilo al 8 % se explica por el uso de este solvente, que extrae compuestos diferentes que el metanol, como son antraquinonas, carbohidratos

al., 2014), which function as a source of food and growth for microorganisms, such as fungi. The chemical control appeared to have the lowest development of the disease (75.09% de efectividad), followed by the treatment in which aqueous extract at 4% was used for the control of the disease (40.26% effectiveness). These results coincide with those obtained by Omidiran *et al.* (2012), who found that applying aqueous extracts of *M. alba* on certain fungi and bacteria causes the inhibition of their growth.

Cuadro 4. *Penicillium expansum* y medias de RVA sobre frutos de manzana después de aplicar tratamientos a base de hojas de *Morus alba* como extracto acuoso, metanólico y con acetato de etilo.

Tabla 4. *Penicillium expansum* and RVA averages on apple fruits after applying treatments based on *Morus alba* leaves such as aqueous extract, methanolic, and ethyl acetate.

Tratamiento	Medias** para R ^x	Medias** para V ^x	Medias** para A ^x
TQ	157.7 a*	112.1 a	36.7 ba
MET12x %	154.7 ba	102.9 ba	37.3 ba
EXT4x %	154.5 ba	102.3 ba	40.0 a
MET4 %	152.6 ba	101.3 ba	36.3ba
EXT8 %	152.6 ba	99.9 ba	36.4 ba
EXT12 %	152.2 ba	93.6 ba	33.2 ba
TA	151.5 ba	99.2 ba	36.4 ba
AC4 %	146.6 ba	96.1 ba	35.6 ba
AC12 %	145.3 ba	96.5 ba	35.7ba
MET8 %	144.5 ba	99.8 ba	37.9 ba
AC8 %	137.5 b	87.3 b	29.9 b
P	0.02	0.01	0.03

*Letras iguales no indican diferencia estadística significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) / *Same letters do not indicate statistic significance (Tukey, $P \leq 0.05$).

**Medias para RVA son adimensionales. R=rojo, V=verde, A=azul / **Averages for RVA are adimensional. R=red, V=green, A=blue.

^x Los valores más cercanos a los obtenidos para el testigo absoluto corresponden a la coloración normalmente exigida en los mercados para la especie y variedad, mientras que los más alejados podrían indicar cambio de coloración normal del fruto / ^x The values nearest to those obtained for the absolute control correspond to the coloring normally required in markets for the species and variety, while those furthest could indicate a normal change in the coloring of the fruit.

y flavonoides (Mumammad *et al.*, 2014), posiblemente en cantidades mayores que otros solventes.

Lo anterior sugiere que si se usan extractos de hojas de morera para controlar el moho azul en frutos cosechados, no se recomienda el uso de acetato de etilo como solvente extractor, pues éste cambia la coloración del fruto y estimula el desarrollo del hongo (Cuadro 3). Los resultados demuestran que el uso de metanol o agua son menos influyentes en la coloración del fruto. Además, como se mencionó previamente, el metanol es el solvente con el cual se extrae la mayor cantidad de fenoles (Wang *et al.*, 2012) y es preferible por ser menos contaminante y costoso que otros solventes.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que los extractos de hojas de morera tienen potencial para usarse como una alternativa de control de *P. expansum* en frutos de manzana en postcosecha. En la extracción de los metabolitos antimicrobiales de esta planta, se recomienda usar metanol a 4% o 12% y no acetato de etilo, ya que éste último podría decolorar los frutos y estimular el desarrollo del hongo. Este trabajo motiva la realización de otros estudios sobre el efecto de extractos de *M. alba* en patógenos en otros cultivos de importancia económica. Es pertinente indicar que para un manejo más efectivo del moho azul, la aplicación del extracto de morera debe complementarse con otras medidas sostenibles de control, por ejemplo, con el manejo de las condiciones ambientales en atmósferas controladas. Otros solventes más efectivos para extraer metabolitos de *M. alba* y de menor riesgo de uso o toxicidad deben probarse para la extracción. El presente trabajo no consideró la determinación de la composición química de *M. alba* bajo las condiciones de clima, suelo y diversidad vegetal del

The analysis of images for the evaluation of the change in coloring of the fruits showed that the treatment with the extract obtained with ethyl acetate at 8% caused the decoloring of fruit in comparison with the absolute control, which did not induce any color change and has the color required by the market. The rest of the treatments proved to be statistically similar to the untreated control, indicating that there are no changes in the color due to treatments. The change in the coloring of the fruits due to the extract obtained with ethyl acetate at 8% is explained by the use of this solvent, which extracts different compounds to methanol, such as anthraquinones, carbohydrates, and flavonoids (Mumammad *et al.*, 2014), possibly in greater amounts than other solvents.

The above suggests that if mulberry leaf extracts are used to control blue mold in harvested fruits, the use of ethyl acetate is not recommended for use as an extraction solvent, since it changes the color of the fruit and stimulates fungal development (Table 3). The results show that the use of methanol or water are less influential on the coloring of the fruit. Also, as mentioned earlier, methanol is the solvent used to extract the most phenols (Wang *et al.*, 2012) and is preferred since it is less pollutant and costly than other solvents.

CONCLUSIONS

The results of this study suggest that the mulberry leaf extracts have the potential to be used as an alternative in the control of *P. expansum* in apple fruits in postharvest. In the extraction of the antimicrobial metabolites of this plant, we recommend using methanol at 4% or 12% and not ethyl acetate, since the latter could decolor the fruits and stimulate fungal development. This investigation motivates further studies on the

lugar de estudio. Esta parte de investigación sería de interés para futuros trabajos en control de hongos con productos orgánicos. La decoloración de los frutos que se observó por el efecto del acetato de etilo es un tema de investigación para conocer que compuestos o metabolitos son responsables de tal efecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente a la Dra. Julia María Domínguez Soto, quien labora en la UPFIM, por su apoyo y disposición con el material que se necesitó en los experimentos. Asimismo agradecemos a todas aquellas personas que contribuyeron directa o indirectamente en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Andallu B., Suryakantham V., Srikanthi B.L. and Reddy G.K. 2001. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clinica Chemical Acta* 314:47. Doi:10.1016/S0009-8981(01)00632-5
- Asli E. A., Avci E., Ozcelik B., Alp A. G. and Ali K. D. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities with GC/MS analysis of the *Morus alba* L. leaves. *Hittite Journal of Science and Engineering* 1:137-141. Doi: 10.17350/HJSE19030000006
- Ayoola O.A., Baiyewu R.A., Ekunola J.N., Olajire B.A., Egunjobi J.A., Ayeni E.O. and Ayodele O.O. 2011. Phyto-constituent screening and antimicrobial principles of leaf extracts of two variants of *Morus alba*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 19:2161-2165. Doi: 10.5897/AJPP11.590
- Baldi I., Filleul L., Mohammed-Brahim B., Fabrigoule C., Dartigues J.F., Schwall S. 2001. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: results from the French Phytoneer study. *Environmental Health Perspectives* 109:839-44. Doi: 10.1136/oem.2009.047811
- Bresin P., Piol M., Fabbro D., Mancini M.A., Casseta B. and Del Bianco C. 2015. Analysis of organo-chlorine pesticides residue in raw coffee with a modified "quick easy cheap effective rugged and safe" extraction/clean up procedure for reducing the impact of caffeine on the gas chromatography-mass spectrometry measurement. *Journal of Chromatography A*, 1376:167-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.016> 0021-9673
- Cerqueira S.M.D., Barcellos C.H., Bueno F.P.M., Aires V.J. and Dummer M.D. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6:26-31. Doi:10.1016/j.apjtb.2015.09.026.

effect of *M. alba* extracts in pathogens in other economically important crops. It is worth pointing out that for a more effective control of the blue mold, the application of mulberry extract must be complemented with other sustainable control measures, such as the control of weather conditions in controlled environments. Other more effective solvents for the extraction of *M. alba* metabolites and of a lower risk when using or toxicity must be tested for the extraction. This investigation did not consider the determination of the chemical composition of *M. alba* under the weather, soil and plant diversity conditions of the place of study. This part of the investigation would be of interest for future investigations in fungal control with organic products. The decoloring of fruits observed by the effect of the ethyl acetate is a topic of investigation to know what compounds or metabolites are responsible for this effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would especially like to thank Dra. Julia María Domínguez Soto, who works in the UPFIM, for her support and willingness with the material required for the experiments. Likewise, we would like to thank everyone who directly or indirectly contributed in the completion of this study.

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

- Chon S.U., Kim Y.M., Park Y.J., Heo B.G., Park Y.S. and Go-rinstein S. 2009. *European Food Research and Technology* 2:231-237. Doi:10.1007/s00217-009-1165-2
- Cushnie T.P. and Lamb A.J. 2006. Antimicrobial activity of flavonoid. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26:342-356. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012. FAOSTAT Production Database. [2016-07.21]. [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAOSTAT Production Database. [2016-3-15]. <http:// faostat.fao.org>
- Fukai T., Kaitou K. and Terada S. 2005. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methici-

- illin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 76:708-711. Doi:10.1016/j.fitote.2005.06.012
- He L., Chen T., and Labuza T. P. 2014. Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 148: 42-46. Doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.003
- Kim H. O., Park S. W., and Park H. D. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology* 21:105-110. Doi:10.1016/S0740-0020(03)00010-8
- Landerio V.N., Nieto A. D., Téliz O. D., Alatorre R. R. y Ortíz G. C. F. 2013. Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1:047-062. <https://doaj.org/article/14a83e0b1ce841a29a0d995d1af3bfe9>
- Liengme B. 2013. A Guide to Microsoft Excel 2013 for Scientists and Engineers. Elsevier Science and technology. 382 p.
- Mumammad A.M., Ismail M.A., Jaafar, K.M. and Garba M.M. 2014. Phytochemical screening and anticonvulsant studies of ethyl acetate fraction of *Globimetula braunii* on laboratory animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4:285-289 Doi:10.12980/APJTB.4.2014C925
- Oh J, Jo H., Cho A.R., Kim S.J. and Hn J. 2013 Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food control* 31:403-409. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.10.021
- Omidiran M. O., Baiyewu R. A., Ademola I. T., Fakorede O. C., Toyinbo E. O., Adewumi O. J. and Adekunle E. A. 2012. Phytochemical Analysis, Nutritional Composition and Antimicrobial Activities of White Mulberry (*Morus alba*). *Pakistan Journal of Nutrition* 11: 456-460. <http://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2012.456.460>
- Paranagama P. A., Abeysekera K. H. T., Abeywickrama K. and Nugaliyadd L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology* 37:86-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12803563>
- Park K. M., You J. S., Lee H.Y., Baek N.I. and Hwang J.K. 2003. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 84:181-185. Doi:10.1016/S0378-8741(02)00318-5
- Rao T. G., Baku K.S., Ujwal K. J., Sujana P., Veerabhadra R. A. and Sreedhar A. S. 2011. Anti-microbial principles of selected remedial plants from Southern India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1:298-305. Doi:10.1016/S2221-1691(11)60047-6
- Rao S.J.A., Ramesh C.K. and Mahmood R. 2012. Anthelmintic and antimicrobial activities in some species of mulberry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 4:335-338. <http://www.ijppsjournal.com/Vol-4Suppl5/4992.pdf>
- Saucedo P. S., Jasso C. D., Ventura S. J., Sáenz G. A., Rodríguez H. R. and Aguilar C. N. 2007. Effect of candelilla wax with natural antioxidants on the shelf life quality of fresh-cut fruits. *Journal of Food Quality* 30:823-836. Doi: 10.1111/j.1745-4557.2007.00165.x
- Saucedo P. S., Rojas M. R., Aguilera C. A. F., Sáenz G. A., Garza H. L. and Jasso C. D. 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International* 42:511-515. Doi:10.1016/j.foodres.2009.02.017
- Sauphanor B., Dirwimmer C., Boutin S., Chaussabel A.L., Dupont N., Fauriel J. 2009 Analyse comparative de différents systèmes en arboriculture fruitière. In: INRA, editor. Ecophyto R&D: vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires. Rapport d'Expertise Collective Inra, Tome IV.
- Seifert K., Morgan J. G., Gams W. and Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands. 997 p.
- Simon S., Brun L., Guinaudeau J., Sauphanor B. 2011. Pesticide use in current and innovative apple orchard Systems Agronomy. *Agronomy Sustainability Development* 31:541-55. Doi 10.1007/s13593-011-0003-7
- Singh G., Maurya S., Lampasona M.P. and Catalán A. N. C. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45:1650-1661. Doi:10.1016/j.fct.2007.02.031
- Sanzani S. M., Schena L., Girolamo A., Ippolito A., and Gonzalez C. L. 2010. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. *Postharvest Biology and Technology* 56:1-11. Doi:10.1016/j.postharvbio.2009.11.010
- Soetan K., Oyecunle M.A., Aiyelaagbe O.O. and Fafunso M.A. 2006. Evaluation of antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor*. *African Journal of Biotechnology* 23:2405-2407. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Ticha J., Hajslova J., Jech M., Honzicek J., Lacina O., Kohoutkova J. 2008. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. *Food Control* 19:247-56. Doi:10.1016/j.foodcont.2007.03.011
- U.S. Government Publishing Office (GPO). 2015. Part-180 Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. 2016-07-21 [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID%45370c30aabced019b313754fe0b0c682&node%40pt40.24.180&rgn%4div5#\\_top](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID%45370c30aabced019b313754fe0b0c682&node%40pt40.24.180&rgn%4div5#_top).
- Volk G.M.C., Chao T., Norelli J., Brown S.K., Fazio G., Peace C., McFerson J., Zhong G.-Y., Bretting P. 2015. The vulnerability of US apple (*Malus*) genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62:765-794. Doi:10.1007/s10722-014-0194-2
- Wang W., Zu Y., Fu Y. and Effert T. 2012. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Extracts from *Morus alba* L. Leaves, Stems and Fruits. *American Journal of Chinese Medicine* 40:349. Doi: <http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X12500279>
- Zhang C., Wang J., Zhang J., Hou C. and Wang G. 2011. Effects of  $\beta$ -aminobutyric acid on control of postharvest blue mold of apple fruit and its possible mechanisms of action. *Postharvest Biology and Technology* 61:145-151. Doi:10.1016/j.postharvbio.2011.02.008.

# *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley

## *Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* aisladas de canales de irrigación del Valle de Culiacán

Brando Álvarez-Rodríguez, Raymundo Saúl García-Estrada, José Benigno Valdez-Torres, Josefina León-Félix, Raúl Allende-Molar\*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. CIAD AC. Área de Horticultura. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez. Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110 Teléfono 6677605536; Sylvia Patricia Fernández-Pavía. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán. CP 58880. Teléfono (443) 2958323. (brando.alvarez@estudiantes.ciad.mx, rsgarcia@ciad.mx, jvaldez@ciad.mx, ljosefina@ciad.mx, rallende@ciad.mx, fpavia@umich.mx). \*Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 13 de junio 2016.

Aceptado: 27 de septiembre 2016.

Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB, León-Félix J, Allende-Molar R, Fernández-Pavía SP. 2017. *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* isolated from irrigation channels in the Culiacan Valley. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 20-39.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-1)

Primera publicación DOI: 22 de Octubre, 2016.

First DOI publication: October 22, 2016.

**Resumen.** En México, no existen reportes de la presencia de especies de *Phytophthora* en aguas superficiales, de ahí la importancia de determinarlas ya que representan un riesgo para la agricultura del país. En enero de 2015, se muestrearon 25 canales de irrigación en el Valle de Culiacán con el objetivo de identificar las especies de *Phytophthora* presentes. Los aislamientos fueron obtenidos con trampas que consistieron en hojas de azalea y frutos de pera.

**Abstract.** Up to date, there are no reports of the presence of *Phytophthora* species in surface water bodies in Mexico, which represents a risk for the local agriculture. During January 2015, 25 irrigation channels from Culiacan Valley were sampled for the isolation of *Phytophthora* spp. Isolates were obtained with rhododendron leaves and pear fruits baits. Twenty-nine isolates of *Phytophthora* were obtained and identified, by morphological characteristics together with rDNA sequences of internal transcribed spacers (ITS) and elongation factor 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ). Pathogenicity tests were performed on tomato and pepper leaves, since they are important crops in the region and they are irrigated with water from the sampled channels. Two *Phytophthora* species were identified: *P. hydropathica* and *P. drechsleri*. Isolates of *P. hydropathica* caused necrotic lesions on tomato and pepper leaves while isolates of *P. drechsleri* caused necrotic lesions only on tomato leaves.



Se obtuvieron 29 aislamientos de *Phytophthora*, los cuales fueron identificados con base en características morfológicas y en secuencias de ADNr de los espaciadores internos transcritos (ITS) y del factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ). Se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas de tomate y chile, debido a que son cultivos importantes en la región y son irrigados con agua de los canales muestreados. Se identificaron 2 especies: *P. hydropathica* y *P. drechsleri*. Los aislamientos de *P. hydropathica* ocasionaron lesiones necróticas en hojas de tomate y de chile; mientras que los aislamientos de *P. drechsleri* solamente causaron lesiones en hojas de tomate. De acuerdo con nuestro conocimiento, este es el primer reporte de *P. hydropathica* en México.

**Palabras clave:** agua de riego, oomicetes, cebo, detección, patogenicidad.

Las especies de *Phytophthora* tienen el potencial de causar enfermedades devastadoras en ecosistemas forestales y agrícolas (Erwin y Ribeiro, 1996), ya que tienen la capacidad de infectar un amplio rango de hospedantes, tal es el caso de *P. cinnamomi* que es capaz de causar daños en alrededor de 2000 especies de plantas (Hardham, 2005). Otro ejemplo es *Phytophthora sojae*, que afecta un rango de hospedantes muy amplio y causa pérdidas económicas de hasta 2 mil millones de dólares a nivel mundial (Tyler, 2007).

La presencia de oomicetes fitopatógenos en agua de irrigación ha sido ampliamente documentada (Hong y Moorman, 2005); específicamente, existen alrededor de 30 especies del género *Phytophthora* que han sido aisladas de cuerpos de agua superficial como ríos, canales de irrigación, aguas recicladas y reservorios (Hüberli *et al.*, 2013; Zappia *et al.*, 2014).

Las especies de *Phytophthora* requieren de ambientes acuáticos para desarrollar su ciclo de vida

To our knowledge, this is the first report of *P. hydropathica* in Mexico.

**Key words:** irrigation water, oomycetes, bait, detection, pathogenicity.

*Phytophthora* species have the potential of causing devastating diseases in forest and agricultural ecosystems (Erwin and Ribeiro, 1996), since they are able to infect a wide range of hosts. Such is the case of *P. cinnamomi*, which can damage approximately 2000 plant species (Hardham, 2005). Another example is *Phytophthora sojae*, which affects a wide range of hosts and causes economic losses of up to 2 billion dollars worldwide (Tyler, 2007).

The presence of plant pathogenic oomycetes in irrigation water has been widely documented (Hong and Moorman, 2005); specifically, there are around 30 species of the genus *Phytophthora*, which have been isolated from surface water bodies such as rivers, irrigation channels, recycled waters, and reservoirs (Hüberli *et al.*, 2013; Zappia *et al.*, 2014).

*Phytophthora* species require aquatic environments in order to develop their asexual life cycle and therefore spread quickly with the formation of sporangia and zoospores; for this reason, they have been regularly isolated from irrigation water channels, water reservoirs, and rivers (Sutton *et al.*, 2009; Ghimire *et al.*, 2009; Hulvey *et al.*, 2010; Bienapfl and Balci *et al.*, 2014). Examples of species reported with this dispersal mean include *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. citricola*, *P. gonapodyides*, and *P. cambivora*, isolated from irrigation waters in the state of Washington (Yamak *et al.*, 2002). Recently, one of the species with the greatest incidence in surface waters has been *P. hydropathica* (Brazee *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2011; Hulvey *et al.*, 2010). In most of these cases,

asexual y así dispersarse rápidamente mediante la formación de esporangios y zoosporas; por ello han sido aisladas con regularidad de canales de agua de irrigación, reservorios de agua y ríos (Sutton *et al.*, 2009; Ghimire *et al.*, 2009; Hulvey *et al.*, 2010; Bienapfl y Balci *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de especies reportadas con este medio de diseminación son: *P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. citricola*, *P. gonapodyides* y *P. cambivora*, aisladas de aguas de irrigación en el estado de Washington (Yamak *et al.*, 2002). Recientemente una de las especies con mayor incidencia en aguas superficiales es la especie *P. hydropathica* (Brazee *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2011; Hulvey *et al.*, 2010). En la mayoría de estos casos, la presencia de especies de *Phytophthora* en agua no se ha relacionado con la existencia de síntomas o daños en hospedantes vegetales terrestres (Resser *et al.*, 2011). En México se ha documentado la presencia de 17 especies de *Phytophthora* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2015); entre las más estudiadas se encuentran *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. infestans* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2013). La identificación de estas especies se ha efectuado a partir de aislamientos obtenidos de plantas enfermas, principalmente de hortalizas.

Históricamente, las especies de *Phytophthora* han sido identificadas mediante características morfológicas; sin embargo, la identificación es difícil incluso para los expertos, debido a las similitudes de las características entre algunas especies. Actualmente, los análisis moleculares basados en el estudio del ADN, se han utilizado para caracterizar poblaciones de *Phytophthora* en campos agrícolas y en ecosistemas naturales (Blair *et al.*, 2008; Grünwald *et al.*, 2011). Las regiones del genoma más utilizadas para estos estudios son: la región espaciadora interna transcrita (ITS) (Blair *et al.*, 2008) y algunos genes nucleares como el gen que codifica para el factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) y el gen de la  $\beta$ -tubulina (Kroon *et al.*, 2004).

the presence of *Phytophthora* species in water has not been related with the existence of symptoms or damages in terrestrial plant hosts (Resser *et al.*, 2011). In Mexico, the presence of 17 species of *Phytophthora* have been documented (Fernandez-Pavía *et al.*, 2015), the most studied of which include *P. capsici*, *P. cinnamomi*, and *P. infestans* (Fernandez-Pavía *et al.*, 2013). These species have been identified from isolations obtained from diseased plants, mainly vegetables.

Historically, *Phytophthora* species have been identified by their morphological characteristics; however, identification is difficult, even for experts, due to the similarities in characteristics between some species. Currently, molecular analyses based on DNA studies have been used to characterize populations of *Phytophthora* in agricultural fields and in natural ecosystems (Blair *et al.*, 2008; Grünwald *et al.*, 2011). The regions of the genome most used for these studies are the internal transcribed spacer (ITS) (Blair *et al.*, 2008) and some nuclear genes, such as the gene that codifies for the factor of elongation 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) and the  $\beta$ -tubulin gene (Kroon *et al.*, 2004).

The objectives of this study were to identify *Phytophthora* species from irrigation channels in the Culiacán Valley and to evaluate their pathogenicity in agriculturally important plant in the region.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolate collection

The *Phytophthora* spp. isolates were collected from 25 irrigation channels in District 010 of the Culiacán Valley in January 2015 (Table 1). The sampling sites were chosen at random; the traps used were organza bags closed with nylon thread in

Los objetivos de este estudio fueron identificar especies de *Phytophthora* en canales de irrigación del Valle de Culiacán, así como evaluar su patogenicidad en plantas de importancia hortícola en la región.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de aislados

Los aislamientos de *Phytophthora* spp. se obtuvieron de 25 canales de irrigación del distrito 010 en el Valle de Culiacán durante el mes de enero del 2015 (Cuadro 1). Los sitios de muestreo fueron seleccionados al azar; las trampas utilizadas fueron bolsas de organza cerradas con hilo de nylon en la parte superior, lo que además sirvió para atar las trampas a un punto determinado en la orilla del canal (Figura 1). Las bolsas contenían 1 fruto de pera y 3 hojas de azalea, ambos sin ninguna muestra de daño o enfermedad, y se colocaron 2 bolsas en cada sitio de muestreo. El material vegetal fue lavado con agua corriente y desinfectado con etanol al 70 % durante 30 s antes de ser colocado en las trampas. Las trampas permanecieron en la superficie de los canales de riego durante 48 h (Bush *et al.*, 2003). Posteriormente, las trampas se colectaron y se trasladaron al laboratorio. El aislamiento se realizó colocando pequeñas secciones de tejido vegetal infectado (Figura 2), en medio selectivo que contenía jugo V8 (200 mL/L), pimaricina 10 µg/L, ampicilina 200 µg/L, rifampicina 10 µg/L, pentacloronitrobenzenceno 25 µg/L e hymexazol 50 µg/L (V8-PARPH) (Jeffers, 1986). Las placas Petri se incubaron a temperatura ambiente (25±2 °C) durante 3 a 5 días. De las colonias en formación, se realizó la transferencia de puntas de hifas para la obtención de cultivos puros (Hajebrahimi y Banihashemi, 2011). Finalmente, los aislamientos se

the upper section, which also helped tie the traps to a particular point by the side of the channel (Figure 1). Bags contained 1 pear fruit and 3 azalea leaves, neither one showing any signs of diseases or damages, and 2 bags were placed in each sampling site. Plant material was washed using tap water and disinfected with ethanol at 70 % for 30 s before being placed in the traps. The traps remained in the surface of the irrigation channels for 48 h (Bush *et al.*, 2003). Afterwards, the traps were gathered and taken to the laboratory. The isolation was carried out by placing several sections of infected plant tissue (Figure 2) in a selective medium containing V8 juice (200 mL/L), natamycin 10 µg/L, ampicillin 200 µg/L, rifampicin 10 µg/L, pentachloronitrobenzene 25 µg/L, and hymexazol 50 µg/L (V8-PARPH) (Jeffers, 1986). The Petri dishes were incubated at room temperature (25±2 °C) for 3 to 5 days. The Hyphal tips from developing colonies were transferred to obtain pure cultures (Hajebrahimi and Banihashemi, 2011). Finally, the isolations were preserved placing 5-7 mycelium discs in active growth (5 mm diameter) in corn meal agar (CMA) in microfuge tubes with sterile distilled water, which were then stored at 15 °C (Martin *et al.*, 2012).

### Morphological characterization

Sporangia were produced by taking sections of approximately 10 mm<sup>2</sup> of cultures with 3 to 5-day growth in V8 medium; they were then placed in 90 mm Petri dishes and flooded with sterilized rainwater. The dishes were kept at room temperature (25±2 °C) for 24-48 h (Gallegly and Hong, 2008; Bienapfl and Balci, 2014). The sporangia were observed under a Carl Zeiss Axiostar Imager A2 light microscope with an integrated camera and measured using the software ZEN 2012 Blue edition (Carl Zeiss).

**Cuadro 1. Sitios de muestreo en canales de irrigación en el valle de Culiacán, especies identificadas y accesiones de las secuencias depositadas en NCBI .**

**Table 1. Sampling sites in irrigation channels in the Culiacán Valley, species identified and accessions of the sequences deposited in NCBI.**

| Sitio de muestreo | Coordenadas                     | Localidad          | Aislados | Especie                | No. Acceso en Genbank* |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|----------|------------------------|------------------------|
| 1                 | 24° 44' 53" N<br>107° 26' 43" O | Culiacán           | 1-1H2    | <i>P. drechsleri</i>   | KX298878               |
|                   |                                 |                    | 1-2H2    | <i>P. drechsleri</i>   | KX298879               |
| 2                 | 24° 55' 29" N<br>107° 32' 00" O | Limón de los Ramos | -        | -                      | -                      |
| 3                 | 24° 55' 15" N<br>107° 32' 46" O | Limón de los Ramos | 3-1F3    | <i>P. hydropathica</i> | KX298862               |
|                   |                                 |                    | 3-2F1    | <i>P. hydropathica</i> | KX298863               |
| 4                 | 24° 53' 45" N<br>107° 38' 34" O | Villa Ángel Flores | -        | -                      | -                      |
| 5                 | 24° 53' 45" N<br>107° 34' 07" O | Villa Ángel Flores | -        | -                      | -                      |
| 6                 | 24° 53' 04" N<br>107° 38' 34" O | Villa Ángel Flores | -        | -                      | -                      |
| 7                 | 24° 51' 39" N<br>107° 37' 23" O | Villa Ángel Flores | -        | -                      | -                      |
| 8                 | 24° 51' 03" N<br>107° 34' 58" O | Culiacancito       | -        | -                      | -                      |
| 9                 | 24° 49' 00" N<br>107° 32' 11" O | La Palma           | -        | -                      | -                      |
| 10                | 24° 48' 59" N<br>107° 32' 10" O | La Higuera         | -        | -                      | -                      |
| 11                | 24° 50' 20" N<br>107° 29' 42" O | La Higuera         | 11F2     | <i>P. drechsleri</i>   | KX298880               |
| 12                | 24° 46' 18" N<br>107° 30' 21" O | Aguaruto           | -        | -                      | -                      |
| 13                | 24° 46' 03" N<br>107° 38' 19" O | Navolato           | 13F2     | <i>P. hydropathica</i> | KX298864               |
| 14                | 24° 46' 54" N<br>107° 41' 60" O | Navolato           | -        | -                      | -                      |
| 15                | 24° 45' 18" N<br>107° 43' 45" O | Navolato           | 15-1F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298865               |
|                   |                                 |                    | 15-2F3   | <i>P. hydropathica</i> | KX298866               |
|                   |                                 |                    | 15-1F3   | <i>P. hydropathica</i> | KX298867               |
|                   |                                 |                    | 15-1F2   | <i>P. drechsleri</i>   | KX298881               |
| 16                | 24° 42' 00" N<br>107° 40' 22" O | La Pipima          | 16-1F2   | <i>P. hydropathica</i> | KX298868               |
|                   |                                 |                    | 16-1H2   | <i>P. hydropathica</i> | KX298869               |
|                   |                                 |                    | 16-2F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298870               |
|                   |                                 |                    | 16-1F3   | <i>P. drechsleri</i>   | KX298882               |
| 17                | 24° 39' 27" N<br>107° 39' 50" O | Sataya             | 17-2F2   | <i>P. hydropathica</i> | KX298871               |
|                   |                                 |                    | 17-1F1   | <i>P. drechsleri</i>   | KX298883               |
| 18                | 24° 40' 12" N<br>107° 35' 44" O | La Michoacana      | 18-1F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298872               |
|                   |                                 |                    | 18-2F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298873               |
| 19                | 24° 37' 03" N<br>107° 33' 27" O | Las Puentes        | 18-2F2   | <i>P. hydropathica</i> | ND                     |
|                   |                                 |                    | -        | -                      | -                      |
| 20                | 24° 34' 19" N<br>107° 33' 08" O | Las Puentes        | 20-1F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298874               |
|                   |                                 |                    | 20-2F1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298875               |
|                   |                                 |                    | 20-2F2   | <i>P. hydropathica</i> | ND                     |
|                   |                                 |                    | 20-2F3   | <i>P. hydropathica</i> | KX298876               |
|                   |                                 |                    | 20-2H1   | <i>P. hydropathica</i> | KX298877               |
| 21                | 24° 38' 57" N<br>107° 30' 28" O | Las Puentes        | -        | -                      | -                      |

## Continúa Cuadro 1.

| Sitio de muestreo | Coordenadas                     | Localidad      | Aislados | Especie              | No. Acceso en Genbank* |
|-------------------|---------------------------------|----------------|----------|----------------------|------------------------|
| 22                | 24° 40' 01" N<br>107° 26' 33" O | Campo Estrella | -        | -                    | -                      |
| 23                | 24° 40' 00" N<br>107° 26' 33" O | El Quemadito   | 23-1F1   | <i>P. drechsleri</i> | KX298884               |
|                   |                                 |                | 23-1F2   | <i>P. drechsleri</i> | KX298885               |
|                   |                                 |                | 23-2F1   | <i>P. drechsleri</i> | KX298886               |
|                   |                                 |                | 23-2F2   | <i>P. drechsleri</i> | KX298887               |
|                   |                                 |                | 23-2F4   | <i>P. drechsleri</i> | ND                     |
| 24                | 24° 43' 50" N<br>107° 27' 11" O | El Diez        | -        | -                    | -                      |
| 25                | 24° 43' 16" N<br>107° 27' 40" O | El Diez        | -        | -                    | -                      |

ND= No determinado / ND= Not determined

\*El número de acceso corresponde a las secuencias obtenidas con los iniciadores ELONGF1/ELONGR1 / The accession number corresponds to the sequences obtained with the primers ELONGF1/ELONGR1.

preservaron colocando 5-7 discos de micelio en crecimiento activo (5 mm de diámetro) en medio agar harina de maíz (CMA) en microviales con agua destilada estéril, éstos se almacenaron a 15 °C (Martin *et al.*, 2012).

### Caracterización morfológica

Se indujo la producción de esporangios tomando secciones de aproximadamente 10 mm<sup>2</sup> de co-

Structures such as hyphal swellings, antheridia, oogonia and oospores were observed in clarified V8 agar medium (V8 juice under 4000 rpm for 20 min) in cultures of approximately one month of age, incubated in the dark at 20 °C (Mitchell *et al.*, 1992; Bienapfl and Balci, 2014). To determine the maximum growth temperature, discs of 5 mm in diameter with active growth were placed in V8 medium and incubated at 30, 35, and 40 °C ± 1 °C. Mating type. The isolates were confronted with



Figura 1. Trampa con fruto de pera colocada en un canal de irrigación.  
Figure 1. Trap with pear fruit placed in an irrigation channel.



**Figura 2. Frutos de pera y hojas de azalea con lesiones de las cuales se realizó el aislamiento.**  
**Figure 2. Pear fruits and azalea leaves with lesions from which the isolation was performed.**

lonias con crecimiento de 3 a 5 días en medio V8; posteriormente, se colocaron en placas Petri de 90 mm y se inundaron con agua de lluvia esterilizada. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C) durante 24-48 h (Gallegly y Hong, 2008; Bienapfl y Balci, 2014). Los esporangios se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axiostar Imager A2 con cámara integrada y se midieron con el software ZEN 2012 Blue edition (Carl Zeiss).

Estructuras, tales como clamidosporas, hinchamientos hifales, anteridios, oogonios y oosporas se observaron en medio agar V8 clarificado (jugo V8 sometido a 4000 rpm durante 20 min) en cultivos de 1 mes de edad aproximadamente, incubados en oscuridad a 20 °C (Mitchell *et al.*, 1992; Bienapfl y Balci, 2014). Para determinar la temperatura máxima de crecimiento se colocaron discos de 5 mm de diámetro con crecimiento activo en medio V8 y se incubaron a 30, 35 y 40 °C $\pm 1$  °C.

Tipo de apareamiento. Los aislamientos se confrontaron con cepas de referencia de *P. nicotianae* de tipo de compatibilidad A1 y A2. Una sección de

*P. nicotianae* reference strains with compatibility types A1 and A2. A section of 5 mm of isolates A1 and A2 of *P. nicotianae* were transferred to a Petri dish with clarified V8 agar and a disc, 5 mm in diameter, of each of the isolates was placed on the opposite side of the dish. The cultures were incubated at 22 °C for approximately 3 weeks (Bienapfl and Balci, 2014). The morphological characteristics and the dimensions of the antheridia, oogonia, and oospores were recorded for the description of the species. The asexual and sexual structures were compared with a tabular key of *Phytophthora* species (Martin *et al.*, 2012).

### Molecular characterization

Approximately 3 mg of mycelia were used, which grew when placing V8 agar discs with active growth, 10 mm in diameter, of each of the isolates in a potato broth medium, and later left for shaking at 150 rpm. From the mycelium produced, the DNA extraction was carried out. For this, we used a digestion buffer (Tris/HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA,

5 mm de los aislados A1 y A2 de *P. nicotianae* se transfirieron a una placa Petri con agar V8 clarificado y un disco de 5 mm de diámetro de cada uno de los aislados se colocó en el lado opuesto de la placa. Los cultivos se incubaron a 22 °C durante 3 semanas aproximadamente (Bienapfl y Balci, 2014). Las características morfológicas y las dimensiones de los anteridios, los oogonios y las oosporas fueron registradas para la descripción de las especies. Las estructuras asexuales y sexuales fueron comparadas con una clave tabular de especies de *Phytophthora* (Martin *et al.*, 2012).

### Caracterización molecular

Se utilizaron aproximadamente 3 mg de micelio, el cual se desarrolló al colocar discos de agar V8 con crecimiento activo de 10 mm de diámetro de cada uno de los aislamientos en medio caldo de papa, y posteriormente colocado en agitación a 150 rpm. A partir del micelio producido, se realizó la extracción de ADN; para esto, se utilizó un amortiguador de digestión (Tris/HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; SDS, 0.5 %; Triton X-100, 0.5 %; Tween 20, 0.5 %) y 2 µL de proteinasa K (20 mg/mL), seguido de una serie de lavados con cloroformo-alcohol isoamílico (Zelaya-Molina *et al.*, 2011). Para la caracterización de los aislamientos, se utilizaron los iniciadores DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') (Bonants *et al.*, 1997) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) para amplificar la región que flanquea el ITS de un tamaño aproximado de 1300 pb y los iniciadores ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') y ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAGGATGACCATG-3') que amplifican un fragmento aproximado de 970 pb de la región central del gen que codifica para el factor de elongación 1- $\alpha$  en la cual no se incluyen intrones (Kroon *et al.*, 2004). La concentración final de la mezcla para la PCR, consistió de: amortiguador 1X, dNTPs 0.2 mM,

50 mM; SDS, 0.5 %; Triton X-100, 0.5 %; Tween 20, 0.5 %) and 2 µL of K proteinase (20 mg/mL), followed by a series of washings with chloroform-isoamylalcohol (Zelaya-Molina *et al.*, 2011). For the characterization of the isolates, the primers DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') (Bonants *et al.*, 1997), and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) were used to amplify the region beside the ITS of an approximate size of 1300 p band primers ELONGF1 (5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3') and ELONGR1 (5'-ACGGCTCGAG ATGACCATG-3') were used to amplify a fragment of approximately 970 pbof the central region of the gene that codifies for elongation factor 1- $\alpha$  in which introns are not included (Kroon *et al.*, 2004). The final concentration of the mixture for PCR consisted of 1X buffer, dNTPs 0.2 mM, each primer at 0.2 mM, 1 unit of polymerase DNA, for a final volume of 25 µL. Amplification conditions for primers DC6/ITS4 consisted of 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min, and for primers ELONF/ELONR, they consisted of 95 °C for 2 min followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min. The PCR products were observed in a 1 % agarose gel dyed with red gel (Biotium, USA) under 70 V for 90 min. Later, the PCR products were purified using the kit wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Both chains of the amplicon were sequenced in LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato. The sequences obtained were edited to obtain consensus sequences in the program Bioedit (version 7.2). The sequences of the isolations were compared with sequences of type isolates deposited in the *Phytophthora* specialized database ([www.phytophthoradb.org](http://www.phytophthoradb.org)) or in the NCBI to determine the percentage of similarity.

cada iniciador a 0.2 mM, 1 unidad de ADN polimerasa, para un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación para los iniciadores DC6/ITS4 consistieron en: 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C durante 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min y para los iniciadores ELONF/ELONR consistieron en 95 °C durante 2 min seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con gel red (Biotium, USA) sometidos a 70 V durante 90 min. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron mediante el kit wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Ambas cadenas del amplicón fueron secuenciadas en LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato. Las secuencias obtenidas se editaron para obtener secuencias consenso en el programa Bioedit (versión 7.2). Se compararon las secuencias de los aislamientos con secuencias de aislados tipo depositadas en la base de datos especializada de *Phytophthora* ([www.phytophthoradb.org](http://www.phytophthoradb.org)) o en NCBI para determinar el porcentaje de similitud.

### Evaluación de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en hojas de chile *Capsicum annum* (híbrido 5810 Syngenta) y tomate *Solanum lycopersicum* (variedad Horus). Las hojas de chile y folíolos de tomate completamente desarrollados se lavaron con agua corriente, se secaron y se desinfectaron con etanol al 70 % durante 30 s. Posteriormente, cuatro hojas de cada material, en las que previamente se realizaron heridas con una aguja de disección estéril, se inocularon artificialmente en la parte abaxial colocando un disco con crecimiento activo de las dos especies de *Phytophthora* (5 mm de diámetro)

### Evaluation of pathogenicity

The pathogenicity tests were carried out on *Capsicum annum* chili pepper leaves (hybrid 5810 Syngenta) and *Solanum lycopersicum* tomato (var. Horus). The completely developed chili leaves and tomato leaflets were washed with tap water, dried, and disinfected with ethanol at 70 % for 30 s. Afterwards, four leaves of each material, in which incisions were previously made with a sterile dissection needle, were inoculated artificially in the abaxial section, placing a disc (5 mm diameter) with active growth from both species of *Phytophthora*, seven days old in PDA medium. One leaf from each plant evaluated was used as a control, in which incisions were also made, and placed in a PDA culture medium disc. All leaves were placed in a wet chamber at room temperature (25±2 °C) for five days, during which the length of the necrotized area of the leaves was recorded on a daily basis (Orlikowski *et al.*, 2012).

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 29 isolates belonging to the genus *Phytophthora* were obtained from infection sites in pear fruits and azalea leaves. Out of the 25 sampling points, *Phytophthora* isolations were obtained from only 10 (Table 1). According to their morphological characteristics, isolates were classified into 2 groups: the first group of 18 isolates that produced sporangia with out papilla, of varying shapes, from oval or globular to obpyriforme with a size of 45.8-57.4 x 32.9-36.9 µm (Figure 3A), persistent, with both internal and external proliferations and long and simple sporangiophores; the isolates produced terminal chlamydospores (Figure 3D) and hyphal swellings of irregular shapes in chains and/or in groups (Figure 3C).



de siete días de edad en medio PDA. Una hoja de cada planta evaluada se utilizó como testigo, en la cual se realizaron heridas y sólo se colocó un disco de medio de cultivo PDA. Todas las hojas fueron colocadas en una cámara húmeda a temperatura ambiente ( $25\pm 2$  °C) durante cinco días, tiempo durante el cual se registró diariamente la longitud del área necrosada en la hoja (Orlikowski *et al.*, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 29 aislados pertenecientes al género *Phytophthora* se obtuvieron a partir de infecciones en pera y hojas de azalea. De los 25 puntos de muestreo se obtuvieron aislados de *Phytophthora* en sólo 10 sitios de muestreo (Cuadro 1). De acuerdo a sus características morfológicas, los aislamientos se clasificaron en 2 grupos: un primer grupo de 18 aislamientos que produjeron esporangios sin papila, de formas variadas desde ovoides, globosas hasta obpiriformes con tamaño de  $45.8\text{--}57.4 \times 32.9\text{--}36.9$   $\mu\text{m}$  (Figura 3A), persistentes, con proliferación tanto interna como externa y con esporangióforos largos y simples; los aislamientos produjeron clamidosporas terminales (Figura 3D) e hinchamientos hifales de formas irregulares en cadena y/o en grupos (Figura 3C).

Estos 18 aislamientos fueron heterotálicos y formaron oosporas pleróticas de  $24.9$   $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio y oogonios de  $27.6$   $\mu\text{m}$ , con anteridios anfiginos (Figura 3B). La reproducción sexual de los aislamientos ocurrió únicamente con el aislado de referencia *P. nicotianae* A2, lo cual indica que los aislamientos son de tipo de compatibilidad A1. La temperatura máxima de crecimiento de los aislamientos fue de  $40$  °C.

Estas características morfológicas concuerdan con las características de la especie *Phytophthora hydropathica* descrita en la clave propuesta por

These 18 isolates were heterotallic and formed plerotic oospores with an average diameter of  $24.9$   $\mu\text{m}$ , and oogonios of  $27.6$   $\mu\text{m}$ , with amphiginous anteridia (Figure 3B). The sexual reproduction of the isolates took place only in reference isolation *P. nicotianae* A2, indicating that the isolates belong to the compatibility type A1. The maximum growth temperature of the isolates was  $40$  °C.

These morphological characteristics coincide with those for the species *Phytophthora hydropathica* described in the key proposed by Martin *et al.* (2012), as well as the description by Hong *et al.* (2010). It is worth mentioning that these two descriptions of *P. hydropathica* mention that the species *Phytophthora parsiana* presents very similar morphological characteristics. Both researchers set them apart based on the maximum temperature growth, since *P. hydropathica* can grow in temperatures of up to  $40$  °C, whereas *P. parsiana* does not grow in temperatures above  $37$  °C. Also, Martin *et al.* (2012) mention that *P. parsiana* does not present chlamidospores, and *P. hydropathica* does.

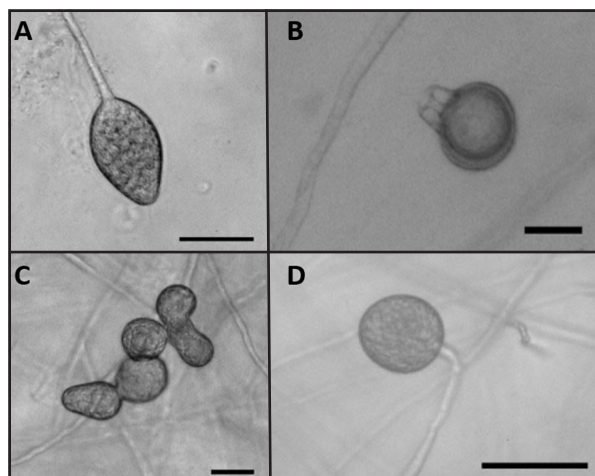
The 18 isolates with chlamidospores had a compatibility type A1 when confronted with A1 and A2 strains of *P. nicotianae*. This coincides with reports by Hong *et al.* (2010), who report the compatibility type A1 in *P. hydropathica*, therefore this species may not be reproducing sexually, and may survive by means of chlamidospores. According to the morphological characteristics observed, the 18 isolates with non-papillate sporangia belong to the species *Phytophthora hydropathica*.

The second group, composed of 11 isolates, share morphological characteristics that consist of a regular petaloid growth pattern in PDA culture medium, non-papillate sporangia with globular and oval shapes, mainly with conical bases and sizes of

Martin *et al.* (2012); así como con la descripción realizada por Hong *et al.* (2010). Cabe mencionar que en esas dos descripciones de *P. hydropathica* se menciona que la especie *Phytophthora parsiana* presenta características morfológicas muy similares. Ambos investigadores las diferencian en base a la temperatura máxima de crecimiento, ya que *P. hydropathica* es capaz de crecer hasta 40 °C, mientras que *P. parsiana* no crece en temperaturas superiores a 37 °C; además, Martin *et al.* (2012) mencionan que *P. parsiana* no presenta clamidosporas, mientras que *P. hydropathica* si las produce.

Los 18 aislamientos con clamidosporas fueron de tipo de compatibilidad A1 cuando se confrontaron con cepas A1 y A2 de *P. nicotianae*; esto coincide con lo reportado por Hong *et al.* (2010), quienes reportan el tipo de compatibilidad A1 en *P. hydropathica*, por lo que posiblemente esta especie no se está reproduciendo de manera sexual y sobreviva por medio de clamidosporas. De acuerdo con la morfología observada, los 18 aislamientos con esporangios sin papila pertenecen a la especie *Phytophthora hydropathica*.

El segundo grupo compuesto por 11 aislamientos comparten características morfológicas que consisten en un patrón petaloide regular de crecimiento en medio de cultivo PDA, esporangios no papilados con forma globosa y ovoide principalmente de base cónica con tamaños de 25.3-42.7 x 18.702-31.5 µm (Figura 4A), persistentes, con proliferación (Figura 4B) tanto interna como externa y con esporangióforos simples; este grupo de aislamientos produjeron hinchamientos hifales (Figura 4C) y no produjeron clamidosporas. Los aislamientos en este grupo fueron heterotálicos, de tipo de compatibilidad A1 formando oosporas pleróticas con un diámetro de 25.2 µm en promedio y anteridios de tamaño de 12.25 µm (Figura 4D). En Michoacán, México se han detectado los dos tipos de apareamiento en esta especie (Mora, 2013), por

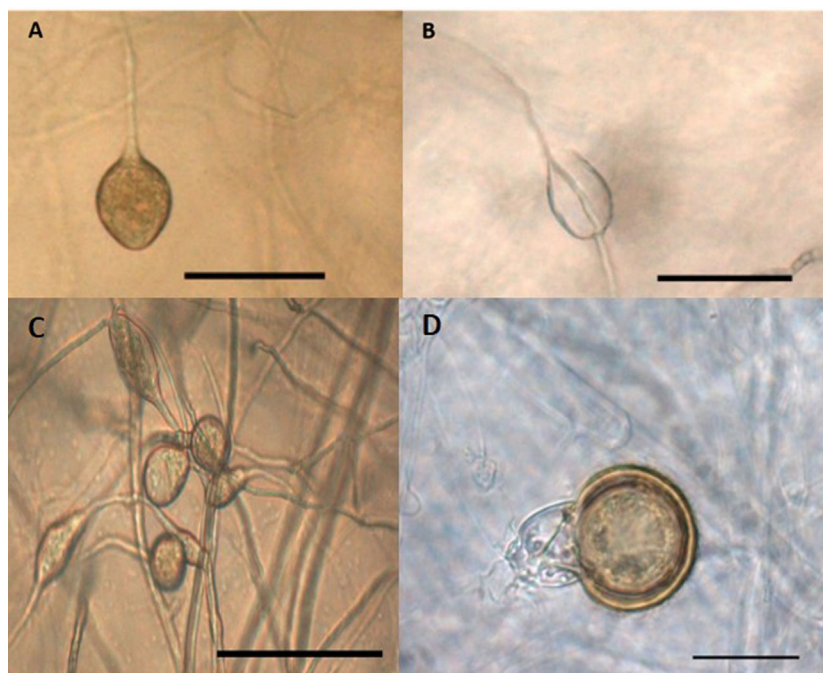


**Figura 3.** Estructuras morfológicas del aislado 3-1F3 de la especie *P. hydropathica*. (A) Esporangio no papilado, ovoide (B) Oospora plerótica con anteridio anfígin. (C) Hinchamientos hifales irregulares en grupo. (D) Clamidospora esférica y terminal. Barra=20 µm.

**Figure 3.** Morphological structure of isolate 3-1F3 of the species *P. hydropathica*. (A) Non-papillated sporangia, oval-shaped (B) Pleroticospore with amphigynous antheridium. (C) Irregular hyphal swellings in groups. (D) Spherical and terminal chlamyospore. Bar = 20 µm.

25.3-42.7 x 18.702-31.5 µm (Figure 4A), persistent, with internal and external proliferations (Figure 4B) and with simple sporangiophores; this group of isolates produced hyphal swellings (Figure 4C) and no chlamyospores. The isolates in this group were heterothallic, and their compatibility type was A1, forming pleroticospores with an average diameter of 25.2 µm and 12.25 µm antheridia (Figure 4D). In Michoacán, Mexico the two mating types of mating were found in this species (Mora, 2013), therefore it is likely that if a broader sampling were to be carried out, the type of compatibility A2 could be found. Another characteristic of this group of isolates is the maximum growth temperature, which fluctuates between 35 and 37 °C.

When comparing these characteristics with the taxonomical keys by Erwin and Ribeiro (1996),



**Figura 4.** Estructuras morfológicas del aislado 17-1F1 de la especie *P. drechsleri*. (A) Esporangio no papilado, ovoide y de base cónica. Barra = 50 µm. (B) proliferación extendida del esporangio. Barra = 50 µm. (C) hinchamientos hifales. Barra = 50 µm. (D) oospora plerótica con anteridio anfígeno. Barra = 20 µm.

**Figure 4.** Morphological structures of isolate 17-1F1 of the species *P. drechsleri*. (A) Non-papillated sporangia, oval-shaped and with a conical base. Bar = 50 µm. (B) extended proliferation of the sporangium. Bar = 50 µm. (C) hyphal swellings. Bar = 50 µm. (D) plerotic oospore with amphigynous antheridium. Bar = 20 µm.

lo que es probable que si se realiza un muestreo más extenso se encuentre el tipo de compatibilidad A2. Otra característica de este grupo de aislados es la temperatura máxima de crecimiento que fluctúa entre 35 a 37 °C.

Al comparar estas características con las claves taxonómicas de Erwin y Ribeiro (1996) y de Martin *et al.* (2012) éstas corresponden a la especie *Phytophthora drechsleri*. Es importante señalar que en ambas claves se menciona una estrecha relación de esta especie con *P. cryptogea*, aunque cabe destacar que también se mencionan algunas diferencias entre ambas especies, una de las principales es la temperatura máxima de crecimiento, para *P. cryptogea* existen reportes que indican que no puede crecer a temperaturas de 35 °C o mayores (Perlerou *et al.*, 2010; Kurtbetli, 2014) mientras que para *P. drechs-*

and Martin *et al.* (2012), they correspond to the species *Phytophthora drechsleri*. It is important to point out that both keys mention a relationship between this species and *P. cryptogea*, although there are also differences between species. One of the most important is the maximum growth temperature, since there are reports indicating that *P. cryptogea* can not grow in temperatures of 35 °C or above (Perlerou *et al.*, 2010; Kurtbetli, 2014), whereas reports for *P. drechsleri* indicate it can grow in temperatures of up to 37 °C. There are other differences between both, such as the size of oospores and antheridia: *P. drechsleri* produces oospores sized approximately 25.6 µm and the oospores from *P. cryptogea* are smaller, with sizes of around 22 µm. The antheridia comprise a similar case, in which *P. cryptogea* presents

*leri* existen reportes que puede crecer incluso hasta 37 °C. Existen otras diferencias entre ambas, tal es el caso del tamaño de las oosporas y de anteridios, *P. drechsleri* produce oosporas de aproximadamente 25.6 µm, mientras que las oosporas de *P. cryptogea* son más pequeñas con tamaños de alrededor de 22 µm. Caso similar ocurre con el tamaño de los anteridios, en donde *P. cryptogea* presenta anteridios más grandes, pudiendo estos alcanzar hasta 19 µm de longitud, mientras que los anteridios de *P. drechsleri* alcanzan tamaños máximos de 14 µm. De acuerdo a las características morfológicas y a las claves taxonómicas se puede inferir que el grupo de 11 aislamientos pertenecen a la especie *P. drechsleri*.

Las reacciones de PCR con los iniciadores DC6-ITS4 con los aislamientos que pertenecen a la especie *P. hydropathica* amplificaron un producto de aproximadamente 1300 pb (Dato no mostrado) y con los iniciadores ELONF-ELONR un producto de 960 pb aproximadamente (Figura 5). Las secuencias consenso mostraron entre 96-98 % de similitud con la especie *Phytophthora hydropathica* (código PD\_00342 ITS) en la base de datos especializados en *Phytophthora* (Phytophthoradb.org) para los iniciadores ITS y 99-100 % de similitud con la especie tipo de *P. hydropathica* reportada en NCBI para los dos tipos de iniciadores (EU583793 y GQ260061). Este análisis confirma que estos aislamientos pertenecen a la especie *Phytophthora hydropathica*.

*P. hydropathica* ha sido aislada con frecuencia de aguas superficiales (Bienafp y Balci, 2014; Vitale *et al.*, 2014; Copes *et al.*, 2015), principalmente en los meses más cálidos (Copes *et al.*, 2015) pudiendo soportar temperaturas de hasta 40 °C (Hong *et al.*, 2010). También ha sido aislada de plantas enfermas de andrómeda japonesa (*Pieris japonica*) (Bienalpf y Balci, 2014) en viveros y en agua utilizada en la irrigación de viveros (Hulvey *et al.*,

largeranthieridia, reaching up to 19 µm in length, while antheridia in *P. drechsleri* only reach 14 µm. According to the morphological characteristics and the taxonomic keys, we can infer that the group of 11 isolates belongs to the species *P. drechsleri*.

The PCR reactions with primers DC6-ITS4 with isolates belonging to the species *P. hydropathica* amplified a product of approximately 1300 pb (Data not shown) and with the primers ELONGF1-ELONGR1, a product of approximately 960 pb (Figure 5). The consensus sequences showed a similarity of 96-98 % with the species *Phytophthora hydropathica* (code PD 00342 ITS) in the database specialized in *Phytophthora* (Phytophthoradb.org) for primers ITS, and a similarity of 99-100 % with the species of the type *P. hydropathica* reported in NCBI for both types of primers (EU583793 and GQ260061). This analysis confirms that these isolations belong to the species *Phytophthora hydropathica*.

*P. hydropathica* has been frequently analyzed from superficial waters (Bienafp and Balci, 2014; Vitale *et al.*, 2014; Copes *et al.*, 2015), mainly in the hottest months (Copes *et al.*, 2015) tolerating temperatures up to 40 °C (Hong *et al.*, 2010). It has also been isolated from diseased Japanese andromeda (*Pieris japonica*) plants (Bienalpf y Balci, 2014) in greenhouses and water used in the irrigation of greenhouses (Hulvey *et al.*, 2010), and from ornamental *Viburnumtinus* plants with symptoms of shoot dieback (Vitale *et al.*, 2014).

In the *P. drechsleri* isolation, the reactions of PCR with primers DC6-ITS4 and ELONGF1-ELONGR1 amplified a product of approximately 1300pb (Data not shown) and 970 pb (Figure 5), respectively. The consensus sequences showed a homology of 97 % with isolates reported in the NCBI for the species *Phytophthora drechsleri* (GU111627 and AY659550), thus confirming the identity of these isolates. *P. drechsleri* has been

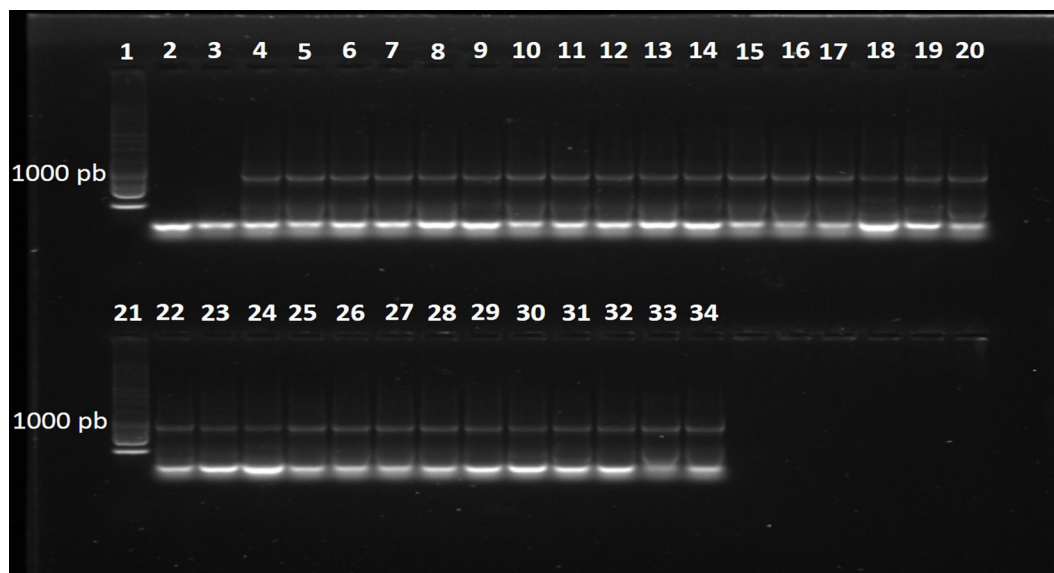
2010), y en plantas ornamentales de *Viburnum tinus* con síntomas de muerte regresiva (Vitale *et al.*, 2014).

En los aislamientos de la especie *P. drechsleri*, las reacciones de PCR con los iniciadores DC6-ITS4 y ELONGF1-ELONGR1 amplificaron un producto de aproximadamente 1300 pb (Dato no mostrado) y 970 pb (Figura 5), respectivamente. Las secuencias consenso mostraron una homología de 97 % con respecto a los aislamientos reportados en el NCBI para la especie *Phytophthora drechsleri* (GU111627 y AY659550) confirmándose así la identidad de estos aislamientos. *P. drechsleri* se ha encontrado en agua de irrigación a diferentes profundidades; por ejemplo, Bush *et al.* (2003) encontró a esta especie en la superficie del agua de irrigación y a profundidades de 1 y de 1.5 m.

found in irrigation water at different depths. For example, Bush *et al.* (2003) found this species on the surface of irrigation water and at depths of 1 and 1.5 m.

Two species of *Phytophthora* were isolated from the surface of 10 irrigation channels in the Culiacán Valley. In the channels where *Phytophthora* was found, *P. hydropathica* was found in only 40 %, in 30 % only *P. drechsleri*, and in 30 %, both species (Figure 6). *P. hydropathica* is considered a native species to river ecosystems (Hong *et al.*, 2010), therefore it is very common to find, in this type of studies, a high frequency of isolates of this species (Bienapfl and Balci, 2014; Brazee *et al.* 2016).

The sequences obtained with primers ELONGF1-ELONGR1 that correspond to the sequences of the gene that codifies for elongation



**Figura 5.** Fragmento de ADN amplificado con los iniciadores ELONGF1/ELONGR1 en aislamientos obtenidos de agua de irrigación. Línea 1, marcador molecular de 1 Kb; Línea 2, agua; Línea 3, control negativo (*C. gloeosporioides*); Línea 4, control positivo (*P. capsici*); Líneas 5-15, aislamientos de la especie *P. drechsleri*; Líneas 16-20, aislamientos de la especie *P. hydropathica*; Línea 21, marcador molecular de 1 Kb; Líneas 22-34, aislamientos de la especie *P. hydropathica*.

**Figure 5.** Fragment of DNA amplified with primers ELONGF1/ELONGR1 in isolates obtained from irrigation water. Line 1, 1 Kb molecular marker; Line2, water; Line3, negative control (*C. gloeosporioides*); Line4, positive control (*P. capsici*); Lines5-15, isolates of the species *P. drechsleri*; Lines16-20, isolates of the species *P. hydropathica*; Line21, 1 Kb molecular marker; Lines22-34, isolates of the species *P. hydropathica*.

Dos especies de *Phytophthora* se aislaron de la superficie de 10 canales de irrigación del Valle de Culiacán; en el 40 % de los canales en donde se detectó la presencia de *Phytophthora* se encontró únicamente *P. hydropathica*, en el 30 % solamente *P. drechsleri* y en el 30 % ambas especies (Figura 6). *P. hydropathica* es considerada una especie nativa de ecosistemas fluviales (Hong *et al.*, 2010) por lo que es muy común en este tipo de estudios encontrar una alta frecuencia de aislamientos de esta especie (Bienapfl y Balci, 2014; Brazee *et al.* 2016).

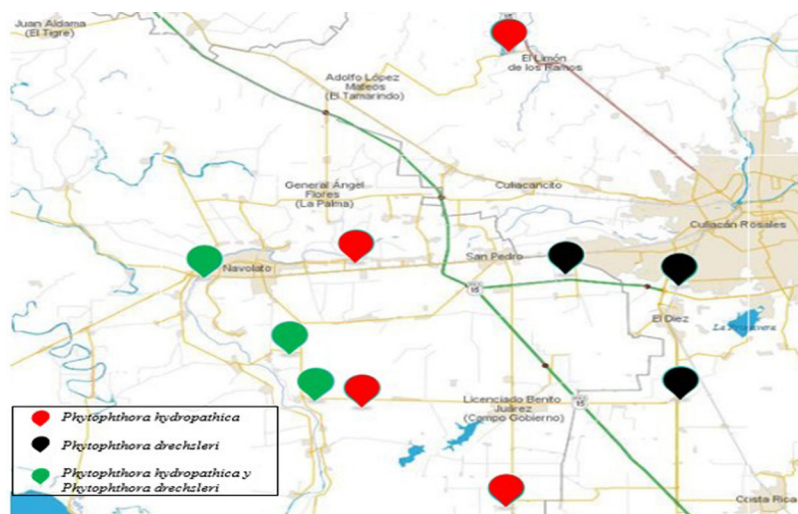
Las secuencias obtenidas con los iniciadores ELONGF1-ELONGR1 que corresponden a las secuencias del gen que codifica para el factor de elongación 1- $\alpha$  de ambas especies se depositaron en la base datos del NCBI (Cuadro 1).

En las pruebas de patogenicidad, los aislamientos representativos 13F2, 15-1F1, 3-2F1, 18-2F1, 16-2F1, 20-2F1, 15-2F3, 3-1F3, 16-1F2 y 16-1H2 de *P. hydropathica* causaron síntomas visibles de necrosis a las 48 h después de la inoculación en folíolos de tomate y en hojas de chile (Cuadro 2; Figura 7) en contraste con las hojas utilizadas como testigo, en donde no se observaron síntomas. Los

factor 1- $\alpha$  in both species were deposited in the NCBI database (Table 1).

In the pathogenicity tests, representative *P. hydropathica* isolates 13F2, 15-1F1, 3-2F1, 18-2F1, 16-2F1, 20-2F1, 15-2F3, 3-1F3, 16-1F2, and 16-1H2 caused visible necrosis symptoms 48 h after inoculation in tomato leaflets and chilli pepper leaves (Table 2; Figure 7), as opposed to the leaves used as a control, where there were no symptoms present. The isolations were more aggressive on chilli leaves, causing necrosis on the entire leaf (45 mm), 120 h after inoculation, while in tomato leaves, the largest lesion measured 26 mm (Table 2). Hong *et al.* (2010) mention chilli pepper, tomato, and cucumber plants as possible hosts, which was confirmed in this study for chilli and tomato. These studies show that *P. hydropathica* is a threat for tomato and chilli crops, which are extremely important in this region. Similar studies (Bienapfl and Balci, 2014; Brazee *et al.*, 2016), mention that although *P. hydropathica* rarely has been found to have a relation to plant diseases, it does have the potential to cause diseases.

Isolates 16-1F3, 1-2H2, 17-1F1, 15-1F2, 23-1F1,



**Figura 6.** Distribución de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en canales de irrigación del Valle de Culiacán.  
**Figure 6.** Distribution of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in irrigation channels in the Culiacán Valley.

aislados fueron más agresivos en hojas de chile, causando necrosis en toda la hoja (45 mm) 120 h después de la inoculación, mientras que en hojas de tomate la lesión mayor fue de 26 mm (Cuadro 2). Hong *et al.* (2010) mencionan como posibles hospedantes a chile, tomate y pepino; lo cual se confirmó en este estudio para los dos primeros, estos resultados muestran que *P. hydropathica* representa un riesgo para los cultivos de tomate y chile, que son de gran importancia en esta región. En estudios similares (Bienapfl y Balci, 2014; Brazee *et al.*, 2016) se menciona que aunque *P. hydropathica* raramente se ha encontrado asociada a enfermedades en plantas, si posee el potencial para causar enfermedades.

Los aislados 16-1F3, 1-2H2, 17-1F1, 15-1F2, 23-1F1, 1-1H2, 11F2, 23-2F1, 23-1F3, 23-2F4 y 23-2F2 de la especie *P. drechsleri* solo infectaron foliolos de tomate (Cuadro 2; Figura 8), en los cuales se presentaron síntomas de necrosis, aproximadamente 48 h después de la inoculación. Las lesiones en foliolos de tomate fueron de hasta 45 mm después de 120 h, mientras que las hojas de chile no presentaron síntomas aparentes; esto puede deberse a que el híbrido utilizado para el bioensayo posiblemente presente tolerancia a los aislados utilizados. Erwin y Ribeiro (1996) mencionan que *P. drechsleri* se ha reportado como agente causal de pudriciones en frutos de tomate y chile. En México, *P. drechsleri* ha sido reportada infectando cártamo, chile ají, gerbera, lechuga, nochebuena y tomate (Mills *et al.*, 1991; Romero-Cova y Solis-Aragon, 1996; Fernandez-Pavía *et al.*, 2013).

Este primer estudio en México en los canales de riego del valle de Culiacán demuestra la presencia de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* y resalta la importancia del agua de riego como medio de diseminación de ambos patógenos. Al mismo tiempo, sienta las bases para la realización de futuros estudios como conocer la dinámica poblacional a lo

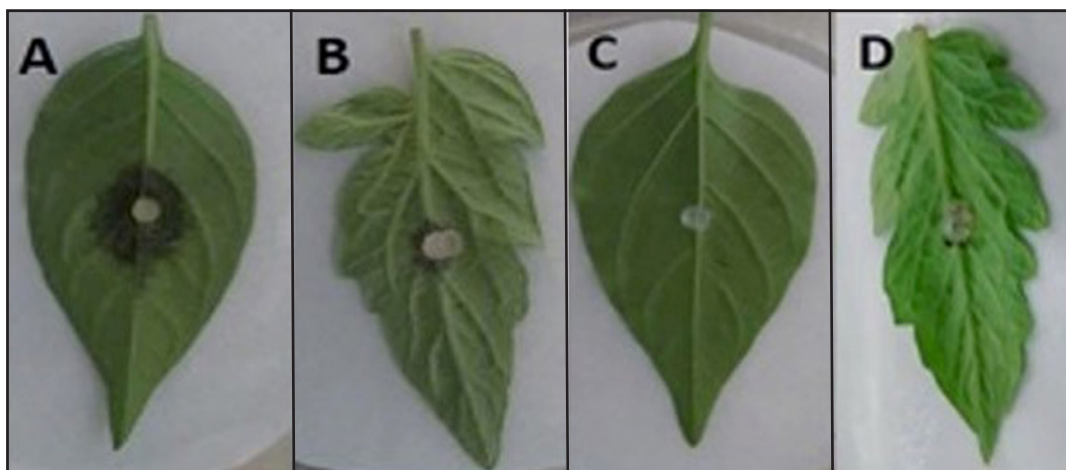
**Cuadro 2.** Longitud de la lesión ocasionada por *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en hojas de chile y foliolos de tomate.

**Table 2.** Length of the lesion caused by *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in chili pepper leaves and tomato leaflets.

| Aislado | Especie                | Longitud de la lesión (mm)<br>120 hdi |                   |
|---------|------------------------|---------------------------------------|-------------------|
|         |                        | Hoja de chile                         | Foliolo de tomate |
| 13F2    | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 24                |
| 15-1F1  | <i>P. hydropathica</i> | 35                                    | 23                |
| 3-2F1   | <i>P. hydropathica</i> | 33                                    | 20                |
| 18-2F1  | <i>P. hydropathica</i> | 35                                    | 17                |
| 16-2F1  | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 26                |
| 20-2F1  | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 20                |
| 15-2F3  | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 15                |
| 3-1F3   | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 18                |
| 16-1F2  | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 20                |
| 16-1H2  | <i>P. hydropathica</i> | 45                                    | 15                |
| 16-1F3  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 30                |
| 1-2H2   | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 45                |
| 17-1F1  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 25                |
| 15-1F2  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 15                |
| 23-1F1  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 15                |
| 1-1H2   | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 15                |
| 11F2    | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 25                |
| 23-2F1  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 15                |
| 23-1F3  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 35                |
| 23-2F4  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 30                |
| 23-2F2  | <i>P. drechsleri</i>   | -                                     | 15                |

hdi= horas después de inoculación; 45 mm= hoja completa / hdi= hours after inoculation; 45 mm= complete leaf.

1-1H2, 11F2, 23-2F1, 23-1F3, 23-2F4 y 23-2F2 of the species *P. drechsleri* only infected tomato leaflets (Table 2; Figure 8), in which symptoms of necrosis were observed approximately 48 h after inoculation. Lesions in tomato leaflets measured up to 45 mm after 120 h, while chili leaves showed no apparent symptoms, possibly due to the hybrid used for the bioassay may be tolerant to the isolates used. Erwin and Ribeiro (1996) mention that *P. drechsleri* has been reported as the causal agent of fruit rot in tomato and chili. In Mexico, *P. drechsleri* has been reported to infects a flower, chili pepper,



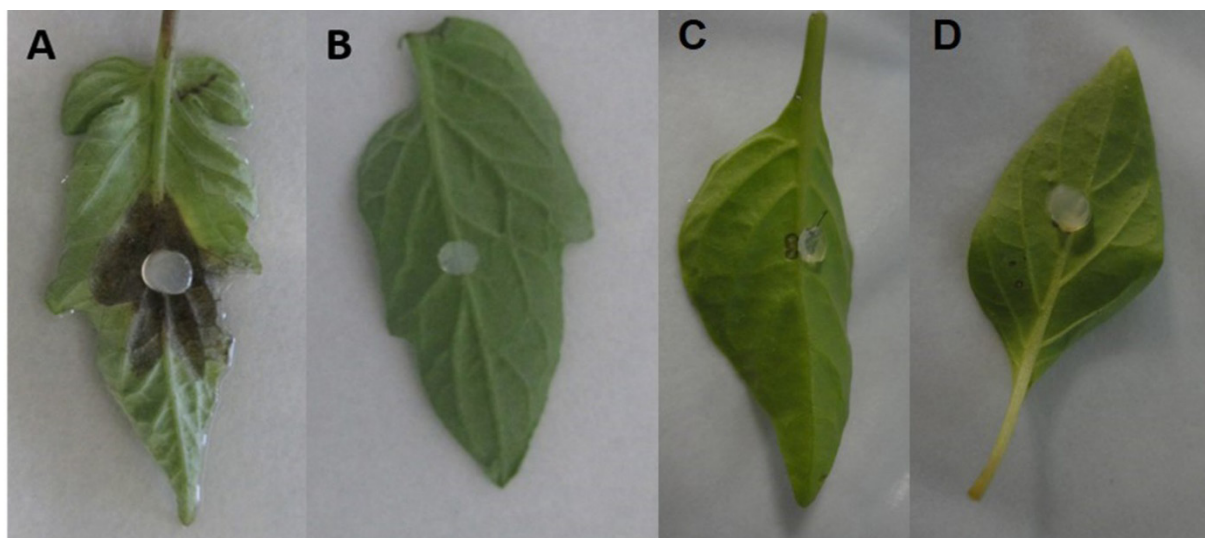
**Figura 7.** Patogenicidad de *P. hydropathica* 3-1F3 en hojas de chile y folíolos de tomate 48 h después de la inoculación. (A) Hoja de chile inoculada. (B) Folíolo de tomate inoculado. (C) y (D) Hoja de chile y folíolo de tomate testigos.

**Figure 7.** Pathogenicity of *P. hydropathica* 3-1F3 in chili pepper leaves and tomato leaflets 48 h after inoculation. (A) Inoculated chili leaf. (B) Inoculated tomato leaflet. (C) and (D) Control chili leaf and tomato leaflet.

largo del ciclo agrícola; determinar si estas especies solo utilizan los canales de riego como medio de diseminación o completan su ciclo de vida en estos cuerpos de agua; así como determinar la presencia de *P. hydropathica* y *P. drechsleri* en infecciones

gerbera, lettuce, poinsettia, and tomato (Mills *et al.*, 1991; Romero-Cova and Solis-Aragon, 1996; Fernandez-Pavía *et al.*, 2013).

This first study in Mexico in the irrigation channels in the Culiacán Valley shows the presence



**Figura 8.** Patogenicidad de *P. drechsleri* 1-2H2 en folíolos de tomate 48 h después de la inoculación. (A) Folíolo de tomate inoculado. (B) Folíolo de tomate testigo. (C) hoja de chile inoculada. (D) hoja de chile testigo.

**Figure 8.** Pathogenicity of *P. drechsleri* 1-2H2 in tomato leaflets 48 h after inoculation. (A) Inoculated tomato leaflet. (B) Control tomato leaflet. (C) Inoculated chili leaf. (D) Control chili leaf.



naturales en plantas de importancia hortícola en la región. Este es el primer reporte de *Phytophthora hydropathica* en canales de riego en México. Estos resultados indican que es necesario continuar con investigaciones en ambientes naturales, ya sea en aguas superficiales o en suelos para conocer las diversas especies de *Phytophthora* presentes en México y de este modo considerar el riesgo potencial que estos microorganismos representan para la agricultura del país.

## CONCLUSIONES

En este estudio se detectó la presencia de *Phytophthora hydropathica* y *Phytophthora drechsleri* en los canales de irrigación del Valle de Culiacán. Estas especies mostraron patogenicidad diferencial en hojas de chile y en foliolos de tomate.

## AGRADECIMIENTOS

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

## LITERATURA CITADA

- Bienapfl JC and Balci Y. 2014. Movement of *Phytophthora* spp. in Maryland's trade. Plant Disease 98:134-144. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0662-RE>
- Blair JE, Coffey M, Park S, Geiser DM and Kang S. 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/10.1016/j.fgb.2007.10.010>
- Bonants P, Hagenaar de Weerd M, van Gent-Pelzer M, Lacourt, Cooke D and Duncan M. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103:345-355. Disponible en línea: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008640227432>
- Brazeel NJ, Wick RL and Hulvey JP. 2016. *Phytophthora* species recovered from the Connecticut River Valley in Massachusetts, USA. Mycologia 108:6-19. <http://dx.doi.org/10.3852/15-038>
- Bush EA, Hong CX and Stromberg EL. 2003. Fluctuations of *Phytophthora* and *Pythium* spp. in components of a

of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* and highlights the importance of irrigation water as a way of spreading both pathogens. At the same time, it lays the foundations for future studies, such as knowing the population dynamics through out the agricultural cycle, determining whether these species only use irrigation channels as a way of dissemination or if they complete their life cycle in these bodies of water, as well as to determining the presence of *P. hydropathica* and *P. drechsleri* in natural infections of horticulturally important plants in the region. This is the first report on *Phytophthora hydropathica* in irrigation channels in Mexico. These results indicate that it is necessary to continue research on natural environments, whether in superficial waters or in soils, to know the diverse species of *Phytophthora* present in Mexico, and therefore consider the potential risk these microorganisms represent for Mexican agriculture.

## CONCLUSIONS

This study detected the presence of *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* in the irrigation channels of the Culiacán Valley. These species showed differential pathogenicity in chili pepper leaves and tomato leaf lets.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT for funding Brando Álvarez Rodríguez's studies.

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

- recycling irrigation system. Plant Disease 87:1500-1506. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.12.1500>
- Copes WE, Yang X and Hong CX. 2015. *Phytophthora* species recovered from irrigation reservoirs in Mississippi and

- Alabama nurseries and pathogenicity of three new species. *Plant Disease* 99:1390-1395. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1197-RE>
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. First edition, APS press, St. Paul, MN. 562 p.
- Fernandez-Pavia SP, Díaz-Celaya M and Rodríguez-Alvarado G. 2013. *Phytophthora* in Mexico. Pp: 215-221. In: Lamour K. (ed.). *Phytophthora: A global perspective*. CAB International. USA. 257 p.
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Mondragón-Flores A, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernandez R y Herrera-Camacho J. 2015. Enfermedades de especies vegetales en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Primera edición. Morelia, México. 425 p.
- Gallegly ME and Hong CX. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. Primera edición. APS Press. St Paul, MN, USA. 168 p.
- Ghimire SR, Richardson PA, Moorman GW, Lea-Cox JD, Ross DS and Hong CX. 2009. An *in-situ* baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. *Plant Pathology* 58:577-583. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02016.x>
- Ghimire SR, Richardson PA, Kong PHJ, Lea-Cox JD, Ross DS, Moorman GW and Hong CX. 2011. Distribution and diversity of *Phytophthora* species in nursery irrigation reservoir adopting water recycling system during winter months. *Journal of Phytopathology* 159:713-719. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01831.x>
- Grünwald NJ, Martin FN, Larsen MM, Sullivan CM, Press CM, Coffey MD, et al. 2011. *Phytophthora*-ID.org: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. *Plant Disease* 95:337-342. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-10-0609>
- Hajebrahimi S and Banihashemi Z. 2011. Host range of *Phytophthora parsiana*: a new high temperature pathogen of woody plants. *Phytopathologia Mediterranea* 50:159-165. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3055
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6:589-604. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2005.00308.X>
- Hong CX, Gallegly ME, Richardson PA, Kong P, Moorman GW, Lea-Cox JD and Ross DS. 2010. *Phytophthora hydrophatica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*. *Plant Pathology* 59:913-921. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02323.x>
- Hong CX and Moorman GW. 2005. Plant pathogens in irrigation water: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Science* 24:189-208. Disponible en línea: <http://www.nurserycropsscience.info/water/pathogens/technical-pubs/hong-and-moorman-2005.pdf/view>
- Hüberli D, Hardy GE St J, White D, Williams N and Burgess TI. 2013. Fishing for *Phytophthora* from Western Australia's waterways: a distribution and diversity survey. *Australasian Plant Pathology* 42:251-260. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0195-6>
- Hulvey J, Gobena D, Finley L and Lamour K. 2010. Co-occurrence and genotypic distribution of *Phytophthora* species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee. *Mycologia* 102:1127-1133. <http://dx.doi.org/10.3852/09-221>
- Jeffers SN and Martin SB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1038-1043. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n11_1038.pdf
- Kroon LPNM, Bakker FT, van den Bosh 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/10.1016/j.fgb.2004.03.007>
- Kurtbetli I. 2014. Involvement of *Phytophthora cryptogea* in sweet cherry decline in Turkey. *Phytoparasitica* 42:627-630. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-014-0403-8>
- Martin FN, Abad ZG, 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>
- Mills SD, Foerster H and Coffey MD. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analyses. *Mycological Research*. 95:31-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81359-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81359-2)
- Mitchell DJ and Kannwischer-Mitchell ME. 1992. *Phytophthora*. Pp: 31-38. In: Singleton LE, Mihail JD and Riush CM. (eds.). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. American Phytopathological Society, St, Paul, MN. 266 p.
- Mora DAN. 2013. Variabilidad genética de aislados de *P. capsici* y *Phytophthora drechsleri* de plantas ornamentales. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 112 p.
- Orlikowski LB, Ptaszek ATM and Orlikowska T. 2012. Relationship between source of water, occurrence and pathogenicity of *Phytophthora plurivora*. *Acta Mycologica* 47:3-9. Disponible en línea: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/am/article/viewFile/am.2012.001/2195>
- Perlerou C, Tziros G, Vetraino AM and Diamandis S. 2010. *Phytophthora cryptogea* causing ink disease of *Castanea sativa* newly reported in Greece. *Plant Pathology* 59:799. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02268.x>
- Reeser PW, Sutton W, Hansen EM, Remigi P and Adams GC. 2011. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia* 103:22-35. <http://dx.doi.org/10.3852/10-013>
- Romero-Cova S and Solis-Aragon G. 1996. New hosts of some species of the genus *Phytophthora* (Phycomycetes: Pythiaceae) in Mexico. *Agrociencia* 30:241-247.
- Sutton W, Hansen EM, Reeser PW and Kanaskie A. 2009. Stream monitoring for detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon tanoak forest. *Plant Disease* 93:1182-1186. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1182>
- Tyler BM. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology* 8:1-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00373.x>
- Vitale S, Luongo L, Galli M and Belisario A. 2014. First report of *Phytophthora hydrophatica* causing wilting and shoot

- dieback on *Viburnum* in Italy. Plant Disease 98:1582. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0308-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, U.S.A. 461 p.
- Yamak F, Peever TL, Grove GG and Boal RJ. 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River valley of Washington State. Phytopathology 92:1210-1217. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.11.1210>.
- Zappia RE, Hüberli D, Hardy GE St. J and Bayliss KL. 2014. Fungi and oomycetes in open irrigation systems: knowledge gaps and biosecurity implications. Plant Pathology 63:961-972. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12223>
- Zelaya-Molina L, Ortega M and Dorrance A. 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/s10529-010-0478-3>

Severity of a *Phytophthora capsici* isolate in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level

Severidad de una cepa de *Phytophthora capsici* en plantas de chayote *Sechium edule* a nivel de cámara de crecimiento

Mauricio Iván Andrade-Luna, Estudiante de Doctorado del Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: mauricio@colpos.mx; **David Espinosa-Victoria***, Laboratorio de Interacción Molecular Planta-Microorganismo, Área de Microbiología, Programa de Postgrado en Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: despinos@colpos.mx; **Olga Gómez-Rodríguez**, Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: olgago@colpos.mx; **Jorge Cadena-Iñiguez**, Programa de Posgrado en Innovación en el Manejo de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí, Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. C. P. 78600. México. Correo electrónico: jocadena@colpos.mx; **María de Lourdes Arévalo-Galarza**, Programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: larevalo@colpos.mx; **Libia Iris Trejo-Téllez**, Laboratorio de Nutrición Vegetal, Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: tlibia@colpos.mx; **Julián Delgadillo-Martínez**, Área de Microbiología, Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. de México. C.P. 56230. México. Correo electrónico: juliandm@colpos.mx.

*Autor para correspondencia: E-mail: despinos@colpos.mx

Recibido: 12 de junio 2016.

Aceptado: 14 de septiembre 2016.

Andrade-Luna MI, Espinosa-Victoria D, Gómez-Rodríguez O, Cadena-Iñiguez J, Arévalo-Galarza ML, Trejo-Téllez LI, Delgadillo-Martínez J. 2017. Severity of a *Phytophthora capsici* isolate in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 40-57.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1607-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-3)

Primera publicación DOI: 20 de Noviembre, 2016.

First DOI publication: November 20, 2016.

Resumen. Se determinó la severidad de *Phytophthora capsici* en plantas de chayote y se propuso

Abstract. The severity of *Phytophthora capsici* in chayote plants was determined and a scale of severity is proposed, given its recent confirmation as a causative agent of disease. Plants with wilting symptoms were sampled from two commercial chayote orchards in Huatusco, Veracruz, Mexico. The isolated oomycete, from fruits and stems, was characterized morphological and molecularly, which was identified as *P. capsici*. Chayote plants developed in growth chamber were inoculated with $1, 3$ y 6×10^5 zoospores 15 days after sowing. Necrosis of the transition zone between the stem and roots, the percentage of wilted leaves and wilting of the plant were evaluated. Three days

una escala de severidad, dada su reciente confirmación como agente causal de enfermedad. Se muestrearon plantas con síntomas de marchitez en dos huertos comerciales de chayote en Huatusco, Veracruz, México. El oomiceto aislado, a partir de frutos y tallos, fue caracterizado morfológica y molecularmente e identificado como *P. capsici*. Plantas de chayote desarrolladas en cámara de crecimiento fueron inoculadas con 1, 3 y 6 x 10⁵ zoosporas 15 días después de la siembra. Se evaluaron la necrosis de la zona de transición entre el tallo y la raíz, el porcentaje de hojas marchitas y la marchitez de la planta. A los tres días después de la inoculación (ddi) se observó de 2.3 a 3.0 cm de longitud de la necrosis y 50 % de hojas marchitas. A los cinco ddi, la necrosis fue de 2.5 a 3.15 cm y 80 % de hojas marchitas. A los siete ddi, la necrosis fue de 2.67 a 3.3 cm con 100 % de hojas marchitas (planta muerta). Con base en los síntomas observados, se diseñó una escala de severidad para evaluar el avance del daño de *P. capsici* en plantas de chayote bajo condiciones controladas.

Palabras clave adicionales: Nivel de inóculo, Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces, Marchitez foliar.

INTRODUCCIÓN

El género *Phytophthora* es uno de los causantes de enfermedades del suelo con mayor impacto económico en todo el mundo (Lamour *et al.*, 2012). Este patógeno es altamente dinámico y destructivo, ya que ataca las raíces, tallos, hojas y frutos de una gran variedad de hortalizas (Lamour *et al.*, 2012). Además, posee ciclos sexual y asexual que dificultan el control de la enfermedad que causa (Ploetz *et al.*, 2002).

Inicialmente, Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) reportaron a *Pythium* sp., *Fusarium oxys-*

after inoculation (dai), 2.3 to 3.0 cm of necrosis length and 50 % of wilted leaves were observed. At five day, necrosis was 2.5 to 3.15 cm with 80 % of wilted leaves. At seven day, necrosis was 2.67 to 3.3 cm with 100 % wilted leaves (dead plant). Based on the observed symptoms, a severity scale was designed to evaluate the progression of damage *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

Additional key words: Inoculum level, Necrosis in the transitional zone between the stem and roots, leaf wilting

INTRODUCTION

The genus *Phytophthora* is one of the causes of soil diseases with the greatest economic impact in the world (Lamour *et al.*, 2012). This pathogen is highly dynamic and destructive, since it attacks roots, stems, leaves, and fruits of a large variety of vegetable crops (Lamour *et al.*, 2012). It also has sexual and asexual cycles that make it difficult to control the disease it causes (Ploetz *et al.*, 2002).

Initially, Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010) reported *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* as causative agents of the rotting of chayote in Costa Rica and Mexico, respectively. Later, Olguín *et al.* (2013) identified *Phytophthora capsici* as the causative agent of rotting in the transition area between the stem and the roots of the chayote plants. This oomycete is present in the soils of the production areas of the state of Veracruz, Mexico, where humidity levels are high.

The area of Huatusco, Veracruz, Mexico, in particular, is one of the most important areas in the production of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) worldwide. Recently in plants in orchards there have been stains on leaves with symptoms of wilting due to the rotting of the transition area

porum y *F. sambucinum* como agentes causales de la pudrición del chayote en Costa Rica y México, respectivamente. Más tarde, Olguín *et al.* (2013) identificaron a *Phytophthora capsici* como el agente causal de la pudrición de la zona de transición entre el tallo y la raíz de las plantas de chayote. Este oomiceto se encuentra presente en los suelos de las zonas productoras del estado de Veracruz, México, donde existe alta humedad.

Particularmente, la zona de Huatusco, Veracruz, México, es una de las principales zonas productoras de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) a nivel mundial. Recientemente, se han presentado en las huertas manchones de plantas con síntomas de marchitez en las hojas debido a la pudrición de la zona de transición entre el tallo y la raíz, que afecta la absorción de agua y que finalmente conduce a la muerte de la planta (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006 y 2011; Cadena-Iñiguez y Arévalo-Galarza, 2008; Lira, 1992).

El rendimiento de la planta de chayote es de aproximadamente 130 ton de fruto ha⁻¹ en plantaciones comerciales con densidades de 100 a 128 plantas ha⁻¹. La producción por planta es aproximadamente de 47 a 120 kg en un periodo de seis meses, por lo que la muerte de varias plantas por hectárea representa pérdidas económicas significativas (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). A nivel nacional, entre 2010 y 2014 se obtuvo en promedio una producción de chayote de 162,600 toneladas (SIAP, 2016).

No obstante, se conoce muy poco sobre severidad inducida por *P. capsici*, dada su reciente confirmación etiológica. En este sentido, la medición y caracterización cuantitativa y cualitativa de la intensidad de una enfermedad (incidencia o severidad), es un requisito indispensable en estudios epidemiológicos básicos. Con esta información, se podrán generar en el futuro modelos de estimación de pérdidas, así como la importancia económica del

between the stem and the root, which affects the absorption of water, leading to the death of the plant (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006 y 2011; Cadena-Iñiguez and Arévalo-Galarza, 2008; Lira, 1992).

The plant yield for the chayote plant is of approximately 130 ton of fruit ha⁻¹ in commercial plantations with densities of 100 to 128 plants ha⁻¹. Production per plant is of approximately 47 to 120 kg in a period of six months; therefore the death of several plants per hectare brings significant economic losses (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). On a national scale, from 2010 to 2014 the average chayote production was 162,600 tons (SIAP, 2016).

However, little is known on the severity induced by *P. capsici*, given its recent data etiological confirmation. In this sense, taking the measurements and quantitative and qualitative characteristics of the intensity of a disease (incidence or severity), is a crucial requirement in basic epidemiological studies. Using this information, loss estimation models could be produced in the future, along with the economic importance of the damage (Campbell and Madden, 1990; Kranz, 1988).

Due to the above, the aims of this work were to determine the degree of severity of *P. capsici* in *S. edule* plants at growth chamber level, with a controlled environment, and to create a visual scale of severity for its use and evaluation in production systems. The intention of this is to contribute to laying the foundations for a disease control system.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

The sampling area corresponded to two commercial orchards in the municipal area of Huatusco, Veracruz, Mexico, located in the coordinates 19° 7' 23.1" N, 97° 0' 5.2" W, and 19°

daño (Campbell y Madden, 1990; Kranz, 1988). Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el grado de severidad de *P. capsici* en plantas de *S. edule* a nivel de cámara de crecimiento con ambiente controlado y elaborar una escala visual de severidad para su uso y evaluación en los sistemas de producción. Con lo anterior se pretende contribuir al establecimiento de las bases para un sistema de control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La zona de muestreo correspondió a dos huertos comerciales del municipio de Huatusco, Veracruz, México, situados en las coordenadas: 19° 7' 23.1" N, 97° 0' 5.2" O y 19° 7' 21.6" N, 97° 0' 4.9" O, a una altitud de 1,333 msnm. Los tipos de suelos presentes en la zona de muestreo son Luvisoles y Cambisoles. El clima es semicálido-húmedo con una temperatura promedio de 18.8°C, precipitación pluvial media anual de 1,763 mm, y vegetación característica del subtropico perennifolio. Durante el mes de diciembre de 2014 se colectaron muestras de plantas chayote var. Ventlali que presentaba síntomas de pudrición característica (pérdida de turgencia, reblandecimiento del tejido vegetal, presencia de micelio y olor penetrante) en frutos y de la zona de transición entre el tallo y la raíz. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico debidamente rotuladas y colocadas en una hielera.

Aislamiento e identificación de microorganismos asociados con la enfermedad

Se colectaron 10 muestras, tanto de frutos como de la zona de transición entre el tallo y la raíz, de

7' 21.6" N, 97° 0' 4.9" W, at an altitude of 1,333 masl. The types of soils present in the sampling area were Luvisols and Cambisols. The climate is semiwarm-humid with an average temperature of 18.8°C; average annual rainfall is 1,763 mm and the characteristic vegetation is of the evergreen subtropics. In December 2014, samples were gathered of chayote plants, var. Ventlali with symptoms of characteristic rotting (loss of turgidity, softening of plant tissue, presence of mycelia, and strong smell) in fruits and the transition area between stem and root. The samples were transported to the lab in plastic bags, which were labeled and placed in a cooler.

Isolation and identification of microorganisms related to the disease

Ten samples were taken of both fruit and of the transition area between stem and root, from each of the two areas of study. In this case, the number of samples taken from each location was standardized, unlike reports by Olguín *et al.* (2013). The infected tissue of chayote plants and fruits was washed with distilled water and cut into 6 sections of approximately 5 mm in length. The result was 60 sections (30 of fruit and 30 of the stem-root transition area). Likewise, 5 asymptomatic samples taken from fruits and the stem-root transition area were analyzed. The sections were disinfected with a commercial sodium hypochlorite solution 1 % for 1 min; they were rinsed several times with sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Later, the sections were cultivated in water-agar plates (acidified with lactic acid at 25 %) and incubated at 28 °C. Once myceliar growth was observed, using a hole puncher, discs of 0.5 cm in diameter were taken from the developed cultures, and there were replanted in a V8 juice-agar (V8) and potato dextrose agar (PDA), and incubated at 28°C for 48 h (French and Hebert, 1980; French-Monar

cada uno de los dos sitios de estudio. En este caso, se uniformizó el número de muestras tomadas de cada sitio, a diferencia de lo reportado por Olguín *et al.* (2013). El tejido enfermo de plantas y frutos de chayote fue lavado con agua destilada y cortado en 6 secciones de aproximadamente 5 mm de longitud. Como resultado se obtuvieron 60 secciones (30 de fruto y 30 de la zona de transición tallo-raíz). Así también, se analizaron 5 muestras asintomáticas de frutos y de la zona de transición tallo-raíz. Las secciones se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1% por 1 min, se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Posteriormente, se realizó la siembra de las secciones en placas de agua-agar (acidificado con ácido láctico al 25%) y se incubaron a 28 °C. Una vez que se observó el crecimiento miceliar, con ayuda de un sacabocados, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro de las colonias desarrolladas y se sembraron en placas de medio jugo V8-agar (V8) y papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 28°C por 48 h (French y Hebert, 1980; French-Monar *et al.*, 2006). El oomiceto desarrollado fue purificado en placas de medio V8-agar empleando monoesporangios. Las características cualitativas y cuantitativas de las estructuras asexuales (esporangióforos y esporangios) del oomiceto fueron analizadas a partir de preparaciones semi-permanentes con la ayuda de un microscopio compuesto (OLYMPUS. Mod: CX31RBSFA). Los esporangios fueron medidos a los 10 días de incubación en medio V8. Con el resultado de 100 mediciones se identificó al oomiceto empleando las descripciones de Newhook *et al.* (1978), Stamps (1985), O'Donnell (1992) y Gallegly y Hong (2008). El resto de los aislamientos fúngicos presentes en las muestras se purificaron por transferencia de colonias y se identificaron empleando las claves de Barnett y Hunter (1998).

et al., 2006). The oomycete developed was purified in V8-agar medium plate using monosporangia. The qualitative and quantitative characteristics of the asexual structures (sporangiophores and sporangia) of the oomycete were analyzed from semipermanent preparations with the use of a compound microscope (OLYMPUS. Mod: CX31RBSFA). The sporangia were measured after 10 days of incubation in V8 medium. With the result of 100 measurements, we identified the oomycete using the descriptions by Newhook *et al.* (1978), Stamps (1985), O'Donnell (1992), and Gallegly and Hong (2008). The rest of the fungal isolations present in the samples were purified by transferring cultures, and were identified using the taxonomic keys of Barnett and Hunter (1998).

Pathogenicity test of the isolated chayote oomycete

The oomycete with the highest frequency (76 %) was used to carry out the pathogenicity test. The chayote fruits were washed with soap and water, then disinfested with alcohol at 70 %. Using a blade, two cuts were made, each 1 cm deep, inside of which we placed a culture medium disc, of 0.5 cm in diameter, which contained the oomycete. Eighteen chayote fruits were inoculated. The control fruits were only added growth medium without oomycete growth. Afterwards, the inoculated fruit were placed in a wet paper towel on top of a base of styrofoam. The fruits were kept inside sealed plastic bags. The paper towel was added sterile distilled water to maintain moisture saturation conditions in the system. To stimulate the growth of the oomycete, the incubation temperature was kept between 24 and 27 °C, with a photoperiod of 12-12 h. Once the fruits were invaded by the mycelium of the oomycete, the latter was reisolated

Prueba de patogenicidad del oomiceto aislado de chayote

El oomiceto que presentó la mayor frecuencia (76 %), fue utilizado para realizar la prueba de patogenicidad. Los frutos de chayote se lavaron con agua y jabón, y posteriormente se desinfectaron con alcohol al 70%. Con una navaja se hicieron dos incisiones de 1 cm de profundidad, en las que se colocó un disco de medio de cultivo de 0.5 cm de diámetro que contenía al oomiceto. Se inocularon 18 frutos de chayote. Los frutos testigo se les adicionó únicamente medio de cultivo sin crecimiento del oomiceto. Posteriormente, los frutos inoculados fueron colocados sobre una toalla de papel absorbente húmeda, que se encontraba sobre una base de unicel. Los frutos se mantuvieron dentro de bolsas de plástico cerradas. A la toalla se le agregó agua destilada estéril para mantener condiciones de saturación de humedad en el sistema. Para estimular el desarrollo del oomiceto, la temperatura de incubación se mantuvo entre 24 y 27°C, con un fotoperiodo de 12-12 h. Una vez que los frutos fueron invadidos por el micelio del oomiceto, éste fue re-aislado en placas de medio V8. La morfología de las colonias obtenidas se comparó con la del aislamiento original de las huertas comerciales. El ensayo de patogenicidad se realizó dos veces.

Amplificación del ADN y secuenciación del oomiceto

Después de cuatro días de crecimiento del oomiceto en placas de medio V8, se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en un tubo de reacción de 200 µL conteniendo 30 µL de la solución de lisis, Lyse N Go (Pierce, USA). Posteriormente se colocó el tubo a 95 °C durante 5 min y se centrifugó por 10 min a 5,000 x g. Finalmente se tomaron 5 µL del sobrenadante para realizar las amplificaciones de los ITS mediante PCR.

in V8 medium plates. The morphology of the cultures obtained was compared with that of the original isolation in commercial orchards. The pathogenicity test was performed twice.

DNA amplification and sequencing of the oomycete

After four days' growth of the oomycete in V8 medium plates, a portion of approximately 5 mm of mycelium was taken and placed in a 200 µL test tube with 30 µL of the lysis solution Lyse N Go (Pierce, USA). The tube was then heated at 95 °C for 5 min and centrifuged for 10 min at 5,000 x g. Finally, 5 µL of supernatant were taken to carry out the amplifications of the ITS by PCR.

For the amplification of the ITS area, we used the universal primers ITS5 (5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3') and ITS4 (5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), which amplify a fragment of 580 pairs of bases, approximately (pb). Another pair of primers used was ITS5 and NL4 (5'–GGTCCGTGTTTCAAGACGG–3') (O'Donnell, 1992), to amplify a fragment of 1,100 pb, which included the region of the ITS and ~600 pb of the gene 28S rRNA. The reaction mixture for PCR was prepared in a final volume of 25 µL, containing the enzyme 1X Taq DNA polymerase, 0.8 mM deoxynucleotide triphosphates (0.2 mM each), 100 ng DNA, 20 pmol of each primer, and 2 units of GoTaq DNA (Promega, USA). The amplifications were carried out with an initial denaturation cycle at 95 °C for 2 min; 35 denaturation cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 2 min; finally, one amplification cycle at 72 °C for 10 min (Silva-Rojas *et al.*, 2009).

All the PCR reactions were carried out in a thermocycler (Model: TECHNER TC-512, brand: Bibby Scientific). The amplifications were verified

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGA-AGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), que amplifican un fragmento de 580 pares de bases aproximadamente (pb). Otro par de iniciadores utilizados fueron ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), para amplificar un fragmento de 1,100 pb, que incluyó la región del ITS y ~600 pb del gen 28S rRNA. La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo la enzima 1X Taq DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de GoTaq DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, el alineamiento a 57°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72°C por 10 min (Silva-Rojas *et al.*, 2009).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Modelo: TECHNER TC-512, marca: Bibby Scientific). Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % preparado con el amortiguador 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) y corrimiento a 87 V cm⁻³ durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹), y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (Modelo: GL-3120, Marca: Scientific). Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación (Modelo: QIAquick PCR, Marca: Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA (Modelo 3730XL, Marca: Applied BioSystems), para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

by electrophoresis in an agarose gel at 1.2 % prepared with the buffer 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) and run at 87 V cm⁻³ for 1 h. The gel became stained with ethidium bromide (3 mg L⁻¹), and the bands were viewed in a UV transilluminator (Model: GL-3120, brand: Scientific). The amplified products were cleaned using the purification kit (Model: QIAquick PCR, brand : Qiagen), following instructions by the manufacturer. These products were sequenced in both directions using an automated system DNA sequencing system (Model 3730XL, brand: Applied BioSystems), to ensure no incorrect nucleotide readings.

Comparing the ITS and LSU sequences

The sequences from both regions were assembled and edited using BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), used to create a consensual sequence. This sequence was compared with sequences deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), with the option BLASTN 2.2.19 (Brown *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2000).

Evaluation of the severity of the disease Planting the plant material

For the pregermination of the chayote fruits, we used a 40 x 60 cm black, plastic bag, in which 20 fruits were placed for 20 days. The fruits had previously been washed with soap and rinsed with a 0.6 % chlorine solution. Once the root and stem sprouted, each fruit was placed in a black plastic bag (25 x 25 cm) containing 2,500 cm³ of substrate composed of sand-agrolite-vecompost (40:40:20), treated twice with steam under 120 pounds of pressure for three hours. The fruits were kept in a growth chamber (Model CEL 37-14,

Comparación de las secuencias ITS y LSU

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Brown *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2000).

Evaluación de la severidad de la enfermedad Siembra del material vegetal

Para la pre-germinación de los frutos de chayote, se utilizó una bolsa negra de plástico de 40 x 60 cm donde se colocaron 20 frutos por 20 días. Los frutos previamente habían sido lavados con jabón y enjuagados con una solución de cloro al 0.6 %. Una vez que brotaron la raíz y el tallo, cada fruto germinado fue colocado en una bolsa de plástico negra (25 x 25 cm) que contenía 2,500 cm³ de sustrato compuesto por arena-agrolita-ve micomposta (40:40:20), tratado dos veces con vapor a 120 libras de presión por tres horas. Los frutos se mantuvieron en una cámara de crecimiento (Modelo CEL 37-14, Marca: SHERER,) a una temperatura de 26±1 °C, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de obscuridad y una intensidad luminosa de 6,768 lux de luz fluorescente. Las plantas inicialmente fueron regadas a capacidad de campo, y posteriormente se realizaron riegos cada tres días con 300 mL de agua por planta hasta el fin del experimento.

Preparación del inóculo

El oomiceto se cultivó en placas de medio V8 por 7 días a 28 °C. A cada caja de Petri se le agregó solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9 % (AbbottMR) por 10 min. La solución isotónica se decantó y con la ayuda de una aguja de disección,

brand: SHERER,) at a temperature of 26±1 °C, with a photoperiod of 14 light hours and 10 of darkness, and a light intensity of 6, 768 lux of fluorescent light. The plants were initially watered at field capacity, and later, irrigated every three days with 300 mL of water per plant until the end of the experiment.

Preparation of the inoculant

The oomycete was cultivated in V8 medium plates for 7 days at 28 °C. Each Petri dish was added an isotonic solution of sodium chloride at 0.9 % (AbbottMR) for 10 min. The isotonic solution was poured out, and using a dissection needle, the dish was divided in four parts. Each part of the medium containing the oomycete was placed in a sterile Petri dish. Sterile distilled water was then added, until it covered the medium, and the dishes were placed under a cold white light at 26 °C for 48 h. The release of the zoospores was then induced, exposing the Petri dishes to two temperatures (4 °C and room temperature) for 30 min. Finally, the number of zoospores was quantified using a cytometer (Marienfeld®). Inoculation was performed when the plants had an average of 16 leaves (15 days after planting) applying a suspension of 1, 3 and 6 x 10⁵ zoospores to each plant in the transition zone between stem and root. Each treatment (level of inoculant) consisted of four plants and the control. To determine the level of inoculant, the minimum level of of *P. capsici* used by Trujillo-Viramontes *et al.* (2005) in JEP chili plants, was taken into consideration.

The progress of the damage induced by *P. capsici* was measured in cm from the transition area between stem and root. Apart from the length of the necrosis, we determined the number of wilted leaves and guides, as well as the presence of mycelia in the seed 3, 5 and 7 days after inoculation (ddi). Based on the symptoms and measurements

la placa se dividió en cuatro partes. Cada parte del medio conteniendo el oomiceto se colocó en una caja de Petri estéril. Después se agregó agua destilada estéril hasta cubrir el medio, y las cajas se colocaron bajo una lámpara de luz blanca fría a 26 °C por 48 h. Posteriormente, se indujo la liberación de zoosporas exponiendo las cajas Petri a dos temperaturas (4 °C y temperatura ambiente) por 30 min. Finalmente, se cuantificó el número de zoosporas con un citómetro (Marienfeld®). La inoculación se efectuó cuando las plantas tenían en promedio 16 hojas (15 días después de la siembra) aplicando una suspensión de 1, 3 y 6 x 10⁵ zoosporas por planta en la zona de transición entre el tallo y la raíz. Cada tratamiento (nivel de inóculo) consistió de cuatro plantas al igual que el testigo. Para la determinación del nivel de inóculo, se consideró el nivel mínimo de inóculo de *P. capsici* usado por Trujillo-Viramontes *et al.* (2005) en plantas de chile JEP.

El avance del daño inducido por *P. capsici* se midió en cm a partir de la zona de transición entre el tallo y la raíz. Además de la longitud de la necrosis, se determinó el número de hojas y guías marchitas así como presencia de micelio en la semilla a los 3, 5 y 7 días después de la inoculación (ddi). Con base en los síntomas y mediciones observadas, como se ha hecho con otros cultivos (Navarrete y Acosta, 1999), se diseñó una escala de severidad para evaluar la magnitud del daño de *P. capsici* en plantas de chayote en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas. El ensayo de evaluación de la patogenicidad se montó en tres ocasiones con similares resultados.

Análisis estadístico

Los datos de cada variable se sometieron al análisis de varianza y a la comparación de medias empleando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 2002-2003).

observed, as in the case of other crops (Navarrete and Acosta, 1999), we designed a scale of severity to evaluate the damage of *P. capsici* in chayote plants in growth chambers under controlled conditions. The pathogenicity evaluation test was set up on three occasions with similar results.

Statistical analysis

The data of each variable underwent an analysis of variance and comparison of average, using the Tukey test ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 2002-2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Detecting *Phytophthora* in diseased chayote plants

Out of the 60 sections (30 fruit and 30 stem sections) planted in V8 agar, in 46 (76 %) *Phytophthora* sp grew, in 9 (15 %) *Fusarium*, and in 3 (4 %), *Alternaria*. The rest of the sections corresponded to saprophytic fungi and bacteria. Babadoost and Pavon (2013) indicate that the high frequency of *P. capsici*, as well as its virulence, determine its role as a causative agent of the disease. However, pathogenicity tests are required for each host plant. Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010) initially reported *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* as causative agents of rotting of chayote in Costa Rica and Mexico, respectively. However, the low frequency of *Fusarium* found in this investigation could indicate that the wilting of the chayote plants is not induced by this fungus.

Morphological characterization of the rot-causing oomycete

The cultures developed in V8 medium plates presented an abundance of aerial hyphae, of

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *Phytophthora* en plantas de chayote enfermas

De las 60 secciones (30 de fruto y 30 de tallo) sembradas en agar V8, en 46 (76 %) creció *Phytophthora* sp, en 9 (15 %) *Fusarium* y en 3 (4 %) *Alternaria*. El resto de las secciones correspondieron a hongos saprófitos y bacterias. Babadoost y Pavon (2013) indican que la alta frecuencia de *P. capsici*, así como su virulencia, determinan su papel como agente causal de enfermedad. No obstante, se requiere de las pruebas de patogenicidad para cada planta hospedera. Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) reportaron inicialmente a *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum* como agentes causales de la pudrición del chayote en Costa Rica y México, respectivamente. Sin embargo, la baja frecuencia de *Fusarium* encontrada en la presente investigación, podría ser indicativa de que la marchitez de las plantas de chayote no es inducida por este hongo.

Caracterización morfológica del oomiceto causante de la pudrición

Las colonias que se desarrollaron en placas de medio V8, presentaron hifas aéreas abundantes, de longitud considerable, algodonosas, poco radiadas y compactas. El micelio fue cenocítico, hialino, ramificado, de diámetro irregular. Los esporangios que se produjeron en placas de medio V8 y agua estéril (Figura 1a) presentaban tamaños y formas diferentes: ovoides, alimonadas (en promedio de 55 x 32 μm), con una papila prominente, caducos, principalmente con una sola papila (en pocas ocasiones se encontraron bipapilados) (Figura 1b), largos pedicelos persistentes, a veces simétricos y

considerable length, cotton-like, little radial, and compact. The mycelium was cenocytic, hyaline, branched, and with an irregular diameter. The sporangia produced in V8 and sterile water medium plates (Figure 1a) presented different sizes and shapes: ovoid, starchy (on average, 55 x 32 μm), with a prominent papilla, expired, mainly with only one papilla (seldom were there any with two found) (Figure 1b), long and persistent peduncle, sometimes symmetrical and other times, assymetrical and with clamidospores (Figure 1c). The morphometric data of the sporangia indicate the presence of *Phytophthora capsici* in the transition area between stem and roots and the fruits of the chayote, which agrees with reports by Olguín *et al.* (2013), who indicated that this oomycete is the causative agent of rotting in chayote plants.

Pathogenicity test for *Phytophthora* sp. in plantlets in growth chambers with a controlled environment

The oomycete inoculated in the chayote fruits indicates the same characteristic rotting of the fruits it was isolated from: loss of turgidity, rotting and the presence of white mycelia 5 days after inoculation (Figure 2a). Under humid conditions (80 to 100 %) the growth of the pathogen was conspicuous (Figure 2b). In pieces of fruits with mycelia placed in sterile distilled water and under continuous white light (Figure 2c), we observed abundant sporangia, irregularly spread out (Figure 2d).

Analyses of DNA sequences

The four sequences obtained in this study were placed in the GenBank-NCBI under the accession numbers KM087089, KM087090.1, KM087091,

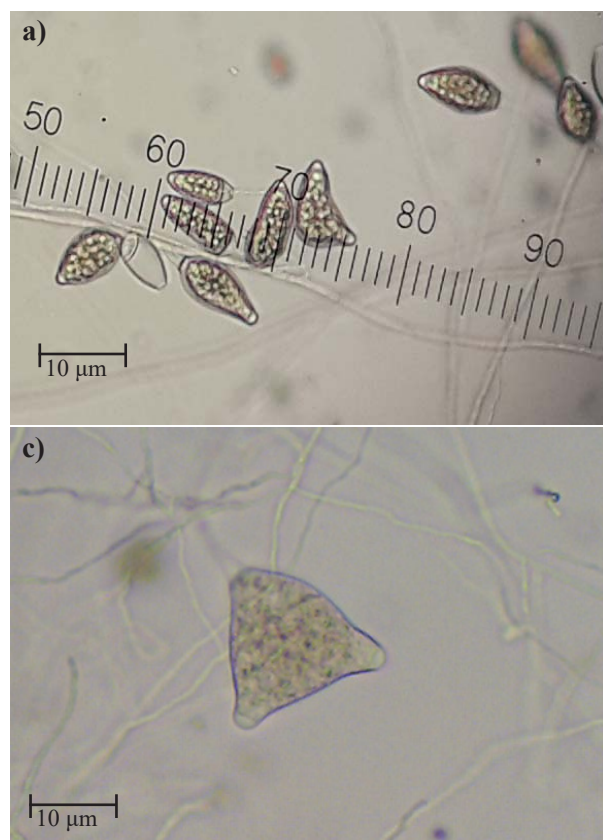


Figura 1. Micrografías del oomiceto aislado de chayote. a) Esporangios de *Phytophthora capsici*; b) Esporangio bipapilado; y c) Clamidiospora, observados por microscopía óptica.

Figure 1. Micrographies of the isolated chayote oomycetes. a) *Phytophthora capsici* sporangia; b) Bipapillate sporangium; and c) Chlamydiospore, observed using a light microscope.

otros más asimétricos y con presencia de clamidiosporas (Figura 1c). Los datos morfométricos de los esporangios indican la presencia de *Phytophthora capsici* en la zona de transición entre el tallo y las raíces y los frutos del chayote, lo que concuerda con lo reportado por Olgún *et al.* (2013), quienes indicaron que este oomiceto es el agente causal de la pudrición de plantas de chayote.

Prueba de patogenicidad de *Phytophthora* sp. en plántulas en cámara de crecimiento con ambiente controlado

El oomiceto que se inoculó en los frutos de chayote indujo la misma pudrición característica de los frutos donde se aisló: pérdida de turgencia, pudrición y presencia de micelio blanco a los 5 días

and KM087092. DNA sequencing confirmed that the isolated strain of the necrotic chayote tissue samples gathered in the area of study belonged to *Phytophthora capsici*, with an identity of 99 and 100 % with respect to the sequences of different isolations of the GenBank. It is worth mentioning that the strain with accession number KM087090.1, which showed an identity of 100 % (Table 1), was used in the severity test.

Severity of *P. capsici* in chayote plants

No significant differences ($\alpha=0.05$) were observed between the three levels of *P. capsici* inoculant for the variables number of wilted leaves, necrosis in the transition area between stem and roots, and wilting of chayote plants (Figure 3

después de la inoculación (Figura 2a). Bajo condiciones de humedad, entre 80 y 100 %, el desarrollo del patógeno fue conspicuo (Figura 2b). En trozos de fruto con micelio que se colocaron en agua destilada estéril y bajo luz blanca continua (Figura 2c), se observaron abundantes esporangios esparcidos irregularmente (Figura 2d).

Análisis de secuencias de ADN

Las cuatro secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en el GenBank-NCBI bajo los números de acceso KM087089, KM087090.1, KM087091 y KM087092. La secuenciación del ADN confirmó que la cepa aislada de las muestras

a, b, and c). When the plants were inoculated with *P. capsici*, differences were observed with the control plants (not inoculated), like in reports by Uribe-Lorio *et al.* (2014) in their work with chili pepper plants. The control plants remained healthy throughout the experiment. As in the present study, other authors (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) report that inoculation of 3×10^5 zoospores of the oomycete is enough to induce a response of the chili plant. Although no significant differences were found in the three levels of *P. capsici* inoculant used, there were numerical differences. Probably, 3×10^5 zoospores per plant is the top threshold, above which damage in chayote plants may not be statistically significant.

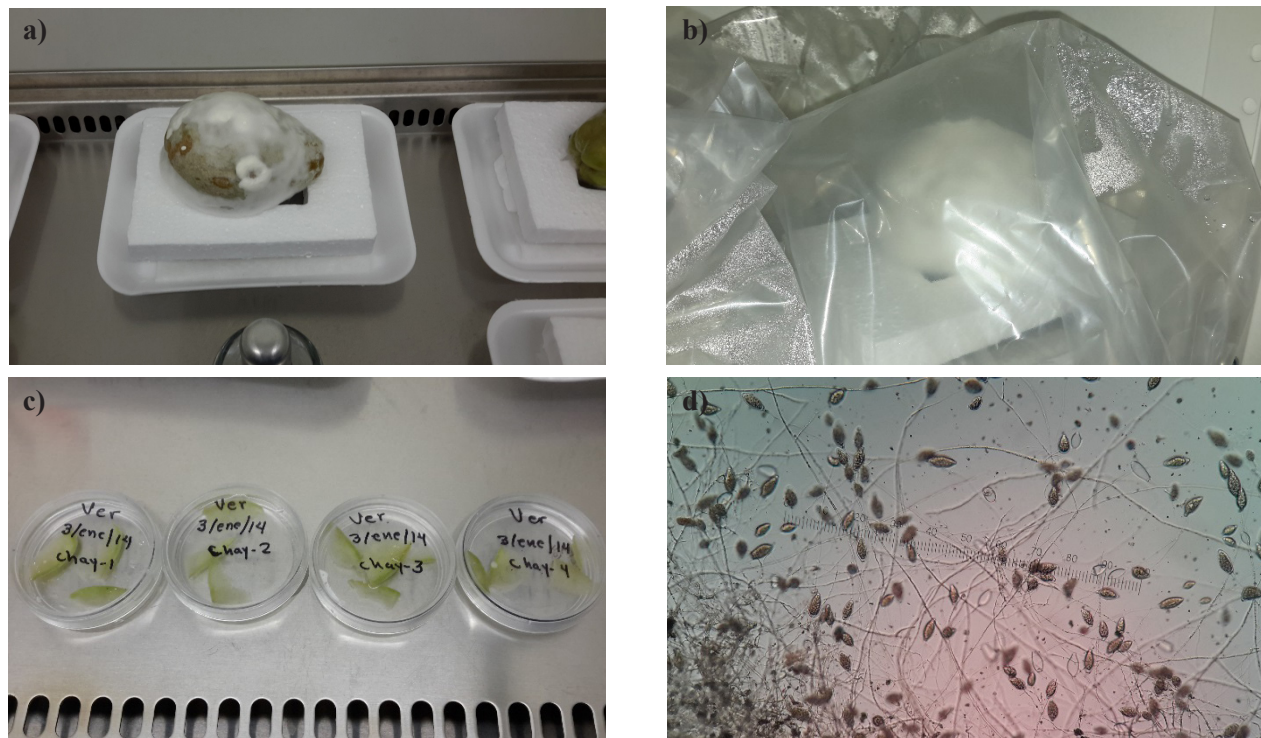


Figura 2. a) Frutos de chayote con presencia de micelio blanco, pérdida de turgencia y síntomas de pudrición; b) Frutos bajo condiciones de humedad, entre 80 y 100 %, con desarrollo conspicuo del patógeno; c) trozos de fruto con micelio colocados en agua destilada estéril bajo luz blanca continua; y d) esporangios esparcidos irregularmente.

Figure 2. a) Chayote fruits with white mycelia, loss of turgency, and symptoms of rotting; b) Fruits under conditions of humidity, between 80 and 100 %, with a conspicuous growth of the pathogen; c) pieces of fruit with mycelia, placed in sterile distilled water under continuous white light; and d) sporangia irregularly spread out.

de tejido necrótico de chayote, colectadas en la zona de estudio, correspondió a *Phytophthora capsici*, con una identidad de 99 y 100 %, con respecto a las secuencias de diferentes aislamientos del GenBank. Cabe señalar que la cepa con número de acceso KM087090.1, que presentó 100 % de identidad (Cuadro 1), fue utilizada en el ensayo de severidad.

Severidad de *P. capsici* en plantas de chayote

No se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici* para las variables número de hojas marchitas, necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces y marchitamiento de plantas de chayote (Figura 3 a, b y c). Cuando las plantas fueron inoculadas con *P. capsici*, se observaron diferencias con respecto a las plantas testigo (no inoculadas), igual como lo reportan Uribe-Lorio *et al.* (2014) en un trabajo realizado con plantas de chile. Las plantas testigos permanecieron sanas durante todo el experimento. Al igual que en el presente estudio, otros autores (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) reportan que la inoculación de 3×10^5 zoosporas del oomiceto es suficiente para inducir la respuesta de la planta de chile. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici*, empleados, si se observaron diferencias numéricas. Probablemente, 3×10^5 zoosporas por planta sea el límite umbral superior, arriba del cual el daño en plantas de chayote no será estadísticamente significativo.

Con los datos obtenidos se construyó la curva de progreso de la enfermedad. Independientemente del nivel de zoosporas inoculado, a los tres ddi, se observó el 50 % de hojas marchitas y de 2.3 a 3.0 cm de necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces (Figura 4). A los cinco ddi, el marchitamiento de las hojas fue de 80 % con un avance de

Cuadro 1. E-value, % de identidad y número de acceso en el GenBank-NCBI de las cepas de *Phytophthora capsici* aisladas de frutos y de la zona de transición entre el tallo y las raíces de plantas de chayote *Sechium edule*.

Table 1. E-value, % of identity and access number in the GenBank-NCBI of the *Phytophthora capsici* strains isolated from fruits and the transition area between the stem and roots of *Sechium edule* chayote plants.

| E-value | % de identidad | No. de acceso en el GenBank-NCBI |
|---------|----------------|----------------------------------|
| 2E-114 | 99 | GU111637 |
| 0.0 | 100 | KM087090.1 |
| 0.0 | 100 | AB688327 |
| 0.0 | 100 | KF611675 |

Using the data obtained, we built the disease progress curve. Regardless of the level of zoospores inoculated, at three ddi, we observed 50 % of wilted leaves, and 2.3 to 3.0 cm of necrosis in the transition area between stem and roots (Figure 4). At five ddi, wilting of leaves was 80% with the progress of necrosis at 2.5 to 3.15 cm and the presence of mycelia on the seed (the fruit). At seven ddi leaves presented 100 % wilting, necrosis from 2.67 to 3.3 cm, and the presence of mycelia in guides, seed, and roots. Therefore, the three levels of *P. capsici* inoculant were equally effective for the induction of wilting of chayote plants. Comparatively, the time of appearance of symptoms of the disease was lower than that reported by Olguín *et al.* (2013). The level of inoculation was crucial, while Olguín *et al.* (2013) used 11,500 sporangia mL⁻¹, this investigation used 1, 3 and 6 x 10⁵ zoospores mL⁻¹.

The necrosis in the transition area between stem and roots was observed starting on day 3 after inoculation, regardless of the level of inoculant. Early necrosis may have accelerated plant wilting.

At five ddi, plant wilting was observed to be above 50 %, also regardless of the level of

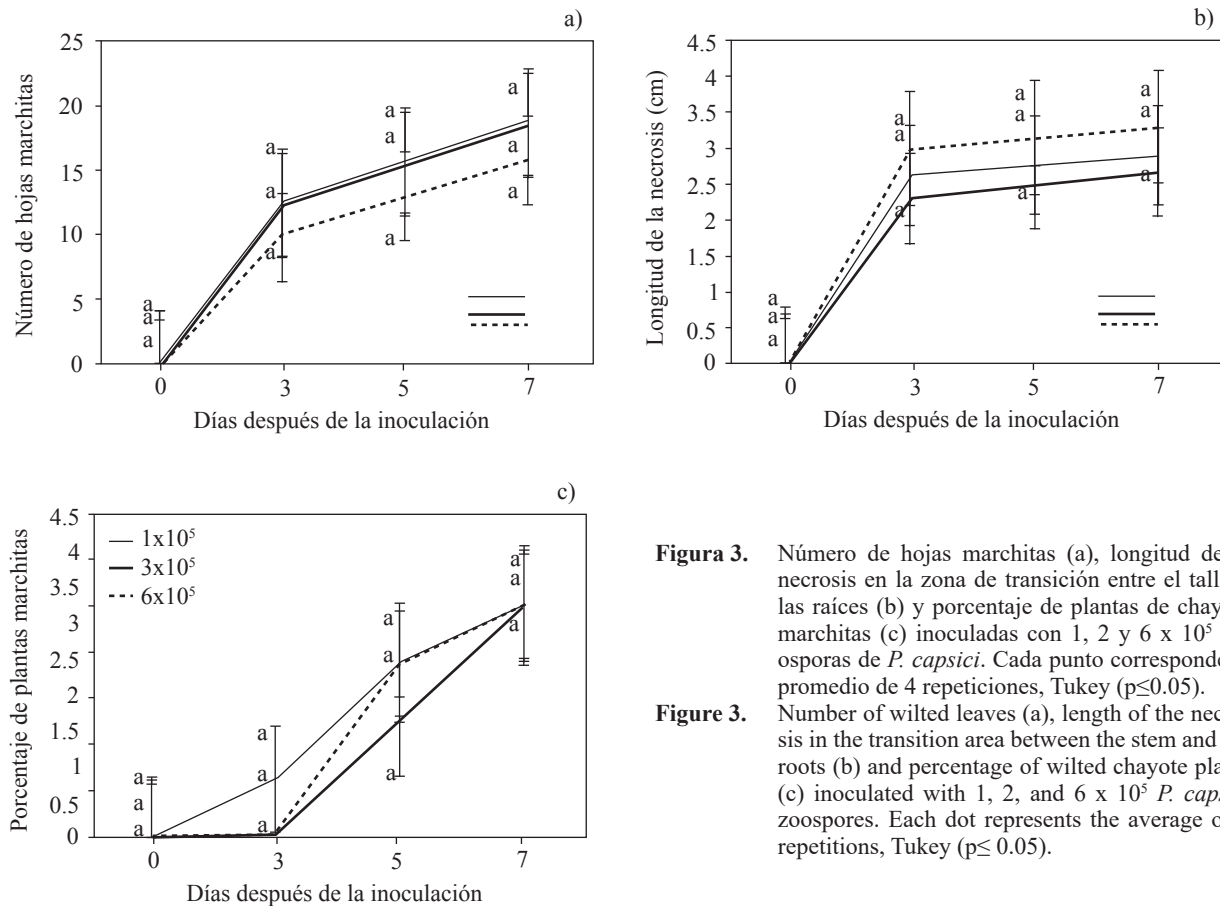


Figura 3. Número de hojas marchitas (a), longitud de la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces (b) y porcentaje de plantas de chayote marchitas (c) inoculadas con 1, 2 y 6 x 10⁵ zoosporas de *P. capsici*. Cada punto corresponde al promedio de 4 repeticiones, Tukey (p≤0.05).

Figure 3. Number of wilted leaves (a), length of the necrosis in the transition area between the stem and the roots (b) and percentage of wilted chayote plants (c) inoculated with 1, 2, and 6 x 10⁵ *P. capsici* zoospores. Each dot represents the average of 4 repetitions, Tukey (p≤ 0.05).

la necrosis de 2.5 a 3.15 cm y presencia de micelio sobre la semilla (el fruto). A los siete ddi se presentó 100 % de marchitamiento de las hojas, necrosis de 2.67 a 3.3 cm y presencia de micelio en guías, semilla y la raíz. Así, los tres niveles de inóculo de *P. capsici* fueron igualmente efectivos para inducir el marchitamiento de las plantas de chayote. Comparativamente, el tiempo de aparición de los síntomas de la enfermedad fue menor al reportado por Olguín *et al.* (2013). El nivel del inóculo fue crucial, mientras que Olguín *et al.* (2013) usaron 11,500 esporangios mL⁻¹, en la presente investigación se emplearon de 1, 3 y 6 x 10⁵ zoosporas mL⁻¹.

La necrosis de la zona de transición entre el tallo y las raíces fue observada desde los 3 días des-

inoculant, which shows the pathogenicity of the isolation studied, according to reports by Olguín *et al.* (2013). At seven ddi, necrosis development was, on average, 3.0 cm, which contributed to the wilting of plants at 100 %. Probably, the degradation of cell walls and middle lamella of the parenchyma tissue of the vascular system, typically caused by *P. capsici*, appeared in the transition area between stem and roots, which prevented the flow of water and nutrients for the adequate development of the plant (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

The substrate used was crucial in the experiment, since it provided high humidity conditions which favored the development and spreading of *P. capsici*. High humidity levels favored the mobility of zoospores, ensuring the infection by the

pués de la inoculación, independientemente del nivel de inóculo. La necrosis temprana pudo acelerar el marchitamiento de las plantas.

A los cinco ddi, se observó más del 50 % de marchitez de las plantas, también independiente del nivel de inóculo, lo que demuestra la patogenicidad del aislamiento estudiado, de acuerdo a lo reportado por Olguín *et al.* (2013). A los siete ddi, el desarrollo de la necrosis fue en promedio de 3.0 cm, lo que coadyuvó al 100 % de plantas marchitas. Probablemente, la degradación de la pared celular y lamela media del tejido parenquimatoso del sistema vascular, causado típicamente por *P. capsici*, se presentó en la zona de transición entre el tallo y las raíces, lo cual no permitió el paso de agua y nutrientes para el óptimo desarrollo de la planta (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

El sustrato utilizado fue crucial en el experimento, ya que este proveyó condiciones de alta humedad que favorecieron el desarrollo y diseminación de *P. capsici*. La alta humedad favoreció la movilidad de zoosporas asegurando la infección por parte del oomiceto. Silva-Rojas *et al.* (2009) indican que efectivamente, dicho factor ambiental es crucial para la diseminación de *P. capsici*.

La curva de progreso de la enfermedad (Figura 4) sirvió como base para elaborar una Escala de Severidad (Cuadro 2), con la que es factible evaluar los daños producidos por *P. capsici* en chayote bajo condiciones controladas. La escala fue validada en tres ocasiones. Las variables utilizadas para elaborar la escala fueron: porcentaje de hojas marchitas, longitud de necrosis en la zona de transición entre al tallo y las raíces, porcentaje de planta marchita y presencia de micelio. Con lo anterior se pretende contribuir al establecimiento de las bases para un sistema de control de la enfermedad inducida por *P. capsici* en plantas de chayote.

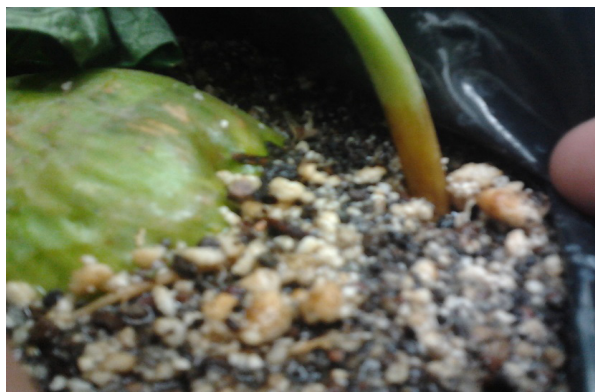


Figura 4. Avance de la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de plántulas de chayote a los tres días de la inoculación con 300,000 zoosporas de *P. capsici*.

Figure 4. Progress of the necrosis in the transition area between the stem and the roots of chayote plantlets three days after inoculation with 300,000 *P. capsici* zoospores.

oomycete. Silva-Rojas *et al.* (2009) indicate that, indeed, this environmental factor is crucial for the spreading of *P. capsici*.

The progress curve of the disease (Figure 4) was the base from which to create a Severity Scale (Table 2), which can be used to evaluate damages produced by *P. capsici* in chayote under controlled conditions. The scale was validated on three occasions. The variables used to create the scale were: percentage of wilted leaves, length of necrosis in the transition area between stem and roots, percentage of wilted plant, and the presence of mycelia. This attempts to become a contribution for the basis of a system for the control of the disease induced by *P. capsici* in chayote plants.

CONCLUSIONS

The strain PCSE2, with the accession number KM087090.1 identified as *P. capsici*, isolated from

Cuadro 2. Escala de severidad para evaluar los daños producidos por *P. capsici* en plantas de chayote crecidas bajo condiciones controladas.

Table 2. Scale of severity to evaluate the damages produced by *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

| Escala de severidad | Síntomas |
|---------------------|--|
| 1 | Sin síntomas visibles de enfermedad |
| 2 | Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 0.5 a 1.0 cm, con 15% de hojas marchitas. |
| 3 | Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 1.1 a 1.5 cm, con 30% de hojas marchitas. |
| 4 | Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 1.6 a 2.0 cm, con 50% de hojas marchitas. |
| 5 | Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 2.1 a 2.5 cm, con 75% de hojas marchitas. |
| 6 | Necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces de 2.6 a 3.0 cm, con 100% de hojas marchitas, planta muerta. Semilla cubierta con micelio en su totalidad. |

CONCLUSIONES

La cepa PCSE2 con número de acceso KM087090.1 identificada como *P. capsici*, aislada de plantas enfermas de chayote en Huatusco, Veracruz, México, indujo síntomas desde una nivel de inóculo de 1×10^5 zoosporas, resultando en la marchitez y muerte de plantas a los 5 y 7 ddi. La inoculación de 3×10^5 zoosporas promovió la presencia de plantas con síntomas de marchitez desde los 3 ddi, probablemente porque la necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces no permitió el paso de agua y nutrimentos para el óptimo desarrollo de la planta.

Aunque no se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tres niveles de inóculo de *P. capsici* para las variables número de hojas marchitas, necrosis en la zona de transición entre el tallo y las raíces y marchitamiento de plantas de chayote, con los datos del progreso de la enfermedad se diseñó una escala de severidad, como una herramienta inicial para evaluar el daño producido por *P. capsici* en plantas de chayote crecidas bajo condiciones controladas.

diseased chayote plants in Huatusco, Veracruz, Mexico, induced symptoms from an inoculant level of 1×10^5 zoospores, resulting in the wilting and death of plants at 5 and 7 ddi. The inoculation of 3×10^5 zoospores promoted the presence of plants with symptoms of wilting after 3 ddi, probably because the necrosis in the transition area between stem and roots did not allow the flow of water and nutrients for the adequate development of the plant.

Although no significant differences ($\alpha=0.05$) were observed between the *P. capsici* inoculant for the variables number of wilted leaves, necrosis in the transition area between stem and roots, and wilting of chayote plants, with the disease progress curve, we designed a scale of severity, as an initial tool to evaluate the damage produced by *P. capsici* in chayote plants grown under controlled conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT)-National Quality Graduate Program (PNPC), for funding this work.

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)- Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC), por su financiamiento para la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Babadoost M and Pavon C. 2013. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. *Plant Dis.* 97:1478-1483. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1123-RE>.
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 218 p. Disponible en línea: <http://www.apsnet.org/apsstore/shopapspress/pages/41922.aspx>
- Brown SP, Rigdon-Huss AR and Jumpponen A. 2014. Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent result on fungal community responses. *Fungal Ecology.* 9:65-68. doi:10.1016/j.funeco.2014.02.002
- Cadena-Iñiguez J, Ruiz PLM, Avendaño ACH, Cisneros VM, Soto HMR y Aguirre MJF. 2006. Origen y Biodiversidad de *Sechium edule* en el Estado de Veracruz México. Chapingo, Huatusco Veracruz, México. *Revista Centro Regional Universitario Oriente* pp. 1-16.
- Cadena-Iñiguez J y Arévalo-Galarza ML. 2008. Rescatando y Aprovechando los Recursos Fitogenéticos de Mesoamérica. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 16 p. Disponible en línea: <http://gobernanzabiodiversidad.mx/bibliotecadigital/component/content/article/50-casos-de-estudio/989-gisem-rescatando-y-aprovechando-los-recursos-fitogeneticos-de-mesoamerica-volumen-1-chayote>
- Cadena-Iñiguez J, Arrazate ACH, Soto HMR, Ruiz PLM and Aguirre MJF. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* in the state of Veracruz, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 55:835-847. DOI: 10.1007/s10722-007-9288-4
- Cadena-Iñiguez J, Soto HMR, Arévalo GML, Avendaño ACH, Aguirre MJF y Ruiz PLM. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. XVII, Edición Especial 2:45-55. Doi: [dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.17.044](http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2011.17.044)
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p
- French ER y Hebert TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. 148 p. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA), San José, Costa Rica.
- French-Monar RD, Jones JB and Roberts PD. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetables farms. *Plants Disease.* 90:345-350. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0345>
- Galleghy ME and Hong C. 2008. Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 158 p.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98. Disponible en línea: [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKewic3YOU1O3NAhVGqh4KHeokCuEQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fbrownlab.mbio.ncsu.edu%2FJWB%2Fpapers%2F1999Hall1.pdf&usq=AFQjCNEUNhUvahTBCOXpFD1PdvNFuRrQDA&sig2=OGIOP2DpO8w48wA7\\_ubq5A&bvm=bv.126130881,d.dmo&cad=rja](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKewic3YOU1O3NAhVGqh4KHeokCuEQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fbrownlab.mbio.ncsu.edu%2FJWB%2Fpapers%2F1999Hall1.pdf&usq=AFQjCNEUNhUvahTBCOXpFD1PdvNFuRrQDA&sig2=OGIOP2DpO8w48wA7_ubq5A&bvm=bv.126130881,d.dmo&cad=rja)
- Kranz J. 1988. Measuring Plant Disease. In: Kranz J and Rotem J (eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 35-50. DOI: 10.1007/978-3-642-95534-1\_4
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13(4):329-337. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Li P, Feng B, Wang H, Tooley PW and Zhang, X. 2011. Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Microbiology* 51: 61-70. DOI: 10.1002/jobm.201000317
- Lira R. 1992. Chayote (*Sechium edule*). In: Hernández Bermejo JE y León J. (Eds.). *Cultivos marginados.* FAO. Roma. pp. 77-82.
- Navarrete NR y Acosta GJ. 1999. Reacción de variedades de frijol común a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en el Altiplano de México. *Agronomía Mesoamericana* 10(1): 37-46.
- Newhook FJ, Waterhouse GM and Stamps DJ. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap.* 143. 21 p. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). *Current Genetics* 22:213-220. DOI: 10.1007/BF00351728
- Olguín, H. G. 2010. Identificación y caracterización morfológica, cultural y molecular de hongos asociados a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 118p.
- Olguín FG, Valdovinos PG, Cadena-Iñiguez J y Arévalo GML. 2013. Etiología de la marchitez de plantas de chayote (*Sechium edule*) en el Estado de Veracruz. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2:161-169. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509007>
- Ploetz R, Heine G, Haynes J and Watson M. 2002. An investigation of biological attributes that may contribute to the importance of *Phytophthora capsici* as a vegetable pathogen in Florida. *Ann Appl Biol.* 140:61-67. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2002.tb00157.x

- Rivera G, Brenes F y Gamboa W. 1992. Hoja divulgativa sobre las principales enfermedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). El Cocoro, COOPECHAYOTE R.L. 2p.
- Stamps DJ. 1985. *Phytophthora capsici*. Description of pathogenic fungi and bacteria. No. 836. 2 p. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England.
- SAS-Institute. 2002-2003. Statistical Analysis System Institute. Software Version 9.1, SAS Institute, Vary, NC, USA. DOI: 10.2307/2234420
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON) 1980-2014. SAGARPA. Consultado en agosto de 2016.
- Silva-Rojas, HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quesada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología. 27(2): 134-147. Disponible en línea: [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjL4Petmu3NAhXKsB4KHazCBnQQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci\\_arttext%26pid%3D%2F33092009000200006&usg=AFQjCNEJeKA09eSU3tD-H3MIYQ2IR-WxaoA&sig2=p4zS4arDdXNL5nhV52Cplw&bvm=bv.126130881,d.dmo](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjL4Petmu3NAhXKsB4KHazCBnQQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3D%2F33092009000200006&usg=AFQjCNEJeKA09eSU3tD-H3MIYQ2IR-WxaoA&sig2=p4zS4arDdXNL5nhV52Cplw&bvm=bv.126130881,d.dmo)
- Trujillo-Viramontes, F, Zavaleta-Mejía E, Rojas-Martínez RI, y Lara J. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). Nematropica 35:37-44. [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjL9bb98\\_nOAhUBxoMKHdVzDQAQFggBMAA&url=http%3A%2F%2Fjournals.fcla.edu%2Fnematropica%2Farticle%2Fdownload%2F69712%2F67372&usg=AFQjCNHLz2Z4ZkeOshK7YiIX8SSHFPmUXw&sig2=L\\_INCZNgD-JQhUiYt0542oQ](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewjL9bb98_nOAhUBxoMKHdVzDQAQFggBMAA&url=http%3A%2F%2Fjournals.fcla.edu%2Fnematropica%2Farticle%2Fdownload%2F69712%2F67372&usg=AFQjCNHLz2Z4ZkeOshK7YiIX8SSHFPmUXw&sig2=L_INCZNgD-JQhUiYt0542oQ)
- Uribe-Lorio L, Castro BL, Arauz CF, Henríquez HC y Blanco MM. 2014. Pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile tratadas con vermicompost. Agron. Mesoam. 25(2):243-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v25i2.15427>
- Wang H, Li F and Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification and characterization of a new pectatelyase from *Phytophthora capsici* using two different methods. BMC Biotechnology 11:32. DOI: 10.1186/1472-6750-11-32
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. Academic Press, Inc., New York. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Zhang; Z., Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology. 7:203:214. doi: 10.1089/10665270050081478

# Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*

## Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*

Hilda Guadalupe García-Núñez\*, Ángel Roberto Martínez-Campos, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Cerrillo Piedras Blancas, Carretera a Tlachaloya s/n, Toluca, Estado de México, CP 50090; María Rosa Hermosa-Prieto, Enrique Monte-Vázquez, Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Campus de Villamayor C/ Del Duero, 12; 37185 Villamayor (Salamanca), España; Carlos Jorge Aguilar-Ortigoza, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Cerrillo Piedras Blancas, Carretera Toluca-Atlacomulco, Estado de México, CP 50090, México; Carlos Ernesto González-Esquivel, Laboratorio de Agroecología, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México. \*Autor para correspondencia: g\_adlih@yahoo.com.

Recibido: 11 de mayo 2016.

Aceptado: 13 de octubre 2016.

García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR; Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ, González-Esquivel CE. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 58-79.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

**Resumen.** El presente trabajo muestra la caracterización morfológica y molecular de 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 y TJ6) y su relación

**Abstract.** This paper presents the morphological and molecular characterization of 10 native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 and TJ6) and their phylogenetic relation, as well as its biocontrol ability against *Phytophthora infestans*. The results of the molecular characterization by amplifying the ITS1-ITS4 region of nucle1 and TJ6). The phylogenetic analysis by maximum parsimony showed a close relation among the isolates of these two groups. Biocontrol tests between the antagonist and the pathogen showed significant differences ( $p < 0.05$ ). Strain TX8 had the highest inhibition percentage (98 %), while TL4 recorded the lowest percentage (49 %). The isolates of *T. harzianum* (TL5, TL6,

filogenética, así como su capacidad de biocontrol contra *Phytophthora infestans*. Los resultados de la caracterización molecular al amplificar la región ITS1-ITS4 del ADN ribosómico nuclear y un fragmento del gen *tefla* mostraron que de las 10 cepas, seis corresponden a *Trichoderma asperellum* (TL2, TL4, TX7, TX8, TT6 y TF8) y cuatro a *T. harzianum/Hypocrea lixii* (TL5, TL6, TF10 y TJ6). El análisis filogenético por máxima parsimonia demostró que existe una estrecha relación entre las cepas de estos dos grupos. Las pruebas *in vitro* de biocontrol entre el antagonista y el patógeno indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La cepa TX8 registró el mayor porcentaje (98 %) de inhibición, mientras que TL4 fue la de menor porcentaje (49 %). Las cuatro cepas de *H. lixii* (TL5, TL6, TF10 y TJ6) presentaron capacidad de inhibición media (55-66 %).

**Palabras clave:** *T. asperellum*, *H. lixii*, antagonismo, papa, *Solanum tuberosum*.

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) tiene gran importancia económica y agrícola, ya que la papa es el tercer alimento más consumido en el mundo (FAO, 2014). La producción que se cosecha en el campo mexicano representa el 0.5 % de su oferta a nivel mundial (SIAP, 2014). El municipio de Zinacantepec, Estado de México, en el año 2014 registró una producción de 17,535 t, equivalente a \$115,239.06 (SIAP, 2014). El rendimiento de este tubérculo se ve afectado por la presencia de agentes fitopatógenos, tal es el caso del oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary que causa la enfermedad conocida como “tizón tardío” (Kerroum *et al.*, 2015). Este oomiceto provoca lesiones foliares que se desarrollan de tres a siete días, lo que deriva en una epidemia (Rekanović *et al.*, 2011). En los últimos años este patógeno ha

TF10 y TJ6) showed percentages between 55-65 %.

**Key words:** *T. asperellum*, *T. harzianum*, antagonism, potato, *Solanum tuberosum*.

The potato crop (*Solanum tuberosum*) is of great economic and agricultural importance, since potato is the third most consumed food in the world (FAO, 2014). Potato production in Mexican fields contributes 0.5 % of the worldwide supply (SIAP, 2014). The municipality of Zinacantepec, State of Mexico, recorded a production of 17,535 t in 2014, equivalent to \$115,239.06 (SIAP, 2014). Potato yield is affected by the presence of phytopathogenic agents such as the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary, which causes a disease known as “late blight” or potato blight (Kerroum *et al.*, 2015). This oomycete causes leaf lesions which take from three to seven days to develop and become epidemics (Rekanović *et al.*, 2011). In recent years, this pathogen has caused significant economic losses in Zinacantepec (López *et al.*, 2013). Chemical control is the most used method; it is successfully applied to seed, leaves and soil, but has residual effects, which causes chemical products to accumulate on water bodies, soil, plants and animals (Miller *et al.*, 2000; Aceves *et al.*, 2008).

Hence, it is important to search for ecological strategies for biological control, including the use of microorganisms that help reduce the presence of pathogens (Aceves *et al.*, 2008). Some species of the *Trichoderma* genus are known to act as biocontrol agents with broad spectrum of action against pathogens of agricultural crops (Schuster y Schmoll, 2010). This genus uses mechanisms such as: competition, mycoparasitism and antibiosis (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Bailey *et*

causado grandes pérdidas económicas en Zinacantepec (López *et al.*, 2013). El control químico es el método más utilizado, se aplica a la semilla, follaje y suelo, con resultados eficientes, pero con efectos de residualidad, lo que provoca que los productos químicos se acumulen en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales (Miller *et al.*, 2000; Aceves *et al.*, 2008).

Lo anterior sugiere buscar estrategias ecológicas como el control biológico, que consiste en el uso de microorganismos que ayuden a disminuir la presencia de patógenos (Aceves *et al.*, 2008). Algunas especies del género *Trichoderma* son reconocidas como agentes de biocontrol con amplio espectro de acción hacia fitopatógenos de cultivos agrícolas (Schuster y Schmoll, 2010). Este género utiliza mecanismos de acción tales como: competencia, micoparasitismo y antibiosis (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008). Las formulaciones comerciales compuestas por varias especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride*) que se aplican en campo (Lorito *et al.*, 2010; Mazyar *et al.*, 2010) generalmente pertenecen a una región diferente a la que se aplica, lo que deriva en la ineficacia del control (Harman *et al.*, 2010). Al respecto Altieri (1999) recomienda la utilización de especies nativas adaptadas a las condiciones ecológicas de la región de aplicación para garantizar la acción exitosa de biocontrol. Sin embargo, algunas empresas requieren cepas con capacidad de biocontrol y adaptación a diferentes regiones y sobre diversos agentes patógenos (PHC, 2016).

En el control biológico es importante la evaluación del potencial antagonico *in vitro* y en planta, así como la caracterización taxonómica de los aislados, ya que esto permite conocer los requerimientos de la especie para su crecimiento y establecer criterios de selección como agente de biocontrol, debido a que no todas las especies de

*al.*, 2008). Commercial formulations containing various species of *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* and *T. atroviride*) used in the field (Lorito *et al.*, 2010; Mazyar *et al.*, 2010) usually belong to a different region than that where they are applied, which results in ineffective control (Harman *et al.*, 2010). To this regard, Altieri (1999) recommends the use of native species adapted to the ecological conditions of the region where the control is carried out to ensure a successful biocontrol. However, some companies require isolates with biocontrol ability and adaptation to different regions and against diverse pathogenic agents (PHC, 2016).

In the biological control, it is important to assess the antagonistic potential of the isolates *in vitro* and in plants and carry out a taxonomic characterization, in order to find out what the requirements are for the species to grow and, based on this information, establish a selection criteria to use them as a biocontrol agents, since not all the species of *Trichoderma* have such ability (Munir *et al.*, 2013). Conventional characterization of *Trichoderma* species based on morphological characteristics is not enough due to the plasticity of their traits, so it is important to conduct molecular studies to make a more accurate taxonomical diagnosis (Hermosa *et al.*, 2000). Phylogenetic analyses are a tool that supports and validates molecular studies through evolutionary evidence that can reveal convergent or divergent relations among species (Morrone, 2001).

In previous studies (García-Núñez *et al.*, 2012), 10 native isolates of *Trichoderma* from horticultural soils of the Toluca Valley, Mexico—some of them used in *in vitro* antagonism tests— showed high potential for the control of *Sclerotinia* sp., the causing agent of lettuce soft rot. The isolates were not identified at molecular level, so it is important to know to which species they belong to, as well as their potential biocontrol effect on other pathogens.



*Trichoderma* tienen esta capacidad (Munir *et al.*, 2013). La caracterización convencional de las especies de *Trichoderma* basada en características morfológicas no es suficiente, debido a la plasticidad de caracteres, por lo que es importante realizar estudios moleculares para tener un diagnóstico con mayor certeza taxonómica (Hermosa *et al.*, 2000). Los análisis filogenéticos son una herramienta que apoya y valida los estudios moleculares, mediante la evidencia evolutiva que puede demostrar relaciones convergentes o divergentes entre especies (Morrone, 2001).

En estudios previos a este trabajo (García-Núñez *et al.*, 2012), se aislaron 10 cepas nativas de *Trichoderma* de suelos hortícolas del Valle de Toluca, México, algunas de las cuales en pruebas de antagonismo *in vitro* mostraron alto potencial para el control de *Sclerotinia* sp., agente causal de la pudrición blanda en lechuga. Las cepas no se identificaron a nivel molecular, por lo que es importante conocer a que especie pertenecen, así como su posible efecto de biocontrol sobre otros patógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que cepas de *Trichoderma asperellum* son antagonistas de hongos y oomicetos fitopatógenos (Taghdi *et al.*, 2015). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante técnicas convencionales, moleculares y filogenéticas 10 cepas nativas de *Trichoderma*, así como evaluar su potencial de biocontrol contra *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío en cultivo de papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de estudio y origen de las cepas

Las 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 y TJ6) utilizadas para este estudio fueron aisladas en un

For example, it has been shown that isolates of *Trichoderma asperellum* are fungi antagonists and phytopathogenic oomycetes (Taghdi *et al.*, 2015). For this reason, the present study was aimed to characterize 10 native isolates of *Trichoderma* using conventional, molecular and phylogenetic techniques, and assess their biocontrol potential against *Phytophthora infestans*, the causing agent of late blight in potato crops.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Study area and origin of the isolates

The 10 native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 and TJ6) used in this research were isolated in a previous study (García-Núñez *et al.*, 2012). The isolation points are located in areas of the Toluca Valley horticultural zone (Table 1).

One strain of *Phytophthora infestans* was isolated from a potato crop plot in La Peñuela, a location from the municipality of Zinacantepec, State of Mexico. For this purpose, leaves with late blight signs and symptoms were selected; that is, necrotic stalk and petioles tissue showing dark spots, as well as the presence of white mycelium with gray sporulation on the backside of leaves. The sample was placed on wet paper and taken to the lab, where it was placed on sterilized filter paper and then on Petri dishes with wet cotton to create wet chambers, which were then maintained at room temperature during seven days to foster the presence of mycelium and sporulation. When there was enough mycelium, an evaluation was performed using Sutton's (1980) technique, described as follows: an active sporulated mycelium was taken with an inoculation loop and put in a Petri dish using a Potato Dextrose Agar (PDA, Bioxon) culture

trabajo previo (García-Núñez *et al.*, 2012). Los puntos de aislamiento se ubican en localidades de la zona hortícola del Valle de Toluca (Cuadro 1).

Se aisló una cepa de *Phytophthora infestans* de una parcela de cultivo de papa de La Peñuela, localidad del municipio de Zinacantepec, Estado de México. Se seleccionaron follajes con signos y síntomas de tizón tardío, es decir tejido de tallos y peciolos con necrosis, con apariencia de manchas oscuras y en el envés de las hojas presencia de un halo de micelio blanco con esporulación color gris. La muestra fue colocada en papel húmedo y se trasladó al laboratorio, donde fue colocada en papel filtro esterilizado y después en placas Petri con algodón húmedo, generando así cámaras húmedas que se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días para propiciar la presencia de micelio y esporulación del patógeno. Cuando se obtuvo micelio suficiente se procedió siguiendo la técnica de Sutton (1980), tal como se describe a continuación: se tomó una muestra de micelio activo esporulado con una asa bacteriológica y se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Bioxon). Se incubó a 22±2 °C por 12 días, posteriormente de estas muestras se obtuvo un aislamiento monospórico mediante la técnica de punta de hifa para obtener una cepa pura. A partir de la cepa pura de *P. infestans* se realizaron las pruebas de los postulados de Koch para validar su patogénesis.

Las cepas se encuentran resguardadas en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), de la Universidad Autónoma del Estado de México.

### Caracterización morfológica macroscópica de las cepas

Una vez obtenidas las cepas puras de *Trichoderma* y de *P. infestans* se realizó su caracterización

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de aislados de *Trichoderma* en la zona hortícola del Valle de Toluca.

**Table 1.** Geographic location of the isolates of *Trichoderma* in the horticultural zone of the Toluca Valley.

| Localidad            | Coordenadas        | Cepa |
|----------------------|--------------------|------|
| Sta. Ma. Xajalpa     | 14Q0443334/2114038 | TX7  |
| Sta. Ma. Xajalpa     | 14Q0443347/2116334 | TX8  |
| San Juan la Isla     | 14Q0442109/2115420 | TJ6  |
| Sn Francisco Putla   | 14Q0434242/2114300 | TF8  |
| Sn Francisco Putla   | 14Q0432918/2116404 | TF10 |
| Sn Francisco Tetetla | 14Q0435475/2114358 | TL2  |
| Sn Francisco Tetetla | 14Q0436273/2114681 | TL4  |
| Sn Francisco Tetetla | 14Q0435875/2114606 | TL5  |
| Sn Francisco Tetetla | 14Q0436993/2113877 | TL6  |

medium. The mycelium was incubated at 22±2°C during 12 days. From this sample, a monosporic isolate was obtained applying the tip-of-hyphae technique. Using the pure strain of *P. infestans*, tests using Koch's postulates were conducted to validate its pathogenesis.

The isolates are safeguarded at the Institute of Agricultural and Rural Sciences (ICAR) of the Autonomous University of the State of Mexico.

### Macroscopic morphological characterization of isolates

After obtaining pure isolates of *Trichoderma* and *P. infestans*, they were morphologically characterized. Isolates of *Trichoderma* were identified using the guide by Barnett and Hunter (1972), considering the following macroscopic morphological characteristics: mycelium texture, concentric rings development and conidia pigmentation. The strain of *P. infestans* was characterized using the guide of Erwin and Robeiros (1996) and considering mycelium texture and type, as well as spore pigmentation.

morfológica. Las cepas de *Trichoderma* se identificaron siguiendo la guía de Barnett y Hunter (1972), considerando características morfológicas macroscópicas como: textura del micelio, formación de anillos concéntricos y la pigmentación de las conidias. La cepa de *P. infestans* se caracterizó a través de la guía de Erwin y Robeiro (1996), considerando la textura, tipo de micelio y la pigmentación de las esporas.

### Caracterización morfológica microscópica

Para cada cepa se hicieron cámaras de cultivo en placas Petri de acuerdo con el método modificado de Harris (1986) como se describe a continuación: se colocó un triángulo de vidrio que contenía un porta objetos con un disco de medio PDA (Bioxon) de 15mm de diámetro, en el que se inoculó una asada de esporas de la cepa de *Trichoderma*. Se cubrió la muestra con un cubreobjetos, se cerró la caja Petri y se incubó a 25 °C por siete días. Posteriormente se retiró el cubreobjetos que contenía micelio activo y esporas del aislado y se colocó sobre un portaobjetos, se tiñó con una gota de azul de algodón. Se realizaron observaciones en microscopio óptico (Image Motic Plus 2.0) acoplado a una cámara digital. Las imágenes se capturaron bajo el objetivo de 100X usando aceite de inmersión. Para *Trichoderma* la descripción se realizó de acuerdo a las siguientes características: forma y número de conidias, fialides, y conidióforos, para lo cual se utilizó la guía de identificación de Barnett y Hunter (1972). Para *P. infestans* las características morfológicas que se tomaron en cuenta fueron: tipo de hifa; forma y tamaño de esporangios; tipo de papila y presencia o ausencia de clamidosporas, según lo recomendado para Oomycetes (Erwin y Robeiro, 1996).

### Microscopic morphological characterization

Culture chambers in Petri dishes were built for each strain, according to the modified method by Harris (1986) as follows: a glass triangle containing a slide with a 15 mm in diameter PDA medium disk (Bioxon) was used to inoculate a spore loop of the strain of *Trichoderma*. The sample was covered with a slide, and the Petri dish was capped and incubated at 25 °C during seven days. Then, the slide containing the active mycelium and isolate spores were removed and placed on a slide; the slide was stained with a drop of cotton blue. Observations were made under an optical microscope (Image Motic Plus 2.0) connected to a digital camera. The images were captured under a target of 100X using immersion oil. For *Trichoderma*, the description was based on the following characteristics: shape and number of conidia, phialides and conidiophores; this was performed according to the Barnett and Hunter (1972) identification guide. For *P. infestans*, the morphological characteristics taken into account were: hyphae type; sporangia shape and size; type of papilla or absence of chlamydospores, according to recommendations for oomycetes (Erwin and Robeiro, 1996).

### Molecular characterization of *Trichoderma*

Obtaining mycelium. Petri dishes with a PDA (Bioxon) culture medium and a 76 mm in diameter sterilized cellulose circular membrane (Sigma) were inoculated with 100 µL of a  $1 \times 10^8$  spore suspension per mL of each strain. The dishes were incubated at 25 °C during three days. The mycelium recovered from the membrane by scratching with a scratcher under sterility conditions was frozen and

### Caracterización molecular de *Trichoderma*

Obtención del micelio. Cajas petri con medio de cultivo PDA (Bioxon) y una membrana circular de celulosa de 76 mm de diámetro (Sigma) esterilizada se inocularon con 100 µL de una suspensión de  $1 \times 10^8$  esporas por mL de cada una de las cepas. Las placas se incubaron a 25 °C por tres días. El micelio se recuperó de la membrana por raspado con una espátula en condiciones de esterilidad, se congeló y liofilizó. La extracción de ADN genómico del hongo se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hermosa *et al.* (2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificó la región ITS1-ITS4, zona del ADN ribosómico nuclear como se describe a continuación: se utilizaron los primers comerciales ITS1f (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4r(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') comprobados por Hermosa *et al.* (2012), esperando una amplificación de 600 pb. Se preparó cada reacción con un volumen final de 50 µL que contenía 5 µL de Buffer + MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.3 µL dNTPs (2 mM/µL), 2 µL de primer (10 µM), 1 µL de Taq polimerasa (5U); 1.5 µL de DNA genómico; 38.2 µL de agua miliQ. La reacción se corrió en un termociclador (MJ Research, Inc.) bajo el siguiente programa: Primera etapa, desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min. Segunda etapa, 35 ciclos cada uno comenzando con desnaturalización a 94 °C por 1 min, seguido por alineación a 53 °C por 1 min con 30 s, y extensión a 72 °C por 2 min. Tercera etapa, extensión final a 72 °C por 7 min. El producto se mantuvo a 4 °C. Los fragmentos de DNA productos de la amplificación (3 µL) mezclado con 2 µL de buffer de carga, fueron separados en gel de agarosa (0.8 %) mezclado con 3 µL de bromuro de etidio. Se utilizaron 5 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (Gene ruler, Thermo Scientific). Las condiciones de corrida de la cámara de

lyophilized. The extraction of genomic DNA of the fungi was performed according to the technique described by Hermosa *et al.* (2000).

Polymerase chain reaction (PCR). The ITS1-ITS4 region, nuclear ribosomal DNA zone, was amplified as follows: the commercial primers ITS1f (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4r (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), with which an amplification of 600 bp was expected. Each reaction was prepared with a final volume of 50 µL containing 5 µL of Buffer + MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.3 µL dNTPs (2 mM/µL), 2 µL of primer (10 µM), 1 µL of Taq polymerase (5U); 1.5 µL of genomic ADN; 38.2 µL of miliQ of water. The reaction was conducted in a thermocycler (MJ Research, Inc.) under the following program: first stage: initial denaturation at 94 °C during 3 min; second stage; 35 cycles each, starting with denaturation at 94 °C for 1 min, followed by alignment at 53 °C for 1 min 30 s, and extension to 72 °C for 2 min; third stage: final extension to 72 °C for 7 min. The product was kept at 4 °C. The DNA fragments obtained from the amplification (3 µL), mixed with 2 µL of charge buffer, were isolated in a mixture of agarose gel (0.8 %) and 3 µL of ethidium bromide. At this stage, five µL of molecular weight marker of 100 bp (Gene ruler, Thermo Scientific) were used. Running conditions for the electrophoresis camera were 81 volts during 30 min. The DNA fragments were observed using a UV light photo documenter.

The PCR fragments obtained were purified according to the gel extraction (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel) clean-up kit protocol. The DNA quality and concentration was evaluated in a Nanodrop. The DNA bands were observed in 1 % agarose gel. The same procedure was followed to amplify a fragment of the *translation elongation factor 1 alpha (tef1a)* gen with the primers EF1278f 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' (Chaverri and Samuels, 2003) and TEF1LLer

electroforesis fueron 81 volts por 30 min. Los fragmentos de ADN fueron visualizados con un fotodocumentador de luz ultravioleta.

Los fragmentos producto de PCR se purificaron siguiendo el protocolo del kit clean-up, gel extracción (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel). Se evaluó la calidad y concentración del ADN en un Nanodrop. Se visualizaron las bandas de ADN en un gel de agarosa al 1 %. Este mismo procedimiento se realizó para amplificar un fragmento del gen *translation elongation factor 1 alpha (tef1a)* con el par de primers EF1278f 5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3' (Chaverri y Samuels, 2003) y TEFILLer 5'-AACTTGCA-GGCAATGTGG-3' (Jaklistch *et al.*, 2005). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C 30 s, alineación 58 °C por 1 min, extensión 72 °C 1 min, extensión final de 72 °C por 7 min.

Preparación de las muestras para secuenciación. Se colocaron en tubos eppendorf 3 µl de producto de PCR purificado (50 ngµL<sup>-1</sup>), 3 µL de primer (1µM) y 2 µl de agua miliQ. Las muestras se enviaron al Departamento de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, España.

Análisis de secuencias en bases de datos genómicos. Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas FinchTV versión 4.1 y DNASTAR para obtener las secuencias consenso. Posteriormente se realizó el análisis de alineamiento BLAST en la base de datos Genbank.

Análisis filogenéticos. Con la finalidad de conocer la relación filogenética de las cepas se utilizaron como grupos externos a *Trichoderma viride* y *Trichoderma longibrachiatum* (Mohammad *et al.*, 2014). Se alinearon ambas secuencias mediante el programa BioEdit Sequence Alignment ver. 7.05 (Hall, 2004) y las relaciones filogenéticas se realizaron mediante el programa Past ver.207 (Harmer

5'-AACTTGCAAGGCAATGTGG-3' (Jaklistch *et al.*, 2005). The amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 3 min, 35 denaturation cycles at 94 °C 30 s, alignment at 58°C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, final extension at 72 °C for 7 min.

Sample preparation for sequencing. Eppendorf tubes with 3 µl of purified PCR product (50 ngµL<sup>-1</sup>), 3 µL of primer (1µM) and 2 µl of miliQ water. The samples were sent to the Sequencing Department of the University of Salamanca, Spain.

Sequences analysis in genomic databases. The sequences obtained were analyzed using FinchTV version 4.1 and DNASTAR in order to obtain consensus sequences. Then, a BLAST alignment analysis in the Genbank database was performed.

Phylogenetic analysis. To identify the phylogenetic relation of the isolates, external groups to *Trichoderma viride* and *Trichoderma longibrachiatum* (Mohammad *et al.*, 2014) were used. Both sequences were aligned using BioEdit Sequence Alignment ver. 7.05 (Hall, 2004); the phylogenetic relations were established using the heuristic method in the parsimony analysis with the program Past version 207 (Harmer *et al.*, 2001). The robustness of the internal branches was assessed with 1000 bootstrap replications.

### Antagonism tests

*In vitro* confrontation tests were performed on 10 native isolates of *Trichoderma* and *Phytophthora infestans*, using a modified version of the method of Larralde *et al.*, (2008), as follows: on Petri dishes containing PDA, antagonists and pathogens were confronted by placing a 5 mm diameter circle of active mycelium in face to face on each dish, separated by approximately 5 cm; they were incubated at 25±2 °C for seven days. This test was carried out in batch (in triplicate) using three

*et al.*, 2001). Se obtuvo el análisis cladístico de parsimonia, mediante un Bootstrap Heuristic.

### Pruebas de antagonismo

Se realizaron pruebas de confrontación *in vitro* entre las 10 cepas nativas de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans*, por el método modificado de Larralde *et al.*, (2008), como se describe a continuación: en cajas Petri con PDA se confrontaron antagonistas contra patógenos, colocando frente a frente un disco de 5 mm de diámetro de micelio activo de cada uno de ellos, separados 5 cm aproximadamente, se incubaron a  $25\pm 2$  °C por siete días. Este ensayo se hizo por triplicado, con tres repeticiones de cada cepa de *Trichoderma*. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial fue monitoreado cada 24 h, usando la siguiente fórmula:  $PIRG = [(R1 - R2) / R1] \times 100$ , donde R1 es el crecimiento radial del control no confrontado con la cepa de *P. infestans* y R2 es el crecimiento radial del crecimiento de *Trichoderma* confrontado con *P. infestans*. Las pruebas de confrontación se realizaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar, para cada una de las 10 cepas nativas de *Trichoderma* que se enfrentaron contra *P. infestans*. El potencial de cada cepa de *Trichoderma* como agente de biocontrol para la infección por *P. infestans* se evaluó mediante análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ), utilizando el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Caracterización morfológica macroscópica de *Trichoderma* y *P. infestans*

Con excepción de la cepa TF10, las cepas nativas de *Trichoderma* presentaron micelio de

repetitions of each strain of *Trichoderma*. The inhibition percentage of their radial growth was monitored every 24 hours using the following formula:  $PIRG = [(R1 - R2) / R1] \times 100$ , where R1 is the radial growth of the non-confronted strain of *P. infestans*, and R2 is the radial growth of *Trichoderma* confronted against *P. infestans*. Confrontation test were performed according to a randomized experimental design for each of the 10 native isolates of *Trichoderma* confronted against *P. infestans*. The potential of each strain of *Trichoderma* as a biocontrol agent of *P. infestans* infection was evaluated by variance analysis and multiple media comparison (Tukey,  $p \leq 0.05$ ), using the Statistical Analysis System (SAS) software version 9.

## RESULTS AND DISCUSION

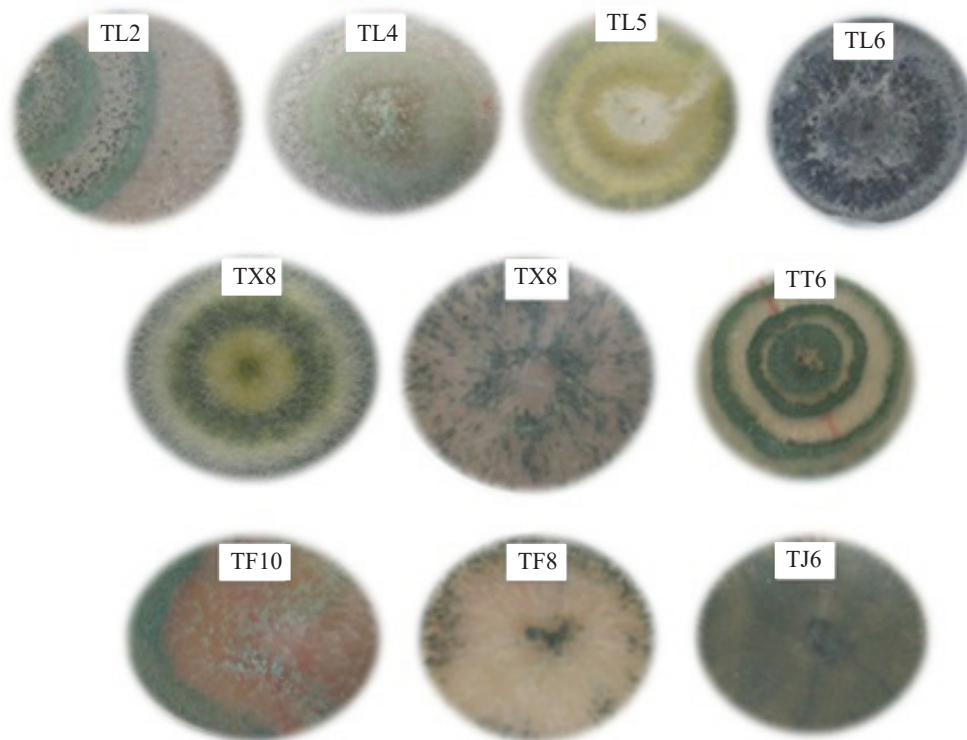
### Macroscopic morphological characterization of *Trichoderma* and *P. infestans*

Except for strain TF10, the native isolates of *Trichoderma* developed abundant fluffy mycelium (Figure 1). Isolates TL2, TL4, TX8 y TT6 developed from two to three well defined concentric white (mycelium) and green (conidia) rings. Strain TL5 developed yellow pigmentation and concentric rings. Meanwhile, no rings were observed in isolates TX7, TF10, TL6 TF8 y TJ6, and the mycelium spread evenly on the dishes. Conidial pigmentation of isolates ranged from light green to dark green. Although the isolates came from the same location, they developed different pigmentation, as in the case of those from San Francisco Tetetla, where TL2, TL4, TL5 and TL6 developed green pigmentation with different tones. The shape and quantity of conidia observed on the dishes may have been caused by factors contributing to a stress environment, such

consistencia esponjosa abundante (Figura 1). Las cepas TL2, TL4, TX8 y TT6 presentaron de dos a tres anillos concéntricos bien definidos, blancos (micelio) y verdes (conidias). La cepa TL5 presentó pigmentación amarilla y anillos concéntricos. Mientras tanto, en TX7, TF10, TL6 TF8 y TJ6 no se observaron los anillos y el micelio se extendió de manera homogénea en las placas. La pigmentación conidial de las cepas fue desde una tonalidad verde claro a verde oscuro. Aunque las cepas son de la misma localidad presentaron pigmentación diferente, tal es el caso de San Francisco Tetetla donde TL2, TL4, TL5 y TL6 tuvieron pigmentación verde

as: light exposure, lack of nutrients or pH changes (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). The shape and pigmentation of the mycelium observed in the native isolates are related to the *Trichoderma* genus, according to Barnett and Hunter (1972) taxonomic identification criteria. These characteristics differ among native isolates and none of them resembles each other; for this reason, it was difficult to group them and identify the species based on these data.

The strain of *P. infestans* developed abundant white fluffy mycelium with beige tones caused by the presence of sporangia. No concentric ring development was observed (Figure 2).



**Figura 1.** Colonias de las 10 cepas nativas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA.  
**Figure 1.** Cultures from the 10 native strains of *Trichoderma* spp. on PDA medium.

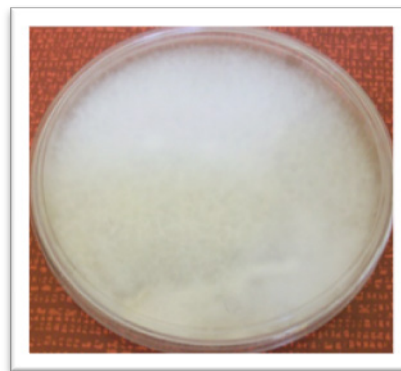
con diferentes tonalidades. La forma y cantidad de la conidiación observada en las placas, puede ser estimulada por factores que propician un ambiente de estrés, como son: la exposición a la luz, la falta de nutrientes o cambios en pH (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). La forma y la pigmentación del micelio observado en las cepas nativas corresponden al género *Trichoderma* de acuerdo a los criterios de identificación taxonómica de Barnett y Hunter (1972). Estas características difieren entre las cepas nativas y ninguna se parece entre sí, por esta razón es difícil agruparlas y definir especies a partir de estos datos (Gupta *et al.*, 2013).

La cepa de *P. infestans* mostró micelio blanco de consistencia esponjosa abundante y con una tonalidad ligeramente beige por la presencia de los esporangios. No se apreció formación de anillos concéntricos (Figura 2).

#### Caracterización morfológica microscópica de *Trichoderma* y *P. infestans*

Para *P. infestans* se observaron hifas hialinas y ramificadas con diámetro 5-8  $\mu\text{m}$ , esporangióforos alargados con pedicelo de 5  $\mu\text{m}$  y esporangios elipsoidales ( $28.2 \pm 11 \times 17.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ) con papilas caducas (Figura 3). Estos resultados se apegan a las características que reportan Erwin y Robeiro (1996) para *P. infestans*. También coinciden con la descripción de los aislados de *P. infestans* reportados por López-Orona *et al.* (2013).

Los resultados de las observaciones microscópicas de *Trichoderma* mostraron que las cepas TF8, TX7, TX8, TT6 y TL2 presentaron conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos de 4 a 6, clamidosporas abundantes y globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en grupos de 3 a 4, ornamentación finamente espinosa y conidióforos ramificados (Figura 4). Estas características coinciden con los estudios reportados por

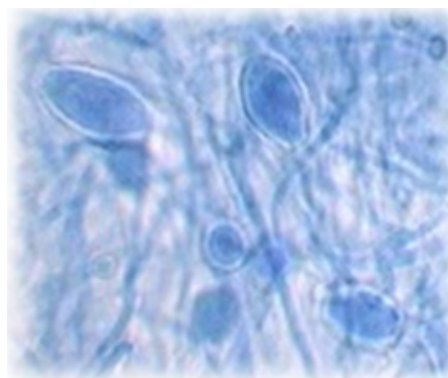


**Figura 2.** Aspecto de la colonia de la cepa de *P. infestans* en medio de cultivo PDA.

**Figure 2.** Mycelium of *P. infestans* grown on PDA culture medium.

#### Microscopic morphological characterization of *Trichoderma* and *P. infestans*

*P. infestans* showed 5-8  $\mu\text{m}$  in diameter hyaline and ramified hyphae, long sporangiospores with 5  $\mu\text{m}$  pedicel, and ellipsoidal sporangia ( $28.2 \pm 11 \times 17.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ) with aged papillae (Figure 3). These results are in agreement with the characteristics reported by Erwin and Robeiro (1996) for *P. infestans*. They also agree with the description of *P. infestans* isolates reported by López-Orona *et al.* (2013).



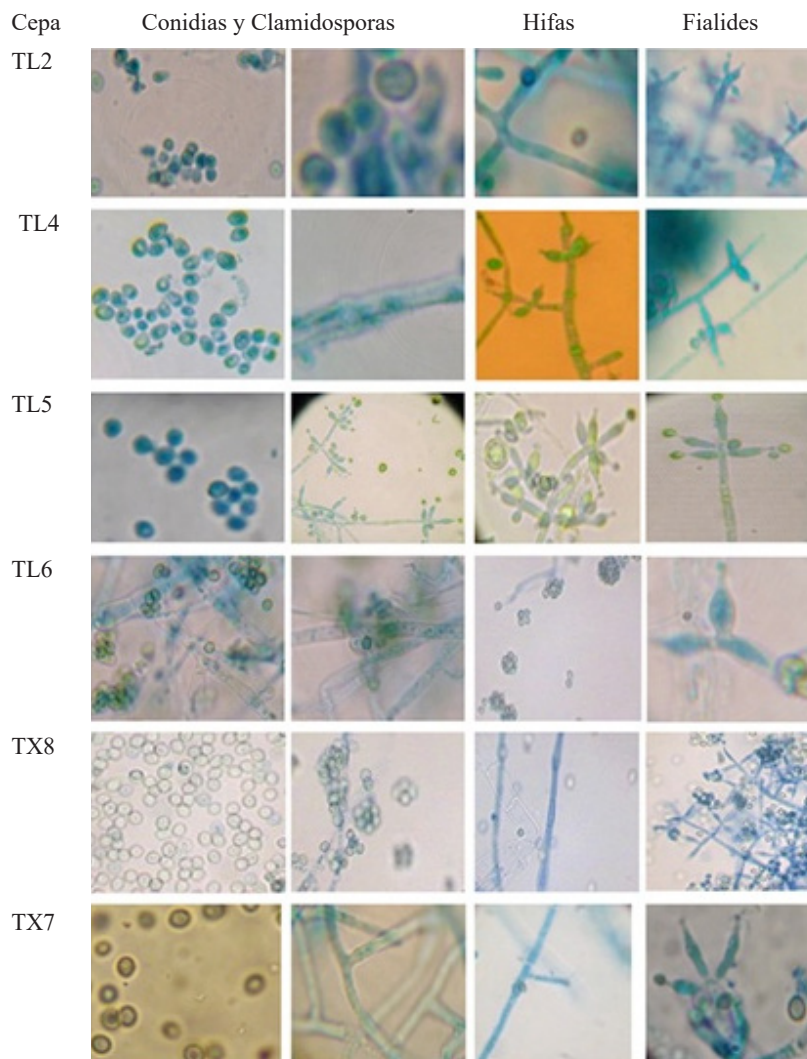
**Figura 3.** Esporangios elipsoidales de *P. infestans*.

**Figure 3.** Ellipsoidal sporangia of *P. infestans*.



Samuels *et al.*, (2010). La cepa TL4 presentó conidias ovoides y fialides en par o triadas a lo largo del conidióforo, más anchas en el centro que en la base, características que permiten clasificarla como *T. asperelloides*. Las cepas TL5, TL6, TF10, TJ6 presentaron hifas hialinas, conidióforos largos con ramificación, fialides anchas por el centro y alargadas en la base agrupadas piramidalmente, conidias globosas de pared lisa y abundantes clamidosporas

The results from microscopic observations of *Trichoderma* showed that TF8, TX7, TX8, TT6 and TL2 developed slightly ovoid conidia arranged in rosette-like clusters of 4-6, abundant and spherical chlamydospores, apical phialides arranged in the form of transverse whorls in groups of 3-4, fine thorny ornamentation and ramified conidiophores (Figure 4). These characteristics are in agreement with those reported by Samuels



**Figura 4.** Características microscópicas de las cepas nativas de *Trichoderma* a 100X.  
**Figure 4.** Microscopic characteristics of native isolates of *Trichoderma* at 100X.

terminales, características que revelan un acercamiento a *Hypocrea* (Chaverri y Samuels, 2002; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ortiz-García *et al.*, 2015). Debido a que las características morfológicas macroscópicas y microscópicas son variables, no permiten discriminar entre especies, lo cual muestra la importancia de la caracterización molecular para clasificar taxonómicamente a las cepas, ya que un diagnóstico a nivel de especie basado en caracteres morfológicos puede derivar en un diagnóstico erróneo, tal como sucedió en los estudios realizados por Hermosa *et al.*, (2000) quienes realizaron la caracterización molecular de cepas de una colección que habían sido clasificadas morfológicamente como *T. longibranchiatum*; encontrando que se trataba de *T. asperellum*.

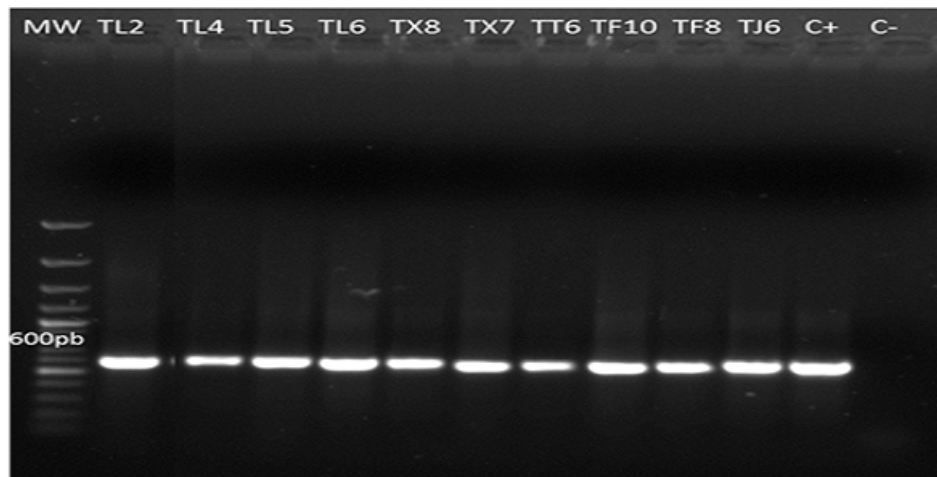
### Caracterización molecular

La amplificación del ADN genómico de las cepas con los primers ITS1 y ITS4 fue de 600 pb, observándose bandas bien definidas (Figura 5). La amplificación del ADN genómico de los aislados con el par de primers tef1 278f y tef1ller fue de 1200 pb (Figura 6). Los resultados obtenidos del GenBank mediante el análisis Blast de las secuencias amplificadas de los dos pares de primers, mostró que de las 10 cepas, seis (TL2, TL4, TF8, TT6, TX7 y TX8) tienen una identidad del 99 % con *T. asperellum*. Las cuatro cepas restantes (TJ6, TL5, TL6 y TF10) presentaron una identidad del 99 % con *Hypocrea lixii*, el teleomorfo de *T. harzianum* (Cuadro 2). Por la variabilidad de los ITS a veces es difícil discriminar entre especies, por lo que se amplificó un fragmento del gen tef1 $\alpha$ , lo cual ayudó a corroborar la taxonomía de los aislados nativos. Esto coincide con lo reportado por Druzhinina y Kubicek (2005) y Kredics *et al.* (2014), quienes indican que estos marcadores son básicos para la caracterización de *Trichoderma/Hypocrea*. Así

*et al.*, (2010). Strain TL4 developed ovoid conidia and phialides in pairs or groups of three all along the conidiophore that were wider at the center than at the base; based on these characteristics, it can be classified as *T. asperelloides*. Isolates TL5, TL6, TF10 and TJ6 showed hyaline hyphae, long ramified conidiophores, phialides wide at the center, long at the base and grouped in a pyramid, smooth-walled globose conidia and many terminal chlamydospores; these characteristics show a similarity to *Hypocrea* (Chaverri and Samuels, 2002; Druzhinina y Kubicek, 2005; Ortiz-García *et al.*, 2015). Since the macroscopic morphological characteristics vary, they do not allow discriminating among species, which highlights the importance of the molecular characterization to taxonomically classify the isolates, given that a diagnosis at the species level based on morphological traits may result in a wrong diagnosis, as in the studies conducted by Hermosa *et al.*, (2000), who performed molecular characterization of isolates from a collection that had been morphologically classified as *T. longibranchiatum* but that was actually *T. asperellum*.

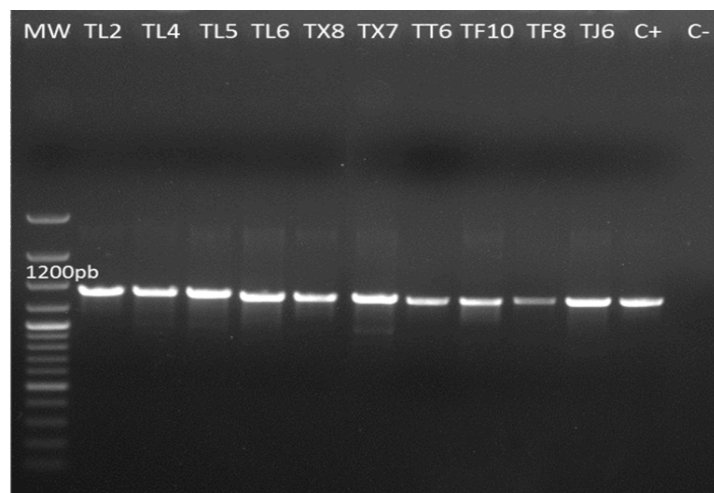
### Molecular characterization

The genomic DNA amplification of the isolates using primers ITS1 and ITS4 was of 600 bp (Figure 5). The genomic DNA amplification of isolates with the primers pair tef1 278f and tef1ller was 1200 bp (Figure 6). The results from GenBank through a BLAST analysis of the amplified sequences of the two primer pairs showed that from the 10 isolates, six (TL2, TL4, TF8, TT6, TX7 y TX8) were 99 % identical to *T. asperellum*. The other four isolates (TJ6, TL5, TL6 y TF10) were 99 % identical to *T. harzianum* a anamorph of *Hypocrea lixii* (Table 2). Due to the ITS variability, it is sometimes difficult to discriminate among species, so a fragment of the



**Figura 5.** Productos de amplificación de PCR a partir de ADN genómico de 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 y TJ6) a 600pb con los primers ITS1, ITS4. MW= marcador de peso molecular (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+= Control positivo (*T. asperellum*). C- = Control negativo. Gel de agarosa al 0.8 %.

**Figure 5.** PCR amplification products from genomic DNA of 10 native strains of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 and TJ6) at 600bp with primers ITS1, ITS4. MW= molecular weight marker (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+ = Positive control (*T. asperellum*). C- = Negative control. 0.8 % agarose gel.



**Figura 6.** Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de los aislados nativos de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 y TJ6) a 1200pb con los primers, tef1 $\alpha$  278f y tef11er. MW= marcador de peso molecular (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+= Control positivo (*T. asperellum*). C- = Control negativo. Gel de agarosa al 0.8 %.

**Figure 6.** PCR amplification products from genomic DNA of native isolates of *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX8, TX7, TT6, TF10, TF8 and TJ6) at 1200bp with primers tef1 $\alpha$  278f and tef11er. MW= molecular weight marker (Gene ruler 100bp plus DNA ladder Thermo Scientific). C+ = Positive control (*T. asperellum*). C- = Negative control. 0.8 % agarose gel.

**Cuadro 2.** Especies de *Trichoderma/Hypocrea* presentes en la zona hortícola del Valle de Toluca, México, identificadas mediante la amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS) y un fragmento del gen translation elongation factor 1 alpha (*tef1α*).

**Table 2.** *Trichoderma/Hypocrea* species found in the Toluca Valley, Mexico, horticultural zone, identified through amplification of internal transcribed spacers (ITS) and a fragment of the gen translation elongation factor 1 alpha (*tef1α*).

| Cepa | Identificación molecular ITS1-ITS4 | Identidad (%) | Cepa de referencia Genbank | TEF1α                | Identidad (%) | Cepa de referencia Genbank |
|------|------------------------------------|---------------|----------------------------|----------------------|---------------|----------------------------|
| TX7  | <i>T.asperellum</i>                | 97            | LC002589                   | <i>T. asperellum</i> | 99            | FJ436181                   |
| TX8  | <i>T.asperellum</i>                | 99            | KP721591                   | <i>T.asperellum</i>  | 99            | KP009011                   |
| TJ6  | <i>H. lixii</i>                    | 99            | AY605733                   | <i>H. lixii</i>      | 99            | FJ179573                   |
| TT6  | <i>T.asperellum</i>                | 99            | KP883284                   | <i>T. asperellum</i> | 99            | FJ179573                   |
| TL2  | <i>T.asperellum</i>                | 99            | LN846676                   | <i>T.asperellum</i>  | 99            | FJ436181                   |
| TL4  | <i>T.asperellum</i>                | 99            | KC859434                   | <i>T.asperellum</i>  | 99            | KP009011                   |
| TL5  | <i>H. lixii</i>                    | 99            | AY605752                   | <i>H. lixii</i>      | 99            | FJ179573                   |
| TL6  | <i>H. lixii</i>                    | 99            | FR872742                   | <i>H. lixii</i>      | 99            | KF923284                   |
| TF8  | <i>T.asperellum</i>                | 99            | KC8594341                  | <i>T.asperellum</i>  | 99            | KP009011                   |
| TF10 | <i>H. lixii</i>                    | 99            | FJ860767                   | <i>H. lixii</i>      | 98            | KPO08786                   |

mismo, los estudios de Ortiz-García *et al.* (2015) demuestran que las secuencias ITS permiten identificar exitosamente aislados de *Trichoderma/Hypocrea*.

Los resultados obtenidos indican que las cepas TL2, TF8, TT6, TX7 y TX8 identificadas por caracteres morfológicos como *T. asperellum* efectivamente pertenecen a esta especie. La cepa TL4, que inicialmente fue clasificada como *T. asperelloides*, fue reclasificada con base en los estudios moleculares como *T. asperellum*. De esta manera queda demostrado que la identificación molecular respalda la descripción morfológica y estos elementos permiten tener un diagnóstico taxonómico acertado y confiable. Por otra parte, estos resultados coinciden con los estudios de Guigón *et al.*, (2010), quienes reportan la presencia de cepas de *T. asperellum* en cultivos hortícolas. La cepas TJ6, TL5, TL6 y TF10 que inicialmente fueron clasificadas como *Hypocrea*, fueron ubicadas taxonómicamente a partir de los análisis moleculares como *H. lixii*.

Los resultados obtenidos de la caracterización de las cepas nativas de la zona hortícola del Valle

*tef1α* gen was amplified, as this helped to confirm the taxonomy of the native isolates. This result agree with the findings reported by Druzhinina and Kubicek (2005), and Kredics *et al.* (2014), who stated that these markers are essential to characterize *Trichoderma/Hypocrea*. Also, studies conducted by Ortiz-García *et al.* (2015) show that ITS sequences are useful to successfully identify *Trichoderma/Hypocrea* isolates.

The results obtained show that TL2, TF8, TT6, TX7 and TX8 identified by morphological traits as *T. asperellum* actually belong to this species. Strain TL4, which was initially classified as *T. asperelloides*, was reclassified as *T. asperellum* based on molecular studies. These results show that the molecular identification supports the morphological description and that these elements lead to an accurate and reliable taxonomic diagnosis. On the other hand, these results are similar to those obtained by Guigón *et al.*, (2010), who reported the presence of isolates of *T. asperellum* in horticultural crops. Isolates TJ6, TL5, TL6 y TF10, which were initially classified as *Hypocrea/Trichoderma*, were

de Toluca, son significativos, ya que *H. lixii* y *T. asperellum* son especies que no se habían reportado para esta región y son de uso importante como agentes de control biológico en cultivos hortícolas (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Hermosa *et al.*, 2012).

### Análisis filogenético

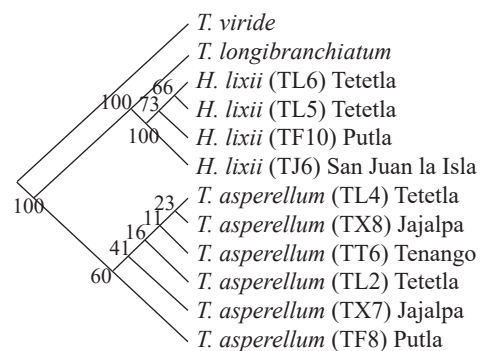
El análisis se realizó de manera heurística y se obtuvieron 82 árboles filogenéticos igualmente parsimoniosos, con índice de consistencia de 0.97 y reescalado de 0.99, lo cual indica que están bien soportados (Figura 7). El estadístico bootstrap para el soporte de las ramas se obtuvo con 100 repeticiones y se consideraron valores de 60 y 100 % como indicadores de ramas estadísticamente fuertes. Esto es importante, ya que indica que los grupos analizados corresponden a las especies esperadas, lo que coincide con los estudios reportados por Sadfi-Zouaoui *et al.* (2009). El árbol filogenético indica que la especie más frecuente fue *T. asperellum* con una mayor distribución en la zona de estudio, ya que las cepas pertenecen a cuatro de las cinco localidades muestreadas (Figura 7). En Tenango del Valle se encontró *T. asperellum*, lo cual no coincide con estudios de Osorio *et al.*, (2005) quienes reportan la presencia de *T. harzianum* y *T. lignorum*. Sin embargo, dicho estudio solo se limitó a caracterización morfológica, lo cual pudo conducir a una determinación errónea. De aquí la importancia de rescatar las especies nativas con potencial de biocontrol hacia fitopatógenos, tales como *T. asperellum* e *H. lixii*. Este último se encontró en las localidades de San Francisco Putla (TF10), San Francisco Tetetla (TL5, TL6) y San Juan la Isla (TJ6). Al parecer las condiciones geográficas y ambientales establecieron este patrón de distribución, ya que estas localidades están geográficamente cercanas. Esto se muestra en el análisis filogenético, sustituyendo a los taxones por sus localidades, donde

taxonomically identified as *H. lixii*/*T. harzianum* through molecular analysis.

The results obtained from characterization of native isolates from the Toluca Valley horticultural zone are significant, since *T. harzianum*/*H. lixii* and *T. asperellum* are species that had not been reported before in this region, and they are important as biological control agents in horticultural crops (Monte, 2001; Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006).

### Phylogenetic analysis

In this case, we performed a heuristic analysis and obtained 82 phylogenetic trees; they were equally parsimonious with a consistency index of 0.97 and 0.99 retention index, which suggests that they were well supported (Figure 7). For statistical bootstraps to obtain branch support values, 1000 replications were used, and values of 60 and 100% were considered as indicators of statistically strong branches. This is important as it confirms



**Figura 7.** Relación filogenética de 10 cepas nativas de *Trichoderma/Hypocrea*, por el análisis de secuencias ITS1 e ITS4. La filogenia fue inferida por el método de máxima parsimonia con índice de consistencia de 0.97 y reescalado de 0.99.

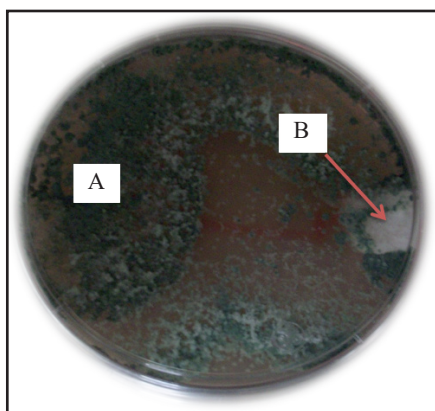
**Figure 7.** Phylogenetic relation of 10 native strains of *Trichoderma/Hypocrea* obtained through ITS1 and ITS4 sequences analysis. Phylogenetic was inferred by the maximum parsimony method with a consistency index of 0.97 and 0.99 upscaling.

se observa una estrecha relación entre las especies encontradas en las tres localidades mencionadas. Por otra parte, es importante mencionar que aunque las 10 cepas corresponden a dos especies, en el árbol se agrupan de manera separada, lo que coincide con los resultados de la descripción morfológica macroscópica tan diversa, ya que aunque la pigmentación y la forma de crecimiento micelial son diferentes entre sí, pertenecen a una misma especie.

### Pruebas de antagonismo

Los resultados de las pruebas de antagonismo entre los 10 aislados nativos de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans* mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Para el caso de *T. asperellum*, TX8 y TF8 presentaron los porcentajes más altos de biocontrol hacia el patógeno, con 98 y 76 % respectivamente (Figura 8), mientras que TL4 presentó el valor más bajo (49 %). A pesar de esto, se puede afirmar que *T. asperellum* ejerció un mayor biocontrol sobre *P. infestans*. La variación de estos porcentajes coincide con los estudios *in vitro* reportados por Kerroum *et al.* (2015), quienes reportan

that the analyzed groups relate to the expected species, which is similar to the results reported by Sadfi-Zouaoui *et al.* (2009). The phylogenetic trees show that the most frequently found species was *T. asperellum* with a wider distribution in the study zone, since the isolates belong to four of the five sampled locations (Figure 7). *T. asperellum* was found in Tenango del Valle, this finding is being in agreement with studies conducted by Osorio *et al.*, (2005), who reported the presence of *T. harzianum* and *T. lignorum*. However, the study was limited only to morphological characterization, and this may have led to a wrong determination. Therefore, it is important to rescue native species with potential as biocontrol agents against plant pathogens such as *T. asperellum* and *T. harzianum/H. lixii*. The latter was found in San Francisco Putla (TF10), San Francisco Tetetla (TL5, TL6) and San Juan la Isla (TJ6). It seems that the geographic and environmental conditions established this distribution pattern because of the geographic proximity of the three locations. This was shown by the phylogenetic analysis, replacing taxa by their locations, where a close relation among the species found in the three locations was observed. It is also important to mention that although the 10 isolates belong to the two species, in the tree they are individually grouped, which agrees with the results of the highly diverse macroscopic morphological description. Though their pigmentation and mycelia growth differ from each other, they belong to the same species.



**Figura 8.** Actividad de antagonismo. (A) *Trichoderma asperellum* TX8, (B) *Phytophthora infestans*.

**Figure 8.** Antagonism activity. (A) *Trichoderma asperellum* TX8, (B) *Phytophthora infestans*.

### Antagonism tests

The results from antagonism tests between the 10 native *Trichoderma* and *Phytophthora infestans* isolates showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ). In the case of *T. asperellum*, TX8 and TF8 had the highest percentages of biocontrol of

biocontrol de *T. harzianum* hacia *P. infestans* con un rango de 56 a 86 %. Los porcentajes de biocontrol encontrados en este estudio son similares a los reportados por Al-Mughrabi (2008), donde especies de *T. atroviride* evaluadas *in vitro* muestran un 92 % de control sobre *P. infestans*. Además superan a los obtenidos por Debebe *et al.*, (2011) donde el valor mínimo de biocontrol de *T. viride* fue de 36.7 % hacia este oomiceto. Por otra parte, a pesar de que *H. lixii* presenta los porcentajes más bajos de biocontrol, están por arriba del 50 %. Los resultados son consistentes con de los Santos *et al.* (2013), quienes reportan porcentajes de control mayores para *T. asperellum* comparado con *H. lixii* en estudios de antagonismos contra *Colletotrichum gloeosporoides*, causante de la antracnosis en mango. Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los realizados con las mismas cepas por García-Núñez *et al.* (2012), en los que los valores más altos de inhibición contra *Sclerotinia* sp corresponden a las cepas de *T. asperellum* TX8 y TL4, con 88 y 86 %, respectivamente (Cuadro 3). Sin embargo, en este estudio el aislado TL4 (*T. asperellum*) registró el valor más bajo de inhibición contra *P. infestans* (49 %). Este mismo caso lo presentó TF10 (*H. lixii*) que registró 80 % para el control de *Sclerotinia* sp. y un 66 % para *P. infestans*. TF8, TX7, TL2, TT6, TJ6, TL5 y TL6 registraron porcentajes menores de biocontrol para *Sclerotinia* sp., no así para *P. infestans*. Estos resultados coinciden con Matroudi *et al.*, (2013) quienes reportan especies de *Trichoderma* con un bajo efecto de biocontrol sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que no rebasan el 80%. Por otra parte, Aceves *et al.*, (2009) reportan especies de *Trichoderma* con un biocontrol del 5.35 % al 62.9 %. Por todo lo anterior, los resultados son interesantes, ya que *P. infestans* es un patógeno agresivo que tiene la capacidad de mutar con facilidad (López *et al.*, 2013), a pesar de lo cual se encontraron aislados de *T. asperellum* con poten-

the pathogen (98 and 76 %, respectively) (Figure 8), while TL4 had the lowest value (49 %). Despite of this, we can affirm that *T. asperellum* showed a higher biocontrol of *P. infestans*. The variation of these percentages is similar to the *in vitro* studies conducted by Kerroum *et al.* (2015), who reported biocontrol values of *T. harzianum* against *P. infestans* between 56 to 86 %. The biocontrol percentages obtained in this study are similar to those reported by Al-Mughrabi (2008), where the *T. atroviride* strain evaluated *in vitro* showed 92% of control of *P. infestans*. Furthermore, they exceeded the results obtained by Debebe *et al.*, (2011), where the minimum value of biocontrol of *T. viride* on the oomycete was 36.7 %. On the other hand, despite *T. harzianum/H. lixii* has the lowest percentages of biocontrol, these are higher than 50%. These results are in agreement with those obtained by Santos *et al.* (2013), who reported higher control percentages of *T. asperellum* compared to *T. harzianum/H. lixii* in antagonism studies against *Colletotrichum gloeosporoides*, which causes mango anthracnose.

The results obtained in this study differ from those obtained by García-Núñez *et al.* (2012) using the same isolates, where the highest inhibition values against *Sclerotinia* sp belong to isolates TX8 and TL4 of *T. asperellum*, with 88% and 86%, respectively (Table 3). However, in this study, isolate TL4 (*T. asperellum*) had the lowest inhibition value against *P. infestans* (49 %). TF10 (*H. lixii*) showed similar values with 80 % of control of *Sclerotinia* sp. and 66 % of *P. infestans*. Isolates TF8, TX7, TL2, TT6, TJ6, TL5 and TL6 had the lower percentages of biocontrol of *Sclerotinia* sp., but not for *P. infestans*. These results agree with those obtained by Matroudi *et al.*, (2013), who reported *Trichoderma* species with little biocontrol effect of *Sclerotinia sclerotiorum*, which do not exceed 80%. Also, Aceves *et al.*, (2009) reported *Trichoderma* species with 5.35 %

**Cuadro 3.** Porcentaje de inhibición de 10 cepas nativas de *Trichoderma* sobre *P. infestans*.

**Table 3.** Inhibition percentage of 10 native isolates of *Trichoderma* against *P. infestans*.

| Cepa | Especie              | Inhibición % |
|------|----------------------|--------------|
| TL2  | <i>T. asperellum</i> | *68.36bc     |
| TL4  | <i>T. asperellum</i> | 49.74c       |
| TL5  | <i>H. lixii</i>      | 65.99bc      |
| TL6  | <i>H. lixii</i>      | 55.84c       |
| TX7  | <i>T. asperellum</i> | 68.22bc      |
| TX8  | <i>T. asperellum</i> | 98.12a       |
| TT6  | <i>T. asperellum</i> | 56.92bc      |
| TF8  | <i>T. asperellum</i> | 76.41b       |
| TF10 | <i>H. lixii</i>      | 66.43bc      |
| TJ6  | <i>H. lixii</i>      | 65.26bc      |

\*Valores con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

cial para el control de este oomicete. Los aislados de *H. lixii* que registraron un potencial por arriba del 50 % se pueden potenciar en estudios posteriores para un biocontrol más efectivo, para realizar pruebas *in vivo* en una siguiente etapa con las cepas más virulentas.

## CONCLUSIONES

La caracterización morfológica, molecular y el análisis filogenético generan un diagnóstico confiable, que permitió identificar a las cepas de *Trichoderma* aisladas de la zona hortícola del Valle de Toluca, México como *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii*. Estas especies son consideradas con actividad biológica de amplio espectro de acción sobre fitopatógenos de cultivos. El análisis filogenético refleja la relación que existe entre la distribución geográfica de las dos especies encontradas, donde *T. asperellum* fue más frecuente. La

to 62.9 % of biocontrol. Based on this, the results are interesting, considering that *P. infestans* is an aggressive pathogen able to mutate easily (López *et al.*, 2013); however, we found *T. asperellum* isolates with potential to control such oomycete. The isolates of *T. harzianum/H. lixii* with potential higher than 50% can be strengthened to perform a more effective biocontrol and use them in *in vivo* tests in further stages, with more virulent isolates.

## CONCLUSIONS

The morphological and molecular characterization, as well as the phylogenetic analysis performed, provided a reliable diagnosis to identify isolates of *Trichoderma* isolated in the horticultural zone of the Toluca Valley, Mexico, as *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum/Hypocrea lixii*. These species are considered to have biological activity of wide action spectrum on crop plant pathogens. The phylogenetic analysis shows the existing relation among the geographic distribution of the two species, where *T. asperellum* was more frequently found. Strain TX8 identified as *T. asperellum*, due to its high percentage of biocontrol of *P. infestans* and *Sclerotinia* sp., can be a candidate to control these plant pathogens. It can be an agroecological alternative to control the late blight disease in the State of Mexico, given that it is a native strain and may have greater chances of adaptability and success compared to isolates currently available in the market. For this reason, we recommend to conduct studies at greenhouse level and then in the field, including different application doses and methods. The isolates identified can be also be evaluated as biocontrol agents of other pathogens in further studies.



cepa TX8 identificada como *T. asperellum*, al presentar un alto porcentaje de biocontrol sobre *P. infestans* y *Sclerotinia* sp., puede ser candidata para el control de estos fitopatógenos, lo que representaría una alternativa agroecológica para el control del tizón tardío en el Estado de México, ya que se trata de una cepa nativa que puede tener mayores posibilidades de adaptabilidad y éxito en comparación con las cepas disponibles actualmente de manera comercial. Por ello es recomendable realizar estudios a nivel de invernadero y posteriormente en campo, incluyendo diferentes dosis y métodos de aplicación. Las cepas identificadas pueden evaluarse así mismo como agentes de biocontrol sobre otros patógenos en futuras investigaciones.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada a H. García-Núñez para la realización de sus estudios de Doctorado, a la Secretaría de Educación Pública por el financiamiento al programa PIFI para realizar este proyecto y al Instituto Hispano-Luso de Ciencias Agrarias de la Universidad de Salamanca, España por el apoyo en los estudios moleculares y a los revisores, especialmente a la Editora Asociada, quienes pacientemente contribuyeron a mejorar la estructura del documento.

#### LITERATURA CITADA

- Al-Mughrabi K. 2008. Biological Control of *Phytophthora infestans* of Potatoes using *Trichoderma atroviride*. Pest Technology. 2 (2): 104-108. <http://dx.doi.org/10.3923/PPJ.2005.5.7>
- Altieri A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 74: 19-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Bailey A, Bae H, Strem M, Crozier J, Thomas S, Samuels G, Vinyard B and Holmes K. 2008. Antibiosis, mycoparasitism and colonization success for endophytic *Trichoderma*

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the National Council of Science and Technology (CONACyT) for the support scholarship granted to H. García-Núñez for her PhD studies; to the Secretariat of Public Education for funding the PIFI program to conduct this research project; to the Hispano-Luso Institute of Agricultural Sciences of the University of Salamanca, Spain, for its support to conduct the molecular studies and to the reviewers, especially the Associate Editor who patiently contributed to improve the structure of the document.

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

- isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biocontrol 46(1):24-35. <http://doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Barnett H and Hunter B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. EE. UU. Burgess Publ. Co. 241pp. <http://dx.doi:10.2307/3757954>
- Chaverri and Samuels G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreae): species with green ascospores. Stud. Mycol.48:1-116. <http://dx.doi:10.2307/3761915>
- Chaverri P and Samuels G. 2002. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. Mycological Progress 1(3):283-286. <http://dx.doi:10.1007/s11557-006-0025-8>
- De la Cruz-Pérez, D., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86 (4), 947-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- De los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D. A., Gómez-Lim, M. A., Délano-Frier, J. P., de-Folter, S., Sánchez-García, P., and Peña-Cabriales, J. J. (2013). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control, 64(1), 37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006>
- Debebe Z, Amutha S, Dereje G, Mesfin T and Bekele K. 2011. Biocontrol activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions. Journal of Agricultural Technology. 7(6): 1589-1602. <http://dx.doi:10.5423/PPJ.2004.20.1.075>
- Druzhinina S. and Kubicek P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate

- species to species clusters? Journal of Zhejiang University Science. 6(2):100-112. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3065-3059.1998.00179.x>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2010. *Perspectivas Agrícolas OCDE-FAO*. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2010-2-es
- García-Núñez H., Romero G, González E, Nava B y Martínez C. 2012. Isolation of Native Strains of *Trichoderma* spp. from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of Sclerotinia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15:357-365. Disponible en línea: <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/890>.
- Guigón-López C, Guerrero P, Vargas A, Carvajal M, Ávila Q, Bravo L, Ruocco L, Lanzuise S, Woo S. y Lorito M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp., su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:87-96. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61218468002.pdf>
- Hall T. 2004. Biological sequence alignment editor. Ibis bioscience. Carlsbad Ca. Hammer O, Harper D. and Ryan P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontology electronic* 4(1):9. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470750711>
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56. Disponible en línea: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman G, Obregon M, Samuels G and Lorito M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developed and developing world. *Plant Disease* 94: 928-939. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0928>
- Harris I. J. 1986. Modified method for fungal slide culture. *Journal of clinical microbiology*. 24(3): 460-461. Disponible en línea: <http://jcm.asm.org/content/24/3/460.full.pdf>
- Hermosa R, Grondona I, Iturriaga E, Díaz M, Castro C, Monte E y García A. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1890-1898. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>.
- Jaklisch W, Komon M, Kubicek C, and Druzhinina I. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. Nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*. 97 (6): 1365-1378. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1365>
- Kerroum F, Karkachi N, Jamal E y Kihal M. 2015. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North-west of Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*. 6 (4): 44-53. Disponible en línea: <http://www.innspub.net>
- Kredics L, Hatvan L, Naeimi S, Körmöczy P, László M, Casaba V y Druzhinina I. 2014. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. En: Gupta G. et al. (eds.) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-24. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>
- Larralde C, Santiago M, Sifuentes R, Rodríguez L, Rodríguez P, Shirai K, and Narváez Z. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 167-177. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1532-0>
- López C, Martínez A, Peñuelas G., Arteaga T, Ruiz A, Gómez T y Palmero D. 2013. Presencia de aislamientos homotéticos de *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) tratados con metalaxil en el Valle Toluca, México. *ITEA*. 109 (4):408-414. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0962-PDN>.
- Lorito M, Woo S, Harman G and Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395-417. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>.
- Martínez, B., Solano T. 1994. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. *Revista Protección Vegetal*, 10: 221-22. Disponible en línea: [http://ecology.nottingham.ac.uk/~plzfg/EBBSoc/ejb11/5-Matroudi_et_al_2009.pdf](http://www.sidalc.net/cgi-Matroudi S, Zamani M and Motallebi M. 2009. Antagonistic effects of three species of <i>Trichoderma</i> sp. on <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, the causal agent of canola stem rot. <i>Egyptian Journal of Biology</i>. 11: 37-44. Disponible en línea: <a href=)
- Michel A, Otero S, Solano P, Ariza F, Barrios A y Rebolledo M. 2009. Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp., *Fusarium subglutinans*, (Wollenweb y Reinking) Nelson, Tousoun y Marasas y *F. oxysporum Schlecht.*, agentes causales de la "Escoba de bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27. 18-26. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01853309200900010
- Miller J and Johnson D. 2000. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. *Phytopathology* 90: 220-227. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.3.220>
- Mohammad S, Mukesh S, Kumar V, Singh A, Sharma A, Sonika P, Rastogi S, Neelam P and Srivastava A. 2014. Phylogenetic diversity analysis of *Trichoderma* species based on internal transcribed spacer (ITS) marker. *African Journal of Biotechnology* 13(3):449-455. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2013.13075>
- Monte G. (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*. 4 (1): 1-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s101230100001>
- Morrone J. 2001. Sistemática, biogeografía y evolución. México: UNAM. <http://dx.doi.org/10.1086/421671>
- Osorio-Concepción M., Casas F. S., Cortés P. C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2011.11.002>
- Osorio-Nila, M. A., Vázquez-García, L. M., Salgado-Siclán, M. L., González-Esquivel, C. E (2005). Efecto de dos

- enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. Revista Chapingo Serie Horticultura. 11(3):203-208. <http://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2013.07.023>
- PHC (Plant, Health Care Mex.) Disponible en www.agroquimicos-organicosplm.com/phc-t-22-1645-9 (Consulta, septiembre 2016). <http://dx.doi.org/10.7748/phc.13.10.7.s7>
- Sadfi Z, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui M, Rubio M, Monte E, Boudabous A. and Hermosa R. 2009. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. Canadian Journal of Microbiology. 55:154-162. <http://dx.doi.org/10.1139/w08-101>.
- Samaniego-Gaxiola, J.A. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. Revista Mexicana de Fitopatología, 26: 32-39. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.37737>.
- Samuels G. J., Adnan I., Marie C. B., Sophie De R., Orlando P. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia. 102(4). 944-966. <http://dx.doi.org/10.3852/09-243>
- Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(3), 787-799. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2011-es
- Taghdi Y, Hermosa R, Domínguez S, Rubio M, Essalmani H, Nicolás C. and Monte E. 2015. Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains in the control of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology Mediterranea, 54(2), 232-240. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15226
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology. 22: 837-845. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-71-282>
- Woo S, Scala F, Ruocco M, and Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96:181-185. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-96-0181>.

Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification

Extracción y purificación de dsRNAs largos de plantas infectadas con virus y hongos; aplicación en la detección e identificación de virus

¹Valverde, R. A.* and ²De La Torre-Almaraz, R. ¹Department of Plant Pathology & Crop Physiology, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA 70803, USA. ²Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Mexico DF, Mexico. *Autor para correspondencia: RValverde@agcenter.lsu.edu.

Recibido: 30 de junio 2016.

Aceptado: 09 de agosto 2016.

Valverde RA and De La Torre-Almaraz R. 2017. Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi: Applications in virus detection and identification. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:80-105.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-9](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-9)

Primera publicación DOI: 22 de Octubre, 2016.

First DOI publication: October 22, 2016.

Abstract. Various methods for the extraction and purification of large dsRNAs are used to conduct detection and identification of viruses in plants and fungi. The most widely used protocol consists in phenol extraction and selective binding of dsRNA to cellulose. Purified viral dsRNAs from plants and fungi have been analyzed by gel electrophoresis and used as a complementary tool for virus identification. Moreover, dsRNAs have been used as reagent for reverse transcription PCR, molecular cloning, preparation of probes, and sequencing of RNA viruses. Many RNA viruses and subviral molecules infecting plants and fungi have been

Resumen. Se utilizan varios métodos para realizar la extracción y purificación de ARN de doble cadena (dsRNA) largo de plantas y hongos. Los protocolos más utilizados consisten en la extracción de fenol y la unión selectiva de dsRNA a la celulosa. Los dsRNAs virales purificados de plantas y hongos se han analizado por electroforesis con gel y se han utilizado como herramienta complementaria para identificar virus. Asimismo, los dsRNAs se han utilizado como reactivos en PCR de transcriptasa reversa, clonación molecular, preparación de sondas y secuenciación de virus ARN. Se han descubierto muchos virus ARN y moléculas subvirales que infectan plantas y hongos utilizando protocolos de extracción de dsRNA. Las recientes mejoras a los métodos de extracción de dsRNA han aumentado la eficiencia y la rentabilidad. Se ha comprobado que el dsRNA viral se puede utilizar como reactivo inicial para la secuenciación de próxima generación de genomas virales.

Palabras clave: virus ARN, fitovirus, micovirus, detección de virus.

discovered using dsRNA extraction protocols. Recent improvements on dsRNA extraction methods have increased their efficiency, and cost effectiveness. It has been shown that viral dsRNA can be used as an initial reagent for next generation sequencing of viral genomes.

Key words: RNA viruses, plant viruses, mycoviruses, virus detection.

INTRODUCTION

A variety of methods for the detection and identification of plant and fungal viruses are available to researchers and diagnosticians. For many years, serological methods and biological assays were commonly used in combination with viral nucleic acid detection. Today, nucleic acid-base approaches to virus detection such as polymerase chain reaction (PCR), together with sequencing, are widely used because of the high sensitivity and adaptation to the development of high throughput methods (Bonham *et al.*, 2014). Recently, new technologies for virus detection and identification such as next-generation sequencing (NGS) have become available. NGS is a method with great potential for the detection and identification of plant viruses (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Bonham *et al.*, 2014; Ho and Tzanetakis, 2013). For any nucleic acid-based method for RNA virus detection, efficient and practical RNA extraction protocols are needed. Many methods, including those of commercial kits, are currently available to extract single stranded RNA (ssRNA) from a wide range of biological tissues. Nevertheless, in some cases, the instability of ssRNA can be a factor affecting successful virus detection. The extraction, purification, and gel electrophoresis analysis of large (0.5-20.0 kb) viral double-stranded RNAs (dsRNAs) provide a

INTRODUCCIÓN

Existen varios métodos para la detección e identificación de fitovirus y micovirus que los investigadores y especialistas en diagnóstico pueden utilizar. Durante muchos años, los métodos serológicos y los ensayos biológicos fueron los más utilizados en combinación con la detección de ácido nucleótico viral. Hoy en día, los métodos basados en ácido nucleico para la detección de virus, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), junto con la secuenciación, son los que más se utilizan en el desarrollo de métodos de alto rendimiento, por su alta sensibilidad y adaptación (Bonham *et al.*, 2014). Recientemente han surgido nuevas tecnologías para la detección e identificación de virus, como la secuenciación de próxima generación (NGS). La NGS es un método con gran potencial para la detección e identificación de fitovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Bonham *et al.*, 2014; Ho y Tzanetakis, 2013). En todo método basado en ácido nucleico para la detección de virus ARN se necesitan protocolos de extracción de ARN eficaces y prácticos. Hoy en día existen muchos métodos, incluidos los de kits comerciales, para extraer ARN de una sola cadena de una amplia variedad de tejidos biológicos. No obstante, en algunos casos, la inestabilidad del ARN de una sola cadena puede ser un factor que afecta la detección exitosa de los virus. La extracción, purificación y análisis de ARN de doble cadena largos (dsRNAs) (0.5-20.0 kb) por electroforesis proporciona una herramienta complementaria a los científicos que pretenden detectar e identificar virus en plantas (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Morris y Dodds, 1979; Valverde *et al.*, 1990b), así como una fuente de ARN que se puede utilizar en otros métodos de detección e identificación basados en ácido nucleico de virus ARN.

El dsRNA largo ha sido reconocido como material genético en muchos virus de plantas, animales,

complementary tool for scientists aiming to detect and identify plant viruses (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Morris and Dodds, 1979; Valverde *et al.*, 1990b). Moreover, it also provides a source of RNA that can be used in other nucleic acid-based detection and identification methods for RNA viruses.

Large dsRNA has been recognized as genetic material in many plant, animal, fungal, and bacterial viruses (Libonati *et al.*, 1980). Some biological functions of dsRNA include the capacity to induce interferon and the inhibition of protein synthesis in eukaryotes (Libonati *et al.*, 1980). DsRNA is resistant to RNases under high ionic strength conditions. Under standard assay conditions (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7), dsRNA is resistant to RNase A but not to RNases of the pancreatic type (Libonati and Sorrentino, 1992). Another unique property of dsRNA is that it binds to cellulose in ethanol-containing buffers. Optimally, dsRNA binds to fibrous cellulose at ethanol concentrations of about 16 % (Franklin, 1966; Morris and Dodds, 1979). The relatively high stability of dsRNA and the availability of extraction methods make the use of dsRNA practical for the detection and identification of RNA viruses.

In most plants and fungi infected with RNA viruses, dsRNAs can be found as part of: 1) genomic segments of dsRNA viruses; 2) replicative forms and replicative intermediates of single-stranded RNA viruses (ssRNA) (Buck, 1999; Horiuchi and Fukuhara, 2004; Jackson *et al.*, 1971; Libonati *et al.*, 1980; Nuss and Koltin, 1990; Zelcer *et al.*, 1981); 3) subgenomic viral RNAs (sgRNAs) (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Osman and Buck 1990); 4) satellite viruses (Klein and Reichman, 1970; Hillman *et al.*, 2000; Valverde and Dodds, 1986); 5) satellite RNAs (Demler and de Zoeten, 1989; Liu *et al.*, 2015); and 6) defective interfering RNAs (Burgyan *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 2000). Serological detection of dsRNAs

hongos y bacteriófagos (Libonati *et al.*, 1980). Algunas funciones biológicas del dsRNA incluyen la capacidad de inducir interferones e inhibir la síntesis proteica en las células eucariotas (Libonati *et al.*, 1980). El DsRNA es resistente a las ribonucleasas (RNases) bajo condiciones de elevada fuerza iónica. En condiciones normales de ensayo (0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio, pH 7), el dsRNA es resistente a la RNase A pero no a las RNases de tipo pancreático (Libonati y Sorrentino, 1992). Otra propiedad única del dsRNA es que se une a la fibra de celulosa en buffers que contienen etanol. Lo óptimo es que el dsRNA se una a la fibra de celulosa en concentraciones de etanol de aproximadamente 16 % (Franklin, 1966; Morris y Dodds, 1979). La estabilidad relativamente alta del dsRNA y la disponibilidad de métodos de extracción hacen que el uso del dsRNA resulte práctico en la detección e identificación de virus ARN.

En muchas plantas y hongos infectados con virus ARN se pueden encontrar dsRNAs como parte de: 1) segmentos genómicos virales dsRNA; 2) formas replicativas e intermediarios replicativos de virus ARN de una sola (Buck, 1999; Horiuchi y Fukuhara, 2004; Jackson *et al.*, 1971; Libonati *et al.*, 1980; Nuss y Koltin, 1990; Zelcer *et al.*, 1981); 3) ARNs subgenómicos virales (sgRNAs) (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Osman y Buck 1990); 4) virus satélite (Klein y Reichman, 1970; Hillman *et al.*, 2000; Valverde y Dodds, 1986); 5) ARNs satélite (Demler y de Zoeten, 1989; Liu *et al.*, 2015); y 6) ARNs de interferencia defectuosa (Burgyan *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 2000). También se ha reportado detección serológica de dsRNAs de plantas y hongos infectados por virus. Como antisuero contra el ácido poliinosínico-policitídilico (polyi:c) se ha utilizado un análogo sintético de ARN de doble cadena de plantas infectadas con el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) y el *Virus de la tristeza de los cítricos* (CTV), y *Penicillium chrysogenum*

from virus-infected plants and fungi has also been reported. An antiserum against polyinosinic-polycytidylic acid (polyi:c), a synthetic analog of double-stranded RNA, has been used to detect dsRNA from plants infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Penicillium chrysogenum* infected with *Penicillium chrysogenum virus* using serological techniques (Aramburu *et al.*, 1991). These techniques showed similar sensitivity for the detection of dsRNA as separation by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. DsRNAs from *Cowpea mosaic virus* and *Sugar cane mosaic virus* have been detected in infected tissue extracts using serologically specific electron microscopy (Derrick *et al.*, 1994). Monoclonal antibodies to dsRNA have been developed and used to detect *Ground nut rosette virus* in peanut (Schonborn *et al.*, 1991). However, techniques based on serological methods require the development of the specific antibodies, a procedure that is more costly and lengthy than the direct visualization of dsRNA using electrophoresis or RT-PCR detection.

RNA viruses of plants and fungi

Viruses with ssRNA genomes make up more than 90 % of all known plant viruses. During replication in host cells, ssRNA viruses generate double-stranded replicative forms (RF) which consist of fully base-paired RNA molecules of the genomic RNA and replicative intermediates (Buck, 1999). They have been shown to occur in *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tobacco ringspot virus* infected plants (Buck 1999; Derrick, 1978; German and de Zoeten, 1975; Jackson *et al.*, 1971; Zelcer *et al.*, 1981) and *Oryza sativa endornavirus* (Horiuchi and Fukuhara, 2004) among others. Many ssRNA viruses generate subgenomic RNAs (sgRNAs) to express internal open reading frames. These

infectada con el *Virus Penicillium chrysogenum*, aplicando técnicas serológicas (Aramburu *et al.*, 1991). Estas técnicas mostraron similar sensibilidad en la detección de dsRNA como separación mediante electroforesis en gel de poliácridamida y tinción argéntica. Se han detectado DsRNAs del *Virus del mosaico del caupí* y el *Virus del mosaico de la caña de azúcar* en extractos de tejido infectado utilizando un microscopio electrónico (Derrick *et al.*, 1994). Se han producido anticuerpos monoclonales para dsRNA y se han utilizado para detectar el *Virus de la roseta del maní* en cacahuete (Schonborn *et al.*, 1991). Sin embargo, las técnicas basadas en métodos serológicos requieren la producción de anticuerpos específicos, un procedimiento más costoso y prolongado que la visualización directa del dsRNA por electroforesis o detección por RT-PCR.

Virus ARN de plantas y hongos

Los virus que contienen genomas de ssRNA constituyen más del 90 % de todos los fitovirus conocidos. Durante su replicación en células huésped, los virus ssRNA producen formas replicativas de doble cadena (RF), que consisten en moléculas de ARN de bases completamente apareadas de ARN genómico e intermediarios replicativos (Buck, 1999). Se ha observado que esto ocurre en plantas infectadas con el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), el *Virus de la mancha anular del tabaco* (Buck 1999; Derrick, 1978; German y de Zoeten, 1975; Jackson *et al.*, 1971; Zelcer *et al.*, 1981) y el *endornavirus* de *Oryza sativa* (Horiuchi y Fukuhara, 2004), entre otros. Muchos de los virus ARN generan ARNs subgenómicos (sgRNAs) que expresan marcos internos abiertos de lectura. Estos sgRNAs son sintetizados, ya sea a partir de cadenas negativas prematuramente terminadas o, más comúnmente, por un proceso interno en los moldes de la cadena negativa en secuencias específicas del

sgRNAs are synthesized either from prematurely terminated negative strands or, more commonly, by internal initiation on the negative-strand templates at specific promoter sequences (Miller and Koev, 2000). Subgenomic dsRNAs have been detected in plants infected with most RNA viruses and fungi infected with RNA mycoviruses (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Kwon *et al.*, 2007; Osman and Buck, 1990). Plant viruses with dsRNA genomes include members of the families *Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Amalgaviridae*, *Totiviridae*, and *Chrysoviridae*, and their genomic dsRNA are readily detected from plant tissues (Antoniw *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2016; Karan *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Quito *et al.*, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2009; 2011; Wei *et al.*, 2003). With the exception of the *Reoviridae*, the other four families contain plant viruses that do not cause visible symptoms and have been named persistent viruses. In contrast, acute viruses cause symptoms and economically important plant diseases (Roossinck, 2010).

All major taxa of fungi have been shown to contain viruses. Although most fungal viruses described to date have dsRNA genomes, there are some with ssRNA genomes and one report of a ssDNA genome (Ghabrial *et al.*, 2015). There are many citations in the literature of the presence of viral dsRNAs in fungi (Azzam and Gonsalves, 1999; Castillo *et al.*, 2011; Day *et al.*, 1977; Delye and Corio-Costet, 1998; Dickinson and Pryor, 1989; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa and Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Shamoun *et al.*, 2008); however, in most cases these viruses do not appear to affect the host's phenotype (Enebak *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2003). Only in some cases they have been associated with phenotypic and genotypic variations (Castanho *et al.*, 1978; Ghabrial *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2003). The ability of some mycoviruses to induce hypovirulence has been used for biological control

promotor (Miller and Koev, 2000). Se han detectado dsRNAs subgenómicos en plantas infectadas con numerosos virus ARN, y en hongos infectados con micovirus ARN (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Kwon *et al.*, 2007; Osman y Buck, 1990). Los fitovirus con genomas de dsRNA incluyen miembros de las familias *Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Amalgaviridae*, *Totiviridae* y *Chrysoviridae*, y sus dsRNA genómicos son fácilmente detectables en tejidos vegetales (Antoniw *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2016; Karan *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Quito *et al.*, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2009; 2011; Wei *et al.*, 2003). Con excepción de *Reoviridae*, las otras cuatro familias contienen fitovirus que no producen síntomas visibles y a éstos se les denomina virus persistentes. En cambio, los virus agudos producen síntomas y causan enfermedades de importancia económica en las plantas (Roossinck, 2010).

Se ha descubierto que todos los principales taxones de hongos contienen virus. Aunque casi la mayoría de los micovirus que se han descrito a la fecha tienen genomas de dsRNA, existen algunos con genomas de ssRNA, y se ha reportado uno con genoma de ssDNA (Ghabrial *et al.*, 2015). En la literatura existen muchas referencias sobre la presencia de dsRNAs virales en hongos (Azzam y Gonsalves, 1999; Castillo *et al.*, 2011; Day *et al.*, 1977; Delye y Corio-Costet, 1998; Dickinson y Pryor, 1989; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa y Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Shamoun *et al.*, 2008); sin embargo, parece que en la mayoría de los casos estos virus no afectan el fenotipo del huésped (Enebak *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2003). Solo en algunos casos se les ha asociado con variaciones fenotípicas y genotípicas (Castanho *et al.*, 1978; Ghabrial *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2003). La capacidad de algunos virus de inducir hipovirulencia se ha utilizado en el control biológico de sus huéspedes fúngicos, que son patógenos para las plantas (Nuss y Koltin, 1990). Los

of their fungal hosts that are pathogenic to plants (Nuss and Koltin, 1990). The best known examples of mycovirus-induced hypovirulence are virus strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* (Choi and Nuss, 1992; Day *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2006). Methods for the extraction and purification of dsRNA have been essential for the discovery, detection, and characterization of mycoviruses (Nuss and Koltin, 1990).

Satellite viruses, satellite RNAs, defective interfering RNAs, and viroids

Satellites are subviral agents that depend on a helper virus for their replication. Satellite viruses code for their own coat protein and their RNA is encapsidated. Satellite RNAs do not encode capsid proteins, but are packaged in a protein encoded by the helper virus. The size of most satellites associated with plant and fungal viruses range from 2.0-0.4 kb (Hillman *et al.*, 2000; Kaper and Diaz-Ruiz, 1977; Demler and de Zoeten, 1989; Valverde and Dodds, 1987). Defective interfering RNAs (DIs) are RNAs that result from errors in virus replication (Pathak and Nagy, 2009). Satellite RNA viruses, satellite RNAs, and DI RNAs can attenuate or enhance the symptoms caused by their parent virus (Pathak and Nagy, 2009; Habili and Kaper, 1981). Some satellite viruses and RNAs associated with plant viruses accumulate relatively large quantities of dsRNA (Diaz-Ruiz and Kaper, 1977; Dodds *et al.*, 1984; Habili and Kaper, 1981; Valverde and Dodds, 1986; 1987). In fungi, dsRNA satellites have been associated with several dsRNA viruses (Liu *et al.*, 2015; Romanos *et al.*, 1981), and satellite dsRNAs have been reported in *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2015). A satellite RNA of *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a in hypovirulent Isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng and Boland, 2004), and a satellite and DI

ejemplos más conocidos de hipovirulencia inducida por micovirus son las cepas del virus del cancro del castaño *Cryphonectria parasitica* (Choi y Nuss, 1992; Day *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2006). Los métodos de extracción y purificación de dsRNA han sido fundamentales para el descubrimiento, la detección y la caracterización de micovirus (Nuss y Koltin, 1990).

Virus satélite, ARNs satélite, ARN de interferencia defectuosa y viroides

Agentes satélite y subvirales dependen de un virus auxiliar para replicarse. Los virus satélite codifican su propia proteína de la cápside, dentro de la cual empaqueta su ARN. Los ARN satélite no codifican proteínas de la cápside, sino que están empaquetados en una proteína codificada por el virus auxiliar. El tamaño de la mayoría de los satélites asociados con los fitovirus y los micovirus varía de 2.0 a 0.4 kb (Hillman *et al.*, 2000; Kaper y Diaz-Ruiz, 1977; Demler y de Zoeten, 1989; Valverde y Dodds, 1987). Los ARN de interferencia defectuosa (DIs) son ARN que resultan a causa de errores en la replicación del virus (Pathak y Nagy, 2009). Los virus ARN satélite, los ARN satélite y los ARN DIs pueden atenuar o aumentar los síntomas causados por su virus progenitor (Pathak y Nagy, 2009; Habili y Kaper, 1981). Algunos virus satélite y ARN asociados con fitovirus acumulan cantidades relativamente grandes de dsRNA (Diaz-Ruiz y Kaper, 1977; Dodds *et al.*, 1984; Habili y Kaper, 1981; Valverde y Dodds, 1986; 1987). En los hongos, los satélites dsRNA se han asociado con diversos virus dsRNA (Liu *et al.*, 2015; Romanos *et al.*, 1981), y se han reportado dsRNAs satélite en *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2015). También se identificaron un ARN satélite de *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a en aislamientos hipovirulentos de *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng y Boland, 2004), y

RNAs of *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2* (Hillman *et al.*, 2000) have also been identified.

Viroids are some of the smallest known infectious agents. They consist of non-coding circular ssRNA molecules forming highly base-paired rod-like structures and are capable of causing economically important diseases in many crops worldwide (Kovalskaya and Hammond, 2014). Viroid derived dsRNAs have been described (Carbonell, *et al.*, 2008).

DsRNA extraction and purification

Over the past 50 years, several methods for large dsRNA extraction from virus-infected plant, animal and fungal tissues, as well as bacteria have been reported in the literature (Akin *et al.*, 1998; Balijja *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Delye and Corio-Costet, 1998; DePaulo and Powell, 1995; Diaz-Ruiz and Kaper, 1978; Franklin, 1966; Morris and Dodds, 1979, Morris *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 2015; Tzanetakis and Martin, 2008; Valverde *et al.*, 1990) (Table 1). Most of these methods are based on cellulose chromatography, some on enzymatic

un satélite y ARN DIs de *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2* (Hillman *et al.*, 2000).

Los viroides son algunos de los agentes infecciosos más pequeños que se conocen. Están formados por moléculas de ARN circulares no codificadas que forman estructuras altamente apareadas en forma de varilla y llegan a causar enfermedades económicamente importantes en muchos cultivos a nivel mundial (Kovalskaya y Hammond, 2014). Se ha descrito un viroide derivado de dsRNAs (Carbonell, *et al.*, 2008).

Extracción y purificación de DsRNA

En los últimos 50 años, en la literatura se han reportado varios métodos para la extracción de dsRNA largos de plantas, animales y tejidos fúngicos infectados por virus (Akin *et al.*, 1998; Balijja *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Delye y Corio-Costet, 1998; DePaulo y Powell, 1995; Diaz-Ruiz y Kaper, 1978; Franklin, 1966; Morris y Dodds, 1979, Morris *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 2015; Tzanetakis y Martin, 2008; Valverde *et al.*, 1990) (Cuadro 1). La mayoría de estos métodos se basan en

Table 1. Principal Components of Some dsRNA Extraction Protocols.
Cuadro 1. Componentes principales de algunos protocolos de extracción de dsRNA.

| Principle | Reference |
|---|-------------------------------|
| Lithium chloride | Akin <i>et al.</i> , 1998 |
| Recombinant dsRNA-binding protein | Atsumi <i>et al.</i> , 2015 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Balijja <i>et al.</i> , 2008 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Castillo <i>et al.</i> , 2011 |
| Guanidium thiocyanate | Delye and Corio-Costet, 1998 |
| sodium dodecyl sulfate (SDS)/Potassium acetate (KOAc) | DePaulo and Powell, 1995 |
| Lithium chloride | Diaz-Ruiz and Kaper, 1978 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Franklin, 1966 |
| Fibrous cellulose (Sigma) | Khankhum <i>et al.</i> , 2015 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Morris and Dodds, 1979 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Morris <i>et al.</i> , 1983 |
| Cellulose A and D | Okada <i>et al.</i> , 2015 |
| CF-11 cellulose (Whatman) | Tzanetakis and Martin, 2008 |
| CF-11 cellulose (Whatman) or Cellex N-1 (BioRad) | Valverde <i>et al.</i> , 1990 |

degradation or lithium chloride precipitation. Recently, Atsumi *et al.*, (2015) developed a novel dsRNA isolation method using a recombinant dsRNA-binding protein.

In 1979, Morris and Dodds developed a procedure for the isolation and analysis of dsRNA which has been widely used for the detection, identification, and characterization of plant viruses. It consists on the selective adsorption of dsRNA to fibrous cellulose at low ethanol concentrations and elution with ethanol-free buffer. A schematic diagram summarizing the steps involved in the method is shown in Figure 1. Although developed over 40 years ago, it is still in use today although it has been modified and improved (Khankhum *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990).

Homogenizing by grinding fresh, infected tissue, often with mortar and pestle using liquid

cromatografía de celulosa, algunos en degradación enzimática o precipitación con cloruro de litio. Recientemente, Atsumi *et al.*, (2015) desarrollaron un novedoso método para aislar dsRNA utilizando una proteína recombinante de unión al dsRNA.

En 1979, Morris y Dodds desarrollaron un procedimiento para el aislamiento y análisis de dsRNA que ha sido muy utilizado en la detección, identificación y caracterización de fitovirus. El procedimiento consiste en la absorción selectiva de dsRNA en celulosa de fibra en bajas concentraciones de etanol y elución con un búfer libre de etanol. En la Figura 1 se muestra un diagrama esquemático con un resumen de los pasos que se siguen en este método. Aunque el método se desarrolló hace más de 40 años, sigue utilizándose hoy en día, con algunas modificaciones y mejoras (Khankhum *et al.*, 2016; Valverde *et al.*, 1990).

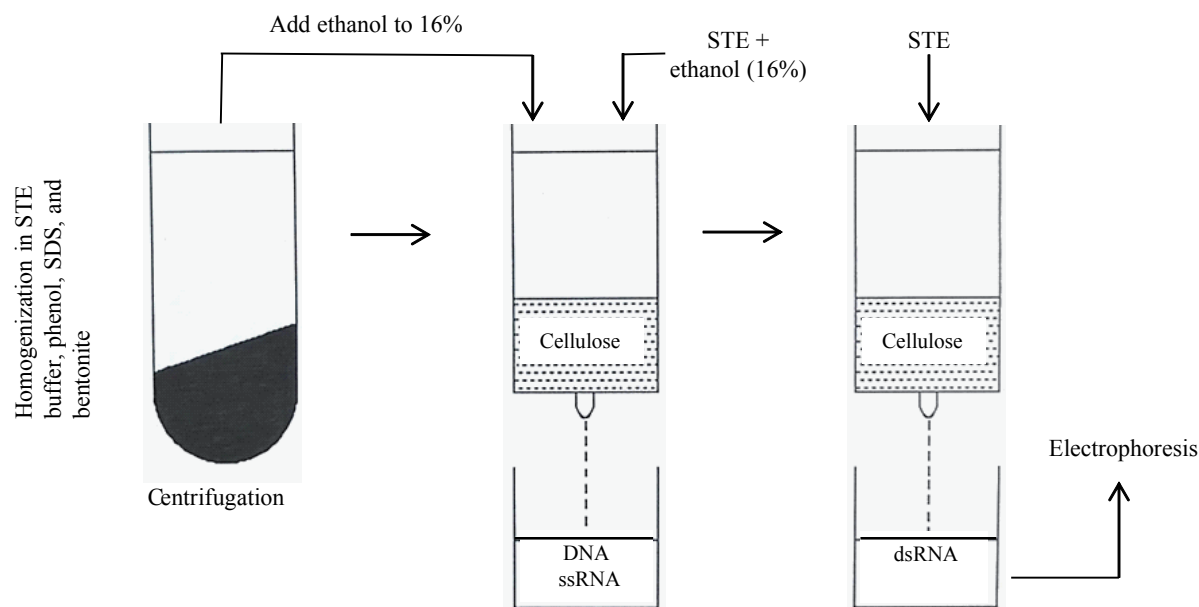


Figure 1. Schematic diagram of the steps involved in dsRNA extraction and purification. (Modified from Valverde *et al.*, 1990). STE: Sodium, Tris and EDTA buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0 and 1 mM EDTA); SDS: sodium dodecyl sulfate.

Figura 1. Diagrama esquemático de los pasos para la extracción y purificación de dsRNA. (Modificado de Valverde *et al.*, 1990). STE: Sodio, Tris y búfer EDTA (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0 y 1 mM EDTA); SDS: Dodecilsulfato sódico.

nitrogen, is the first step in the extraction of dsRNA. However, buffered sap extracts, fresh or lyophilized fungal mycelium, dried spores, and desiccated plant tissue (including those infected with biotrophic fungi) have also been used with successful results (Morris *et al.*, 1983; Khankhum *et al.*, 2015; Kousik *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990). Other practical and efficient approaches for disrupting the tissue include bead beaters, tissue homogenizers, etc. Desiccated tissue has broad use because this method is conventionally used for the long-term storage of virus-infected tissue. It is also the way samples are exchanged between laboratories. Furthermore, biotrophic fungi infecting plant tissues are often stored in fungaria as pressed and dried specimens from which samples can be used to test for the presence of fungal viruses (Khankhum *et al.*, 2015). In the case of plants, most extractions are done from foliar tissue. However, bark, stem, or vein tissue are recommended for phloem-limited viruses. For fungi, mycelium or spores can be used. Negative controls are highly recommended in any dsRNA extraction. The second step involves total nucleic acid extraction using buffer-saturated phenol. With some plant tissues and particular viruses buffer may be used instead of phenol. Nevertheless, phenol extracts usually yield cleaner samples. The third step involves binding of the dsRNA to fibrous cellulose. The cellulose used by Morris and Dodds (1979) and Franklin (1966) in their original papers was Whatman CF-11 (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA). Because this cellulose is no longer commercially available, other cellulose types such as Cellex-N1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) have been used in dsRNA purifications with some success (Okada *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990). Khankhum *et al.*, (2015) used fibrous cellulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to extract dsRNAs from virus-infected plants and

El primer paso en la extracción de dsRNA consiste en homogeneizar por molienda tejido infectado fresco utilizando nitrógeno líquido; la molienda suele hacerse con mortero y mano. Sin embargo, también se han utilizado con buenos resultados extractos de savia, micelios fúngicos frescos o liofilizados, esporas secas y tejido deshidratado de plantas con un buffer (incluyendo tejidos infectados con hongos biotrofos) (Morris *et al.*, 1983; Khankhum *et al.*, 2015; Kousik *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990). Otros métodos prácticos y eficientes para el macerado del tejido incluyen batidoras de laboratorio, homogeneizadores de tejido, etcétera. El tejido deshidratado infectado con virus puede almacenarse por largos periodos de tiempo, en espacios pequeños y utilizarse como fuente de inóculo para ensayos posteriores, y porque permite también el intercambio de muestras entre laboratorios. Además, los hongos biotrofos que infectan tejidos vegetales suelen almacenarse en depósitos como especímenes prensados y desecados, de los cuales se pueden obtener muestras para comprobar la presencia de micovirus (Khankhum *et al.*, 2015). En el caso de plantas, se utiliza tejido foliar en la mayoría de las extracciones. Sin embargo, se recomienda el uso de tejidos de corteza, tallo o vaina para algunos virus del floema. Para los hongos se pueden utilizar micelios o esporas. En toda extracción de dsRNA se recomiendan controles negativos. El segundo paso incluye la extracción total del ácido nucleico utilizando fenol saturado con un buffer. Con algunos tejidos vegetales y virus en particular es posible utilizar un buffer en lugar de fenol. No obstante, con los extractos fenólicos normalmente se obtienen muestras más limpias. El tercer paso incluye la unión del dsRNA a la celulosa de fibra. La celulosa que utilizaron Morris y Dodds (1979) y Franklin (1966) en sus primeros estudios fue Whatman CF-11 (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA). Dado que esta celulosa desapareció

fungi. This cellulose is readily available worldwide and a good alternative to CF-11. After ethanol precipitation, dsRNA samples must be treated with DNase to eliminate potential host DNA contamination. Host ribosomal RNA may interfere with the electrophoretic detection of dsRNAs ranging from 1.0-0.5 kb. Therefore, when the target dsRNAs are within this range, digestion with S1 nuclease is recommended. After that, analysis of dsRNAs can be conducted in 6 % polyacrylamide gels, which provide high resolving power for subgenomic dsRNAs or, more simply, using 1.2-1.5 % agarose gels. Traditionally, ethidium bromide has been the preferred stain, although silver nitrate staining has been used as well. More recently, staining with Gel Red™ (Huang *et al.*, 2010) has become more common. GelRed does not have the health hazards associated with ethidium bromide and has higher sensitivity. Detailed information of the methodology developed by Morris and Dodds (1979) and data showing some of its applications has been published elsewhere (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Valverde *et al.*, 1986; 1990b).

Initially, the focus of the dsRNA extraction protocols was on the electrophoretic analysis and evaluation of banding patterns for virus detection and, in some cases, identification. Although analysis of viral dsRNAs by gel electrophoresis is still widely used, currently most applications are in RT-PCR, molecular cloning, sequencing, genome assembly, and virus identification.

Virus detection and identification

In many cases, particularly with ssRNA viruses infecting plants that contain high amounts of phenolic compounds and carbohydrates, diagnosticians and researchers find it difficult to obtain pure preparations of ssRNA or virus to use in identification and characterization. An

del mercado, para la purificación de dsRNA se han utilizado otros tipos de celulosa, como Cellex-N1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que han dado algunos buenos resultados (Okada *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990). Khankum *et al.*, (2015) utilizaron celulosa de fibra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para extraer dsRNAs de plantas y hongos infectados con virus. Esta celulosa se puede conseguir fácilmente en cualquier parte del mundo y es una buena opción para sustituir a la celulosa CF-11. Después de ser sometidas a precipitación en etanol, las muestras tienen que ser tratadas con DNase para eliminar la posibilidad de que el DNA huésped se contamine. El ARN ribosómico huésped podría interferir en la detección electroforética de los dsRNAs de 1.0 a 0.5 kb. Por lo tanto, cuando los dsRNAs objetivo están dentro de este rango, se recomienda la digestión con nucleasa S1. Después de esto, se puede realizar el análisis de los dsRNAs en geles de poliacrilamida al 6 %, lo cual proporciona un alto poder de resolución en los dsRNAs subgenómicos, o, de manera más simple, se pueden utilizar geles de agarosa al 1.2-1.5 %. Tradicionalmente, el bromuro de etidio ha sido la tinción preferida, aunque también se ha utilizado la tinción de nitrato de plata. Más recientemente, se ha vuelto más común la tinción con Gel Red™ (Huang *et al.*, 2010). GelRed no implica riesgos para la salud como los riesgos asociados con el bromuro de etidio y tiene mayor sensibilidad. En otras fuentes se ha publicado información detallada y datos que muestran algunas de las aplicaciones de la metodología que desarrollaron Morris y Dodds (1979) (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Valverde *et al.*, 1986; 1990b).

Inicialmente, los protocolos de extracción de dsRNA se enfocaban en el análisis electroforético y la evaluación de los patrones de bandas para detectar los virus y, en algunos casos, identificarlos. Aunque todavía sigue utilizándose el análisis de dsRNAs virales mediante electroforesis con gel, hoy

alternative is to purify dsRNAs that can be used for probe preparation, RT-PCR, molecular cloning, and sequencing.

In general, different families of RNA viruses infecting plants or fungi yield characteristic electrophoretic dsRNA banding patterns that differentiate them (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1986). DsRNA electrophoretic profiles have been reported for members of the families *Closteroviridae* (Dodds and Bar-Joseph, 1983), *Potyviridae* (Valverde *et al.*, 1986), *Bromoviridae* (Valverde and Glascock, 1991), *Endornaviridae* (Fukuhara *et al.*, 2006) and the genera *Comovirus* (Valverde *et al.*, 1995), *Tobamovirus*, *Potexvirus*, and *Carlavirus* (Valverde *et al.*, 1986). As mentioned earlier, dsRNA profiles generally consist of one (in the case of monopartite viruses), two (bipartite) or more (multipartite) full-length genomic bands (or RFs) and several other bands corresponding to subgenomic replicative forms of RNA viruses (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Osman and Buck, 1990). Figures 2 and 3 show dsRNA profiles of different plant viruses resolved in polyacrylamide and agarose gels. In the case of fungal viruses, dsRNA electrophoretic profiles have not been evaluated as extensively as a tool to differentiate between families or genera. Nevertheless, as in the case of plant RNA viruses, electrophoretic profiles vary depending upon the virus species and mixed infections are common (Figure 4).

Extraction and electrophoretic analyses of dsRNA has been used widely to study important viruses such as *Citrus tristeza virus* (CTV) (Dodds and Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1993) and viruses of *C. parasitica*, the causal agent of chestnut blight (Casthano *et al.*, 1978; Day *et al.*, 1977; Hansen *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2006). In the literature, there are numerous examples of the use of viral dsRNA to detect, identify, and

en día la mayoría de las aplicaciones se hacen en RT-PCR, clonación molecular, secuenciación, ensamblado genómico e identificación de virus.

Detección e identificación de virus

En muchos casos, particularmente con los virus ARN que infectan plantas que contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos y carbohidratos, es difícil para los expertos en diagnóstico y los investigadores obtener preparaciones puras de ARN o de virus que puedan ser utilizadas en la identificación o caracterización. Una opción es purificar dsRNAs que puedan ser utilizados en la preparación de sondas, RT-PCR, clonación molecular y secuenciación.

En general, las diferentes familias de virus RNA que infectan plantas u hongos producen patrones característicos de bandas electroforéticas de dsRNA que los diferencian (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1986). Se han reportado perfiles electroforéticos de dsRNA en miembros de las familias *Closteroviridae* (Dodds y Bar-Joseph, 1983), *Potyviridae* (Valverde *et al.*, 1986), *Bromoviridae* (Valverde y Glascock, 1991), *Endornaviridae* (Fukuhara *et al.*, 2006) y de los géneros *Comovirus* (Valverde *et al.*, 1995), *Tobamovirus*, *Potexvirus*, y *Carlavirus* (Valverde *et al.*, 1986). Como se mencionó anteriormente, los perfiles de dsRNA generalmente constan de una (en el caso de los virus monopartitas), dos (bipartita) o más (multipartita) bandas genómicas de longitud completa (o RF) y varias otras bandas que corresponden a las formas subgenómicas replicativas de los virus RNA (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Osman y Buck, 1990). En las Figuras 2 y 3 se muestran perfiles de dsRNA de diferentes fitovirus resueltos en geles de poliacrilamida y agarosa. En el caso de los micovirus, los perfiles electroforéticos de dsRNA no se han evaluado extensamente como una herramienta para

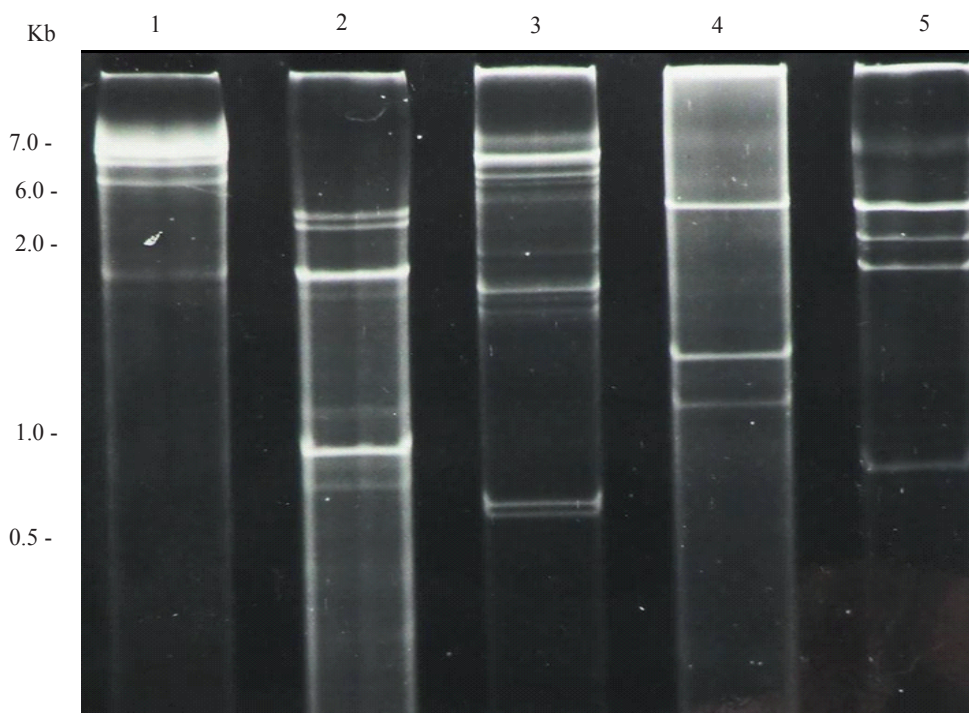


Figure 2. Polyacrylamide (6 %) gel electrophoresis of dsRNA extracted from plants infected with different viruses. Lane 1, *Potato virus X*; lane 2, *Cucumber mosaic virus*; lane 3, *Tobacco mild green mosaic virus*; lane 4, *Tobacco necrosis virus*; and lane 5, *Alfalfa mosaic virus*.

Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (6%) de dsRNA extraído de plantas infectadas con diferentes virus. Carril 1, *Virus de la papa X*; carril 2, *Virus del mosaico del pepino*; carril 3, *Virus del mosaico verde suave del tabaco*; carril 4, *Virus de la necrosis del tabaco*; carril 5, *Virus del mosaico de la alfalfa*.

study viruses, satellites, and DIs infecting plants (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; De la Torre, *et al.*, 2014; 2016; Demler and Zoeten, 1989; Dodds, 1982; Falk *et al.*, 1979; Okada *et al.*, 2011; Valverde and Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2009) and fungi (Azzam and Gonsalves, 1999; Deng and Boland, 2004; Kousik *et al.*, 1994; Feldman *et al.* 2012; Pecina *et al.*, 2000; Shamoun *et al.*, 2008).

In plants, mixed viral infections often go undetected and can result in inadequate disease diagnoses. An advantage of dsRNAs analysis is that, unlike other virus diagnostic techniques, is nonspecific and therefore it is possible to visualize mixed viral infections (Figure 5). In fungi, mixed infections of mycoviruses are commonly detected

diferenciarlos entre familias y géneros. No obstante, igual que en el caso de los micovirus RNA, los perfiles electroforéticos varían dependiendo de la especie del virus, y son comunes las infecciones mixtas (Figura 4).

La extracción y los análisis electroforéticos de dsRNA se han utilizado extensamente para estudiar importantes virus como el *Virus citrus tristeza* (CTV) (Dodds y Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1993) y el virus de *C. parasitica*, agente causante del cancro del castaño (Casthano *et al.*, 1978; Day *et al.*, 1977; Hansen *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2006). En la literatura existen numerosos ejemplos del uso de dsRNA viral para detectar, identificar y estudiar los virus, los satélites y los DIs que infectan plantas (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; De la

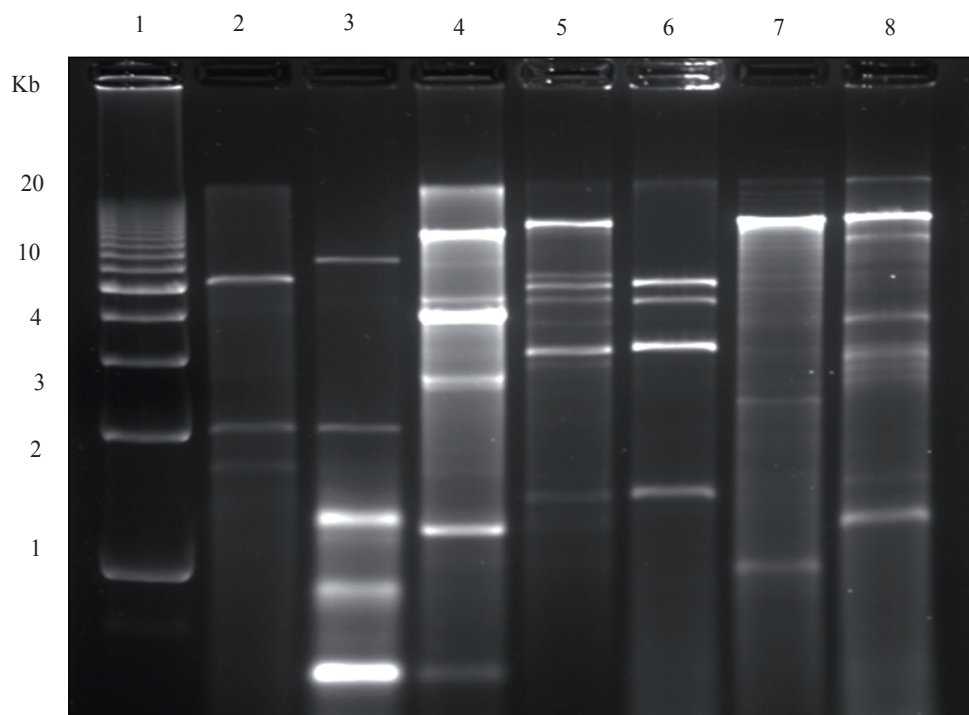


Figure 3. Agarose (1.2 %) gel electrophoresis of dsRNAs extracted from plants infected with different viruses. Lane 1, Molecular weight DNA ladder; lane 2, *Tobacco necrosis virus*; lane 3, *Panicum mosaic virus* and satellite virus; lane 4, *Japanese holly fern mottle virus*; lane 5, *Tobacco mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* mixed infection; lane 6, *Cucumber mosaic virus*; lane 7, TMV; lane 8, *Tomato mild green mosaic virus*.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de dsRNAs extraídos de plantas infectadas con diferentes virus. Carril 1, Peso molecular de la escalera de ADN; carril 2, *Virus de la necrosis del tabaco*; carril 3, *Virus del mosaico del pasto* y *virus satélite*; carril 4, *Virus del moteado del helecho japonés*; carril 5, infección mixta *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Virus del mosaico de la alfalfa* y *Virus del mosaico del pepino*; carril 6, *Virus del mosaico del pepino* (CMV); carril 7, TMV; carril 8, *Virus del mosaico verde suave del tomate*.

by electrophoretic analysis of their dsRNAs (Chu *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2012; Kousik *et al.*, 1994). Another advantage of this technique is that in some cases, strains of the same virus can be differentiated by the mobility or the number of dsRNA fragments after gel electrophoresis. This has been shown with various strains of Tobacco mosaic virus satellite (Valverde and Dodds, 1987). Moreover, gel electrophoretic profiles of viral dsRNA have been used to differentiate strains of *Tomato mosaic virus* (Valverde *et al.*, 1986), CMV (Valverde *et al.*, 1990a), and CTV (Dodds *et al.*, 1987). Nevertheless, in plants, members of the viral

Torre, *et al.*, 2014; 2016; Demler y Zoeten, 1989; Dodds, 1982; Falk *et al.*, 1979; Okada *et al.*, 2011; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2009) y hongos (Azzam y Gonsalves, 1999; Deng y Boland, 2004; Kousik *et al.*, 1994; Feldman *et al.* 2012; Pecina *et al.*, 2000; Shamoun *et al.*, 2008).

En las plantas, las infecciones mixtas virales no son fácilmente detectables y, en consecuencia, se hacen diagnósticos inadecuados. Una ventaja del análisis de dsRNAs es que, a diferencia de otras técnicas de diagnóstico de virus, no es específica y, por tanto, se pueden visualizar las infecciones virales

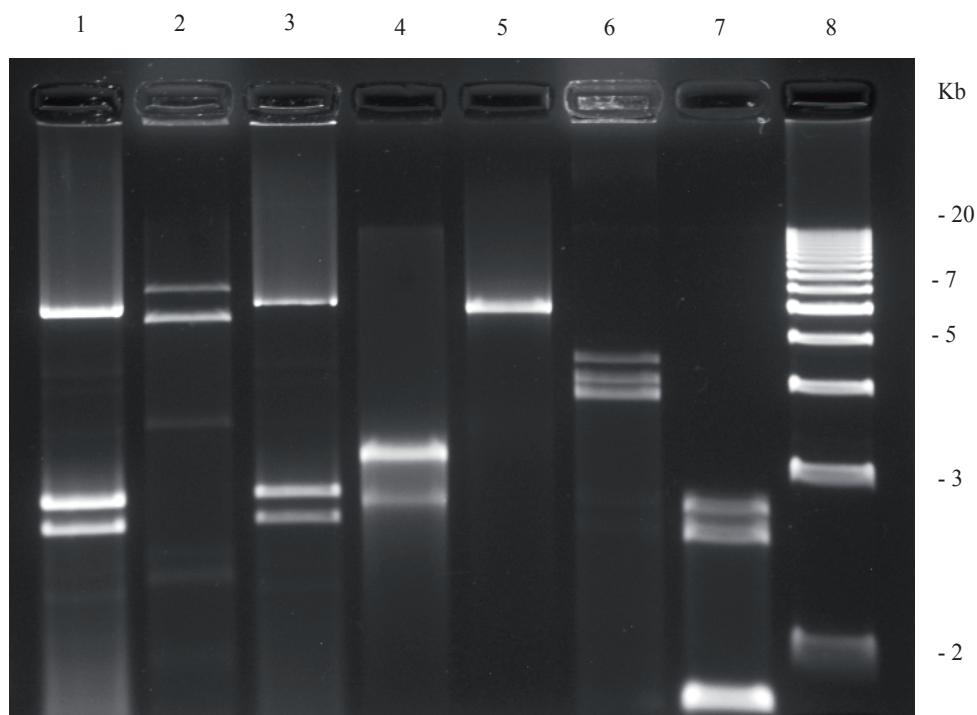


Figure 4. Agarose (1.2 %) gel electrophoresis of dsRNAs extracted from fungi. Lane 1, *Penicillium digitatum* (orange); lane 2, Corn smut; lane 3, *Penicillium digitatum* (mandarin); lane 4, *Diaporthe phaseolorum* isolate B; lane 5, an unidentified totivirus from *D. phaseolorum* isolate C; lane 6, *Penicillium chrysogenum* virus; lane 7, an unidentified virus from *Penicillium stoloniferum*; and lane 8, 1 kb molecular weight DNA ladder.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de dsRNAs extraídos de hongos. Carril 1, *Penicillium digitatum* (naranja); carril 2, tizón del maíz; carril 3, *Penicillium digitatum* (mandarina); carril 4, virus aislado de *Diaporthe phaseolorum* B; carril 5, totivirus no identificado de un aislado de *Diaporthe phaseolorum* C; carril 6, Virus *Penicillium chrysogenum*; carril 7, virus no identificado de *Penicillium stoloniferum*; y carril 8, peso molecular 1 kb de una escalera de ADN.

families *Potyviridae* and *Luteoviridae* generate low amounts of RF and subgenomic dsRNAs (Creamer and Falk, 1989; Dale *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1986) making their detection by electrophoretic analysis impractical.

Molecular probes

Radioactive and non-radioactive probes have been produced by using dsRNA to generate and label ssRNA or cDNAs (Enebak *et al.*, 1994; Jelkmann *et al.*, 1989; Jordan and Dodds, 1983; Rosner *et al.*, 1983; Valverde and Dodds, 1986;

mixtas (Figura 5). En los hongos, las infecciones mixtas de micovirus comúnmente se detectan mediante el análisis electroforético de sus dsRNAs (Chu *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2012; Kousik *et al.*, 1994). Otra ventaja de esta técnica es que en algunos casos se pueden diferenciar las cepas del mismo virus por la movilidad o el número de fragmentos de dsRNA después de la electroforesis en gel. Esto se ha observado con varias cepas del satélite del *Virus del mosaico del tabaco* (Valverde and Dodds, 1987). Además, los perfiles electroforéticos en gel de dsRNA viral se han utilizado para diferenciar cepas del *Virus del mosaico del tomate* (Valverde

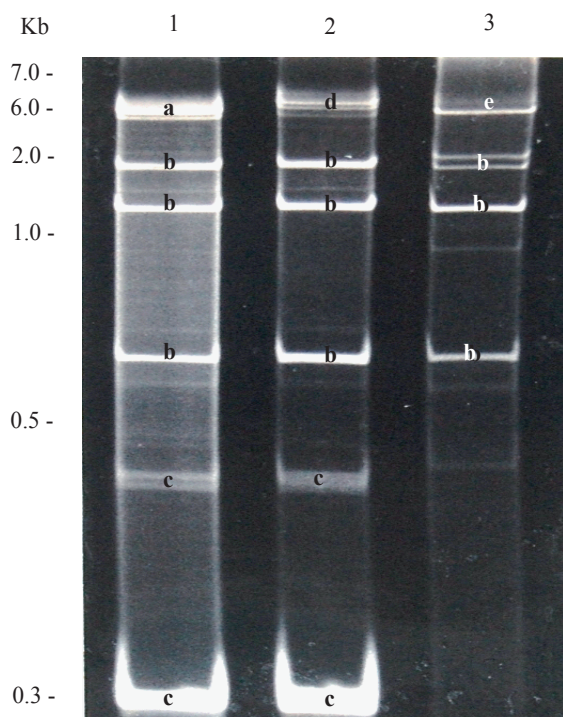


Figure 5. Polyacrylamide (6 %) gel electrophoresis showing dsRNAs extracted from plants with mixed viral infections. Lane 1, *Potato virus X* (PVX), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and satellite RNA of CMV; lane 2, *Dandelion latent virus* (DLV), CMV and satellite RNA of CMV; and lane 3, *Tobacco mosaic virus* (TMV) and CMV. Bands are labelled with letters according to the virus they belong; a, PVX; b, CMV, c, Satellite RNA of CMV; d, DLV, and e, TMV.

Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (6 %) que muestra dsRNAs extraídos de plantas con infecciones virales mixtas. Carril 1, *Virus X* de la papa (PVX), *Virus del mosaico del pepino* (CMV) y RNA satélite; carril 2, *Virus latente del diente de león* (DLV), CMV y RNA satélite; y carril 3, *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) y CMV. Las bandas de DsRNA están marcadas con letras de acuerdo con el virus al que pertenecen; a, PVX; b, CMV, c, RNA satélite; d, DLV, y e, TMV.

Valverde *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990b). Jordan and Dodds used TMV dsRNA to develop P32 end-labelled ssRNA probes and used them successfully in molecular hybridization experiments. Non-radioactive probes have also been prepared by direct labelling ssRNA using dsRNA as the

et al., 1986), CMV (Valverde *et al.*, 1990a), y CTV (Dodds *et al.*, 1987). No obstante, en las plantas, los miembros de las familias virales *Potyviridae* y *Luteoviridae* generan bajas cantidades de RF y dsRNAs subgenómicos (Creamer and Falk, 1989; Dale *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1986), lo cual hace que su detección mediante análisis electrofóricos resulte impráctica.

Sondas moleculares

Se han producido sondas radioactivas y no radioactivas utilizando dsRNA para generar y etiquetar ARN y cDNAs (Enebak *et al.*, 1994; Jelkmann *et al.*, 1989; Jordan y Dodds, 1983; Rosner *et al.*, 1983; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990b). Jordan y Dodds utilizaron TMV dsRNA para preparar sondas marcadas radiactivamente con P^{32} , que utilizaron con buenos resultados en experimentos de hibridación molecular. También se han preparado sondas mediante etiquetado directo de ARN utilizando dsRNA como materia prima (Valverde *et al.*, 1994). Estas sondas no radiactivas se utilizaron para detectar (*Oryza sativa endornavirus*), *Physalis mottle virus*, *Pepper cryptic virus 1*, y micovirus no identificados del patógeno del cancro del tallo de la soya (*Diaaporthe phaseolorum*). Se han utilizado extractos de dsRNA que son transferidos a las membranas para detectar el *Virus del enanismo clorótico del camote* (SPCSV) en (Pio-Ribeiro *et al.*, 1996), *Fiji virus* (Karan *et al.*, 1994), el *Virus satélite del mosaico del tabaco* (Valverde y Dodds, 1986), y un hipovirus 12 kb de *C. parasitica* (Enebak *et al.*, 1994) en ensayos Northern de hibridación.

PCR en transcripción reversa, clonación y secuenciación

Los dsRNAs se han utilizado para clonar y secuenciar fitovirus y micovirus de ARN (Abougha-

starting material (Valverde *et al.*, 1994). These non-radioactive probes were used to detect *Oryza sativa endornavirus*, *Physalis mottle virus*, *Pepper cryptic virus 1*, and an unidentified mycovirus from the soybean stem canker pathogen (*Diaporthe phaseolorum*). DsRNA extracts blotted onto membranes have been used to detect *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) in (Pio-Ribeiro *et al.*, 1996), *Fiji virus* (Karan *et al.*, 1994), Satellite tobacco mosaic virus (Valverde and Dodds, 1986), and a 12 kb hypovirus from *C. parasitica* (Enebak *et al.*, 1994) in northern hybridization assays.

Reverse transcription PCR, cloning, and sequencing

Viral dsRNAs have been used to clone and sequence plant and fungal RNA viruses (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; Antoniw *et al.*, 1986; Bar-Joseph *et al.*, 1983; Enebak *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa and Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Okada *et al.* 2011; Rott and Jelkmann, 2001; Jelkmann *et al.*, 1989; Valverde and Sabanadzovic, 2009; Valverde and Sabanadzovic; Valverde *et al.* 1986; 1990; 2011; Zhang and Rowhani, 2000). Virus specific primers have been developed for RT-PCR detection of most plant and fungal viruses reported to date. After heat denaturation, purified viral dsRNA has been used extensively as the template for reverse transcription PCR (RT-PCR) in plant virus testing (Rott and Jelkmann, 2001; Sabanadzovic and Valverde, 2011; Valverde and Sabanadzovic, 2009; Valverde *et al.*, 2011; Tzanetakis *et al.* 2005). Winter *et al.* (1992) and Hoyer *et al.* (1996) characterized *Sweet potato chlorotic stunt virus* using dsRNA as reagent for RT-PCR, cloning, and labeling. Zhang and Rowhani (2000) developed a rapid cDNA cloning method from dsRNA templates to partially characterized grape viruses. Random cDNA clones from CTV

nem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; Antoniw *et al.*, 1986; Bar-Joseph *et al.*, 1983; Enebak *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa y Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Okada *et al.* 2011; Rott y Jelkmann, 2001; Jelkmann *et al.*, 1989; Valverde y Sabanadzovic, 2009; Valverde y Sabanadzovic; Valverde *et al.* 1986; 1990; 2011; Zhang y Rowhani, 2000). Se han creado iniciadores según el tipo de virus para detectar mediante RT-PCR la mayoría de los fitovirus y los micovirus reportados a la fecha. Después de someterlo a desnaturalización por calor, el dsRNA viral purificado se ha utilizado extensamente como molde para la transcripción reversa de PCR (RT-PCR) en pruebas con fitovirus (Rott and Jelkmann, 2001; Sabanadzovic y Valverde, 2011; Valverde y Sabanadzovic, 2009; Valverde *et al.*, 2011; Tzanetakis *et al.* 2005). Winter *et al.* (1992) y Hoyer *et al.* (1996) caracterizaron el *Virus del enanismo del camote* utilizando un reactivo para la RT-PCR, la clonación y el etiquetado. Zhang y Rowhani (2000) desarrollaron un método rápido de clonación de cDNA a partir de moldes de dsRNA para caracterizar parcialmente virus de uva. Se obtuvieron clones de cDNA al azar de CTV mediante el uso de dsRNA de tejido de corteza de cítricos purificado y desnaturalizado (Albiach-Martí *et al.*, 2010). La clonación molecular de fitovirus se ha realizado a partir de pequeñas cantidades de dsRNA viral después de purificarlo en gel (Jelkmann *et al.*, 1989). Utilizando dsRNA extraído aplicando el método de De Paulo y Powell (1995), Kunta *et al.* (2007), se realizó la RT-PCR y fue posible detectar, clonar y secuenciar el genoma completo del viroide de los cítricos. De manera similar, De la Torre *et al.* (2009; 2015) detectaron viroides en durazno y aguacate utilizando dsRNA extraído con el método de Valverde *et al.*, (1990), después de realizar la RT-PCR. Este método ha sido particularmente útil cuando se hacen pruebas en plantas que se sabe que producen ARN de baja calidad.

were obtained using denatured viral dsRNA purified from citrus bark tissue (Albiach-Martí *et al.*, 2010). Molecular cloning of plant viruses has been accomplished from small amounts of viral dsRNA after gel purification (Jelkmann *et al.*, 1989). Using dsRNA extracted using the method of De Paulo and Powell (1995), Kunta *et al.* (2007) conducted RT-PCR and were able to detect, clone, and sequence full-length viroids in citrus. Similarly, De la Torre *et al.* (2009; 2015) detected viroids in peach and avocado using dsRNA extracted by the method of Valverde *et al.*, (1990) followed by RT-PCR. This approach has been particularly useful, when testing plants species known to yield low quality ssRNA.

DsRNA extraction and purification has been suggested as an approach to increase viral sequences in sample preparation for NGS (Wu *et al.*, 2015). In a metagenomics study of viruses in environmental samples, Roossinck (2012) used dsRNA-enriched samples and detected high levels of persistent viruses in plants. *De novo* assembly of RNAseq results has been accomplished to identify new species of endornaviruses and mycoviruses (Espach *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2015; Khalifa *et al.*, 2016). Using viral dsRNAs, in combination with deep sequencing, researchers have been able to obtain complete genomic sequences of plant and fungal viruses (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Candresse *et al.*, 2013; Coetzee *et al.*, 2010; Dekker and Parker, 2014; Espach *et al.*, 2012; Quito-Avila *et al.*, 2011; Magae, 2012) and to identify virus-like elements in aquatic microbial populations (Nerva *et al.*, 2016). Deep sequencing from a single grapevine revealed a virome dominated by mycoviruses (Al Rwahnih *et al.*, 2011).

Field surveys

Surveys of RNA viruses in plants and fungi have been conducted by extracting dsRNAs, analyzing

Se ha sugerido la extracción y purificación de dsRNA como un método para aumentar las secuencias virales en la preparación de muestras de NGS (Wu *et al.*, 2015). En un estudio metagenómico de virus en muestras ambientales, Roossinck (2012) utilizó muestras concentradas con dsRNA viral y detectó altos niveles de virus persistentes en plantas. El ensamble *De novo* comparando con secuencias de genomas de virus disponibles en la base de datos del NCBI ha permitido identificar nuevas especies de endornavirus y micovirus (Espach *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2015; Khalifa *et al.*, 2016). Utilizando dsRNAs virales, en combinación con secuenciación profunda, los investigadores han podido obtener secuencias genómicas completas de fitovirus y micovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Candresse *et al.*, 2013; Coetzee *et al.*, 2010; Dekker y Parker, 2014; Espach *et al.*, 2012; Quito-Avila *et al.*, 2011; Magae, 2012), e identificar elementos que semejan virus en poblaciones microbianas acuáticas (Nerva *et al.*, 2016). La secuenciación profunda de una sola vid reveló un viroma dominado por micovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2011).

Estudios de campo

Estudios de campo de virus ARN en plantas y hongos se han realizado mediante la extracción de dsRNAs, analizándolos en geles de agarosa o poliacrilamida y utilizándolos en RT-PCR y secuenciación. Los dsRNAs, aislados de 44 vides de un viñedo infectado en Sudáfrica, se utilizaron en un análisis de secuenciación profunda, a fin de realizar un censo de la población viral (Al Rwahnih *et al.*, 2011). En estudios de campo de virus de hongos asociados con la planta parásita (*Cuscuta cuspidata*) y su planta huésped (*Ambrosia psilostachya*) en el hábitat de una pradera de hierbas altas en Oklahoma, los investigadores extrajeron dsRNA para detectar micovirus (Feldman *et al.*, 2012). Los

them in agarose or polyacrylamide gels, and using them for RT-PCR and sequencing. DsRNAs, isolated from 44 vines from a diseased South African vineyard, were used in a deep sequencing analysis to build a census of the viral population (Al Rwahnih *et al.*, 2011). In a survey for viruses from fungi associated with a parasitic plant (*Cuscuta cuspidata*) and its host plant (*Ambrosia psilostachya*) in a tallgrass prairie habitat in Oklahoma, researchers extracted dsRNA to detect fungal viruses (Feldman *et al.*, 2012). The detected viruses were further characterized using reverse transcription-PCR and sequence analysis. A survey for endornaviruses in wild plant species of South Louisiana was conducted using a combination of dsRNA extraction and RT-PCR (Rodrigues de Souto *et al.*, 2015). Of 140 species belonging to 58 plant families, seven were found infected with putative endornaviruses. In Mexico, Piedra *et al.*, (2005) conducted surveys to identify viruses infecting a weed *Leonotis nepetifolia* (*Lamiaceae*) commonly present near cultivated fields. Using dsRNA extraction as a complementary tool, the authors were able to identify infections of *Alfalfa mosaic virus* (AMV), CMV, satellite RNA of CMV, and TMV in this plant species. In a survey for viruses infecting tree tobacco in Southern California, electrophoretic analysis of viral dsRNA was used for virus detection (Valverde and Dodds, 1986). Using dsRNA extraction and electrophoretic analysis, Herrero *et al.*, 2009 conducted a survey of mycoviruses in a collection of 103 isolates belonging to 53 different species of endophytic fungi of grasses and detected dsRNA in 12 isolates.

Plant diseases of unknown etiology

There are several examples of economically important plant diseases of unknown etiology in which the causal agent was elucidated using

virus que se detectaron fueron caracterizados utilizando PCR de transcripción reversa y análisis de secuencia. Se llevó a cabo un estudio de campo de endornavirus en especies de plantas silvestres del sur de Luisiana utilizando una combinación de extracción de dsRNA y RT-PCR (Rodrigues de Souto *et al.*, 2015). De 140 especies pertenecientes a 58 familias de plantas, se encontraron siete infectadas con supuestos endornavirus. En México, Piedra *et al.*, (2005) realizaron estudios de campo para identificar el virus que infecta la maleza *Leonotis nepetifolia* (*Lamiaceae*), comúnmente presente cerca de los campos de cultivo. Utilizando extracción de dsRNA como una herramienta complementaria, los autores identificaron infecciones del *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), CMV, ARN satélite de CMV y TMV en dicha especie de plantas. En un estudio de campo de virus que infectan el árbol del tabaco, en el sur de California, se realizaron análisis electroforéticos de dsRNA viral para la detección de virus (Valverde y Dodds, 1986). Mediante extracción de dsRNA y análisis electroforéticos, Herrero *et al.*, 2009 realizaron un estudio de micovirus en una colección de 103 aislamientos pertenecientes a 53 especies diferentes de hongos endofíticos de pastos, y detectaron dsRNA en 12 aislamientos.

Enfermedades de plantas de etiología desconocida

Existen varios ejemplos de enfermedades de plantas de importancia económica de etiología desconocida en las que el agente causal fue elucidado utilizando dsRNA. El agente causal de la palidosis, una enfermedad de la fresa cuya etiología se desconocía anteriormente, fue identificado como un luteovirus utilizando dsRNA purificado (Tzanetakis *et al.*, 2004; 2005). De manera similar, se determinó que la enfermedad de etiología

dsRNA. The causal agent of pallidosis, a disease of strawberry of previously unknown etiology, was identified to be a luteovirus by using purified dsRNA (Tzanetakis *et al.*, 2004; 2005). Similarly, a disease of unknown etiology affecting Japanese holly fern and leather leaf fern was determined to be caused by a new plant virus species from dsRNA that was used for cloning and sequencing the virus which was later named *Japanese holly fern mottle virus* (Valverde and Sabanadzovic, 2009). Lettuce big vein disease was first shown to be caused by a virus by detection of dsRNAs (Mirkov and Dodds, 1985). In Mexico, the causal agent of a disease of husk tomato (*Physalis ixocarpa*) which consists of foliar yellow mottle was unknown until 2003 when it was confirmed to be AMV by dsRNA analyses (De la Torre *et al.*, 2003).

Persistent plant viruses

Persistent plant viruses, which are often present in asymptomatic plants, have dsRNA banding profiles that could be confused with that of disease causing acute viruses (Roossinck, 2010; Valverde and Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1990). Persistent plant viruses reported to date belong to the families *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Totiviridae*, and *Partitiviridae*, which include members that infect plants and fungi. There is no evidence that these viruses cause disease in plants. The molecular characterization of most persistent plant viruses has been accomplished by starting with genomic or RF dsRNA purification (Fukuhara, 1999; Pfeiffer, 1998; Okada, *et al.*, 2011; 2013; Sabanadzovic and Valverde, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2016; Sabanadzovic *et al.*, 2010; Sabanadzovic *et al.*, 2009). Using a combination of electrophoretic analysis of viral dsRNA and RT-PCR, Khankhum *et al.* (2015) demonstrated that two endornaviruses showed differential infection patterns between gene

desconocida que afecta la hoja del helecho de cuero era causada por una especie nueva de fitovirus. Se utilizó dsRNA para clonar y secuenciar el virus que posteriormente se denominó *Virus del moteado del helecho japonés* (Valverde y Sabanadzovic, 2009). En un principio, mediante la detección de dsRNAs, se descubrió que la enfermedad de las venas grandes de la lechuga era causada por un virus (Mirkov y Dodds, 1985). En México no se conocía el agente causal de la enfermedad de la hoja del tomate (*Physalis ixocarpa*), que consiste en manchas amarillentas en las hojas; fue hasta 2003 cuando mediante análisis de dsRNA se confirmó que era AMV (De la Torre *et al.*, 2003).

Virus persistentes en plantas

Los virus persistentes en plantas, que suelen estar presentes en plantas asintomáticas, tienen perfiles de bandas de dsRNA que podrían confundirse con los perfiles de virus agudos causantes de enfermedades (Roossinck, 2010; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1990). Los virus persistentes en plantas reportados a la fecha pertenecen a las familias *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Totiviridae* y *Partitiviridae*, que incluyen miembros que infectan plantas y hongos. No existe evidencia de que estos virus causen enfermedades en las plantas. La caracterización molecular de muchos de los virus persistentes en plantas se ha realizado a partir de material genómico o purificando RF dsRNA (Fukuhara, 1999; Pfeiffer, 1998; Okada, *et al.*, 2011; 2013; Sabanadzovic y Valverde, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2016; Sabanadzovic *et al.*, 2010; Sabanadzovic *et al.*, 2009). Utilizando una combinación de análisis electroforéticos de dsRNA viral y RT-PCR, Khankhum *et al.* (2015) se demostró que dos endornavirus tenían patrones diferenciales de infección entre los dos centros de domesticación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). La

pools of common bean (*Phaseolus vulgaris*). The presence of persistent viruses in some crop cultivars and wild plant species emphasizes the importance of including samples from symptomless (assumed to be healthy) plants when using the dsRNA technique to detect and identify acute viruses. The dsRNA profiles of three persistent viruses and nucleic acid extracts from two healthy plants are shown in Figure 6.

presencia de virus persistentes en algunos grupos de cultivos y especies de plantas silvestres destaca la importancia de incluir muestras de plantas asintomáticas (supuestamente sanas) cuando se aplique la técnica dsRNA para detectar e identificar virus agudos. En la Figura 6 se muestran los perfiles de dsRNA de tres virus persistentes y extractos de ácido nucleico de dos plantas sanas.

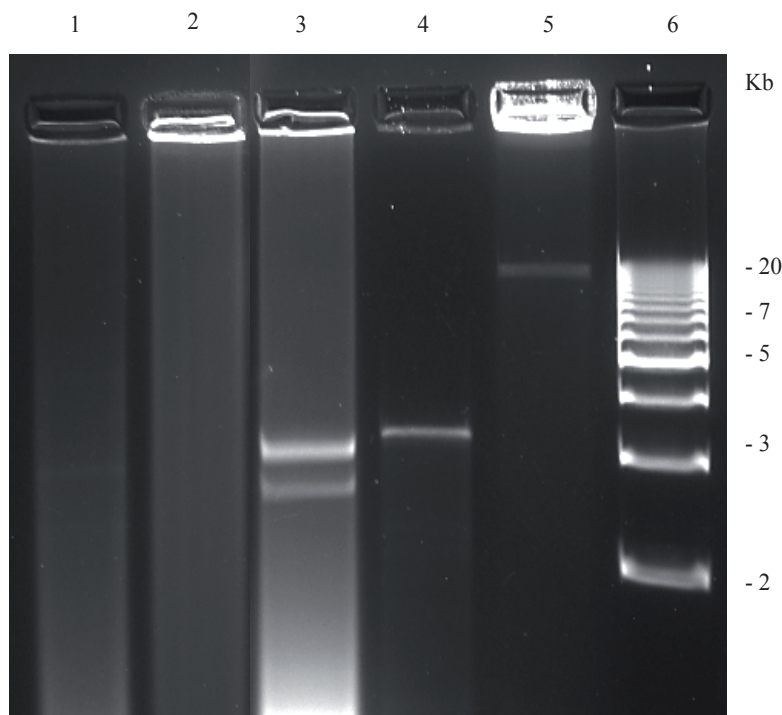


Figure 6. Agarose (1.2%) gelelectrophoresis of dsRNA extracted from symptomless plants. Lane 1, healthy *Phaseolus vulgaris*; lane 2, healthy *Capsicum annuum*; lanes 3-5 plants infected with persistent viruses; lane 3, *Persea americana* infected with a putative chrysovirus; lane 4, *Solanum lycopersicum* infected with Southern tomato virus; lane 5 *Capsicum annuum* infected with Bell pepper endornavirus lane 6 DNA ladder.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de dsRNAs extraídos de plantas asintomáticas. Carril 1, *Phaseolus vulgaris* sana; carril 2, *Capsicum annuum* sana; carriles 3-5 plantas infectadas con virus persistentes; carril 3, *Persea americana* infectada con un supuesto chrysovirus; carril 4, *Solanum lycopersicum* infectado con el Virus sureño del tomate; carril 5 *Capsicum annuum* infectado con endornavirus del pimiento; carril 6 escalera de ADN.

CONCLUSIONS

Although the cellulose-based protocol for the extraction and purification of viral dsRNA from plants and fungi infected with RNA viruses has been around for over 40 years, it still provides diagnosticians and researchers with a practical tool for the study, detection, and identification of viruses. The simplicity and versatility of the technique, combined with modifications that have improved dsRNA yield, quality, and lowered the overall costs, makes it practical for laboratories with limited resources. As pointed out before, the earlier use of this technique was on the electrophoretic analysis of viral dsRNAs and the use of the banding patterns (electrophoretic profiles) to detect, and in some cases, identify the viruses. However, today, the emphasis is more on the use of viral dsRNA for RT-PCR, cloning, and sequencing which leads to virus identification. It is possible that methods for the extraction of viral dsRNAs will have a place in future implementation of NGS for virus detection and identification. This has been demonstrated with the use of dsRNAs to conduct the complete sequencing of viral RNA genomes from plants and fungi and to identify virus-like elements in aquatic microbial populations using NGS (Nerva *et al.*, 2016), deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Coetzee *et al.*, 2010), and a metagenomics study of environmental samples (Roossinck, 2012).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to acknowledge the partial support to RAV by research grant No. US-4725-4 F from BARD, the United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund and the USDA National Institute of Food and Agriculture.

CONCLUSIÓN

Aunque el protocolo basado en celulosa para la extracción y purificación de dsRNA viral de plantas y hongos infectados con virus RNA se ha utilizado por más de 40 años, sigue siendo una herramienta práctica para los especialistas en diagnóstico y los investigadores en el estudio, detección e identificación de virus. Dada la simplicidad y versatilidad de la técnica, combinada con modificaciones que han mejorado la producción y la calidad del dsRNA, y disminuido los costos globales, hace que resulte práctica en los laboratorios con pocos recursos. Como se señaló anteriormente, en un principio esta técnica se aplicó en el análisis electroforético de dsRNAs virales y el uso de los patrones de bandas (perfiles electroforéticos) para detectar, y en algunos casos, identificar los virus. Sin embargo, hoy en día, se pone mayor énfasis en el uso de dsRNA viral para RT-PCR, clonación y secuenciación para la identificación de virus. Es posible que los métodos de extracción de dsRNAs virales lleguen a utilizarse en la implementación de NGS para la detección e identificación de virus. Esto ha sido demostrado con el uso de dsRNAs para realizar la secuenciación completa de genomas de RNA de plantas y hongos, e identificar elementos que se parecen virus en poblaciones microbianas acuáticas utilizando NGS (Nerva *et al.*, 2016), análisis de secuenciación profunda de virus que afectan a la vid (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Coetzee *et al.*, 2010), y un estudio metagenómico de muestras ambientales (Roossinck, 2012).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer el apoyo parcial de RAV mediante la subvención para la investigación No. US-4725-4 F de BARD

LITERATURE CITED

- Aboughanem-Sabanadzovic N, Tzanetakis IE, Lawrence A, Stephenson RC and Sabanadzovic S. 2016. A novel Ilarvirus is associated with privet necrotic ringspot disease in the Southern United States. *Phytopathology* 106:87-93. DOI: 10.1094/PHYTO-12-14-0387-R
- Akin A, Wu CC and Lin TL. 1998. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus. *Journal of Virological Methods* 74:179-184. DOI: 10.1016/S0166-0934(98)00082-2
- Al Rwahnih M, Daubert S, Urbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives of Virology* 156:397-403. DOI: 10.1007/s00705-010-0869-8
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Islas C and Rowhani A. 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology* 105:758-63. DOI: 10.1094/PHYTO-06-14-0165-R
- Albiach-Marti MR, Robertson C, Gowda S, Tatineni S, Belliure B, Garnsey SM, Folimonova SY, Moreno P, and Dawson WO. 2010. The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Molecular Plant Pathology* 11:55-67. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2009.00572.x
- Antoniw JF, Linthorst HJM, White RF and BOL JF. 1986. Molecular cloning of the double-stranded RNA of beet cryptic viruses. *Journal of General Virology* 67:2047-2051. DOI: 10.1099/0022-1317-67-9-2047
- Aramburu J, Navas-Castillo J, Moreno P and Cambra M. 1991. Detection of double-stranded RNA by ELISA and dot immunobinding assay using an antiserum to synthetic polynucleotides. *Journal of Virological Methods* 33:1-11. DOI: 10.1016/0166-0934(91)90002-H
- Atsumi G, Sekine KT and Kobayashi K. 2015. A new method to isolate total dsRNA. *Methods in Molecular Biology* 1236:27-37. DOI: 10.1007/978-1-4939-1743-3_3
- Azzam OI and Gonsalves D. 1999. Detection of dsRNA from cleistothecia and conidia of the grape powdery mildew pathogen *Uncinula necator*. *Plant Disease* 75:964-967. DOI: 10.1094/PD-75-0964
- Balijja A, Kvarnheden A and Turchetti, T. 2008. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods* 152:32-37. DOI:10.1016/j.jviromet.2008.06.001
- Bar-Joseph M, Rosner A, Moskovitz M and Hull R. 1983. A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from viral infected plants. *Journal of Virological Methods* 6:1-8. DOI: 10.1016/0166-0934(83)90062-9
- Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J and Mumford R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* 186:20-31. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.007
- Buck KW. 1999. Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society* del Fondo Binacional Estados Unidos-Israel de Investigación y Desarrollo Agrícolas, y al Instituto Nacional de Alimentación y Agricultura de USDA.

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

- B: Biological Sciences 354:613-627. DOI: 10.1098/rstb.1999.0413
- Burgyan J, Grieco F and Russo M. 1989. A defective interfering RNA molecule in cymbidium ringspot virus infections. *Journal of General Virology* 70:235-239. DOI: 10.1099/0022-1317-70-1-235
- Candresse T, Marais A, Faure C and Gentit P. 2013. Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology* 103:293-308. DOI: 10.1094/PHYTO-10-12-0275-R
- Carbonell A, Ángel-Emilio Martínez de Alba A-E, Flores R and Gago S. 2008. Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371:44-53. DOI: 10.1016/j.virol.2007.09.031
- Castanho B, Butler EE and Shepherd RI. 1978. The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline. *Phytopathology* 68:1515-1519. DOI: 10.1094/Phyto-68-1515
- Castillo A, Cottet L, Castro M and Selpulveda F. 2011. Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology Journal* 8:38. DOI: 10.1186/1743-422X-8-38
- Chen S, Cao L, Huang Q, Qian Y, and Zhou X. 2016. The complete genome sequence of a novel maize-associated totivirus. *Archives of Virology* 161:487. DOI: 10.1007/s00705-015-2657-y
- Choi GH and Nuss DL. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257:800-803. DOI: 10.1126/science.1496400
- Chu Y-M, Lim WS, Yea SY, Cho JD, Lee YW and Kim KH. 2004. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28:135-143. DOI: 10.1023/B:VIRU.0000012270.67302.35
- Coetzee B, Freeborough MJ, Maree HJ, Celton JM, Rees DJG and Burger JT. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400:157-163. DOI: 10.1016/j.virol.2010.01.023
- Condit C and Fraenkel-Conrat H. 1979. Isolation of replicative forms of 3' terminal subgenomic RNAs of tobacco necrosis virus. *Virology* 97:122-30. DOI:10.1016/0042-6822(79)90378-7
- Creamer R and Falk BW. 1989. Characterization of nonspecifically aphid-transmitted aphid CA-RPV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 79:942-946. DOI: 10.1094/Phyto-79-942
- Dale JL, Phillips DA and Parry JN. 1986. Double-stranded RNA in banana plants with bunchy top disease. *Journal of General Virology* 67:371-375. DOI: 10.1099/0022-1317-67-2-371

- Day PR, Dodds JA, Elliston JE, Jaynes RA and Anagnostakis SI. 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 67:1393-1396. DOI: 10.1094/Phyto-67-1393
- De la Torre AR, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2016. First report of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and CARNA-5 in carnation in Mexico. *Plant Disease* 100:1509. DOI: org/10.1094/PDIS-01-16-0110-PDN
- De la Torre AR, Sánchez NJ, Pallás V. 2014. Detección del *Prunus necrotic ringspot virus* en durazno (*Prunus persica* (L.) en México y caracterización molecular de su componente ARN-3. *Agrociencia* 48:583-598.
- De la Torre AR, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2015. First report of *Peach latent mosaic viroid* in peach trees from Mexico. *Plant Disease* 99:899. DOI: org/10.1094/PDIS-01-15-0005-PDN
- De la Torre AR, Salazar-Segura M and Valverde RA. 2003. Etiología del moteado amarillo del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) en México. *Agrociencia* 37:227-289.
- De la Torre AR, Teliz-Ortiz D, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202. DOI: org/10.1094/PDIS-93-2-0202B
- Deker CJ and Parker R. 2014. Analysis of double-stranded RNA from microbial communities identifies double-stranded RNA virus-like elements. *Cell Reports* 7:898-906. DOI: doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.049
- Delye C and Corio-Costet M-F. 1998. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. *Journal of Virological Methods* 74:149-153. DOI: 10.1016/S0166-0934(98)00079-2
- Demler SA and de Zoeten GA. 1989. Characterization of a satellite RNA associated with pea enation mosaic virus. *Journal of General Virology* 70:1075-1084. DOI: 10.1099/0022-1317-70-5-1075
- Deng F and Boland GJ. 2004. A satellite RNA of *Ophiostoma novoulmi* mitovirus 3a in hypovirulent isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology* 94:917-923. DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.11.1407
- DePaulo JJ and Powell CA. 1995. Extraction of double-stranded RNA from plant tissues without the use of organic solvents. *Plant Disease* 79:246-248.
- Derrick KS. 1978. Double-stranded RNA is present in extracts of tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. *Science* 199:538-539. DOI: 10.1126/science.622553
- Derrick KS, French RC, Clark CA and Gabriel CJ. 1984. Detection of double-stranded RNA by serologically specific electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 9:293-299. DOI: 10.1016/0166-0934(84)90055-7
- Diaz-Ruiz JR and Kaper JM. 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. III. Little nucleotide sequence homology between CARNA 5 and helper RNA. *Virology* 80:204-13. DOI: 10.1016/0042-6822(77)90393-2
- Diaz-Ruiz JR and Kaper JM. 1978. Isolation of viral double-stranded RNAs using LiCl fractionation procedure. *Preparative Biochemistry* 8:1-17. DOI: 10.1080/00327487808068215
- Dickinson MJ and Pryor A. 1989. Isometric virus-like particles encapsidate the double-stranded RNA found in *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita*, and *Puccinia sorghi*. *Canadian Journal of Botany* 67:3420-3425. DOI: 10.1139/b89-417
- Dodds JA. 1982. Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118:235-240. DOI: 10.1016/0042-6822(82)90338-5
- Dodds JA and Bar-Joseph M. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology* 73:419-423. DOI: 10.1094/Phyto-73-419
- Dodds JA, Morris TJ and Jordan RL. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22:151-168. DOI: 10.1146/annurev.py.22.090184.001055
- Dodds JA, Jarupat T, Lee JG and Roistacher CN. 1987. Effect of host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of Citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77:442-447. DOI: 10.1094/Phyto-77-442
- Dodds JA, Valverde RA and Matthews DM. 1988. Detection and interpretation of dsRNAs. Pp 309-326. *In*: Koltin Y and Leibowitz M J (Eds). *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes* Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. p
- Enebak SA, Hillman BI and Macdonald WL. 1994. A hypovirulent isolate of *Cryphonectria parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:590-595. DOI: 10.1094/MPMI-7-0590
- Espach Y, Maree HJ and Burger JT. 2012. Complete genome of a novel endornavirus assembled from next-generation sequence data. *Journal of Virology* 86:13142. DOI: 10.1128/JVI.02538-12
- Feldman TS, Morsy MR and Roossinck MJ. 2012. Are communities of microbial symbionts more diverse than communities of macrobial hosts? *Fungal Biology* 116:465-477. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.01.005
- Franklin RM. 1966. Purification and properties of replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 55:1504-1511.
- Fukuhara T. 1999. Double-Stranded RNA in rice. *Journal of Plant Research* 112:131-138. DOI: 10.1007/PL00013855
- Fukuhara T, Koga R, Aoki N, Yuki C, Yamamoto N, Oyama N, Udagawa T, Horiuchi H, Miyazaki S, Higashi Y, Takeshita M, Ikeda K, Arakawa M, Matsumoto N and Moriyama H. 2006. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Archives of Virology* 151:995-1002. DOI: 10.1007/s00705-005-0688-5
- Ghabrial SA, Caston JR, Jiang DH, Nibert ML and Suzuki N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479:356-368. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.034
- German TL and de Zoeten GA. 1975. Purification and properties of replicative form and replicative intermediates of pea enation mosaic virus. *Virology* 66:172-184. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90188-9
- Habili N and Kaper JM. 1981. Cucumber mosaic virus-associated RNA5. VII. Double-stranded form accumulation and disease attenuation in tobacco. *Virology* 112:250-261. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90630-9

- Hansen DR, Van Alfen NK, Gillies K and Powell WA. 1985. Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicles. *Journal of General Virology* 66:2605-2614. DOI: 10.1099/0022-1317-66-12-2605
- Herrero N, Márquez SS and Zabalgoceazcoa I. 2009. Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Archives of Virology* 154:327-330. DOI: 10.1007/s00705-008-0293-5
- Herrero N, Dueñas E, Quesada-Moraga E, and Zabalgoceazcoa I. 2012. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 78:85238530. DOI: 10.1128/AEM.01954-12. pmid:23001673
- Hillman BI, Foglia R and Yuan W. 2000. Satellite and defective RNAs of *Cryphonectria hypovirus* 3-Grand Haven 2, a virus species in the family *Hypoviridae* with a single open reading frame. *Virology* 276:181-189. DOI:10.1006/viro.2000.0548
- Ho T and Tzanetakis IE. 2014. Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology* 471-473:54-60. DOI: 10.1016/j.virol.2014.09.019
- Horiuchi H, Fukuhara T. 2004. Putative replication intermediates in Endornavirus, a novel genus of plant dsRNA viruses. *Virus Genes* 29:365-375. DOI: 10.1007/s11262-004-7441-0
- Hoyer U, Maiss E, Jelkmann W, Lesemann D-E and Vetten J. 1996. Identification of the coat protein of sweet potato sunken vein closterovirus isolate from Kenya and evidence of serological relationship among geographically diverse closterovirus isolates from sweet potato. *Phytopathology* 86: 744-750. DOI: 10.1094/Phyto-86-744
- Huang Q, Baum L and Fu WL. 2010. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory* 56:149-152.
- Jackson AO, Mitchell DM and Siegel A. 1971. Replication of tobacco mosaic virus. I. Isolation and characterization of double-stranded forms of ribonucleic acid. *Virology* 45:182-191. DOI: 10.1016/0042-6822(71)90125-5
- Jelkmann W, Martin RR and Maiss E. 1989. Cloning of four viruses from small quantities of double-stranded RNA. *Phytopathology* 79:1250-1253. DOI: 10.1094/Phyto-79-1250
- Jo Y, Choi H and Cho WK. 2015. *De novo* assembly of a Bell pepper endornavirus genome sequencing RNA sequencing data. *Genome Announcements* 3 no. 2. DOI: 10.1128/genomeA.00061-15
- Jordan RL and Dodds JA. 1983. Hybridization of 5'-end labelled RNA to plant viral RNA in agarose and acrylamide gels. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:33-37.
- Kaper JM and Diaz-Ruiz JR. 1977. Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA 5. *Virology* 80:214-17. DOI: 10.1016/0042-6822(77)90394-4
- Karan M, Dale JL, Bateson MF, Harding RM and Teakle DS. 1994. Detection and characterization of pangola stunt Fijivirus from Australia using cloned eDNA probes. *Archives of Virology* 135:397-404. DOI: 10.1007/BF01310023
- Khankhum S, Escalante C, Rodrigues de Souto E, De la Torre R and Valverde RA. 2015. A method for the extraction of viral double stranded RNA from relative small amounts of virus and fungus infected plant tissues. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:S 223 (Suplemento).
- Khalifa ME and Pearson MN. 2014. Molecular characterization of an endornavirus infecting the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research* 189:303-309. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.06.010
- Khalifa ME, Varsani A, Ganley AR and Pearson MN. 2016. Comparison of Illumina de novo assembled and Sanger sequenced viral genomes: A case study for RNA viruses recovered from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research* 219:51-57. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.11.001
- Kim Y-J, Park S-H, Yie S-W and Kim K-H. 2005. RT-PCR Detection of dsRNA Mycoviruses Infecting *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* Murrill. *The Plant Pathology Journal* 21:343-348. DOI: 10.5423/PPJ.2005.21.4.343
- Klein A and Reichman ME. 1970. Isolation and characterization of two species of double-stranded RNA from tobacco leaves doubly infected with tobacco necrosis and satellite tobacco necrosis viruses. *Virology* 42:269-72. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90268-0
- Kondo H, Hisano S, Chiba S, Maruyama K, Andik IB, Toyoda K, Fujimori F and Suzuki N. 2016. Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. *Virus Research* 213:353-364. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.11.015 0168-1702
- Kousik CS, Snow JP and Valverde RA. 1994. Comparison of double-stranded RNA components and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and AG-1 IB. *Phytopathology* 84:44-49. DOI: 10.1094/Phyto-84-44
- Kovalskaya N and Hammond RW. 2014. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228:48-60. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.05.006
- Kunta M, da Graça JV and Skaria M. 2007. Molecular detection and prevalence of citrus viroids in Texas. *HortScience* 42:600-604.
- Kwon S-J, Lim W-S, Park S-H, Park M-R and Kim K-H. 2007. Molecular characterization of a dsRNA mycovirus, *Fusarium graminearum* virus-DK21, which is phylogenetically related to Hypoviruses but has a genome organization and gene expression strategy resembling those of plant potex-like viruses. *Molecules and Cells* 23:304-315. DOI: 10.1007/s10059-009-0112-1
- Lee SH, Moon BJ and Lee JK. 2006. Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, isolated in Korea. *Mycobiology* 34:61-66. DOI: 10.4489/MYCO.2006.34.2.061
- Li W, Zhang T, Sun H, Deng Y, Zhang A, Chen H and Wang K. 2014. Complete genome sequence of a novel endornavirus in the wheat sharp eyespot pathogen *Rhizoctonia cerealis*. *Archives of Virology* 159:1213-1216. DOI: 10.1007/s00705-013-1893-2
- Libonati M and Sorrentino S. 1992. Revisiting the action of bovine ribonuclease A and pancreatic-type ribonucleases

- on double-stranded RNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 117:139-151. DOI: 10.1007/BF00230753
- Libonati M, Casarna N and Furia A. 1980. Double-stranded RNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 31:147-164. DOI: 10.1007/BF00225848
- Liu L, Wang Q, Cheng J, Fu Y, Jiang D and Xie J. 2015. Molecular characterization of a bipartite double-stranded RNA virus and its satellite-like RNA co-infecting the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* 6:406. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00406
- Li L, Liu J, Xu A, Wang T, Chen J and Zhu X. 2013. Molecular characterization of a trisegmented chrysovirus isolated from the radish *Raphanus sativus*. *Virus Research* 176:169-78. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.06.004
- Magae Y. 2012. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*. *Virology Journal* 9:60. DOI: 10.1186/1743-422X-9-60
- Miller WA and Koev G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273:1-8. DOI:10.1006/viro.2000.0421
- Mirkov TE and Dodds JA. 1985. Association of double-stranded ribonucleic acids with lettuce big vein disease. *Phytopathology* 75:631-635. DOI: 10.1094/Phyto-75-631
- Morris TJ and Dodds JA. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858. DOI: 10.1094/Phyto-69-854
- Nerva L, Ciuffo M, Vallino M, Margaria P, Varese GC, Gnani G and Turina M. 2016. Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Research* DOI: 10.1016/j.virusres.2015.10.028
- Nuss DL and Koltin Y. 1990. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 28:37-58. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.000345
- Okada R, Kiyota E, Moriyama H, Fukuhara T and Natsuaki T. 2015. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *Journal of General Plant Pathology* 81:103-107. DOI 10.1007/s10327-014-0575-6
- Okada R, Young CK, Valverde RA, Sabanadzovic S, Aoki N, Hotate S, Kiyota E, Moriyama H and Fukuhara T. 2013. Molecular characterization of two evolutionally distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of General Virology* 93:220-229. DOI 10.1099/vir.0.044487-0
- Okada R, Kiyota E, Sabanadzovic S, Moriyama H, Fukuhara T, Saha P, Roossinck MJ, Severin A and Valverde RA. 2011. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties and occurrence in the genus *Capsicum*. *Journal of General Virology* 92:2664-2673. DOI 10.1099/vir.0.034686-0
- Osman TAM and Buck KW. 1990. Double-stranded RNAs isolated from plant tissue infected with red clover necrotic mosaic virus correspond to genomic and subgenomic single-stranded RNAs. *Journal of General Virology* 71:945-948. DOI: 10.1099/0022-1317-71-4-945
- Pathak KB and Nagy PD. 2009. Defective interfering RNAs: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses* 1:895-919 DOI: 10.3390/v1030895
- Pecina V, Alvarado MJ, Williams H, De la Torre RA and Vandemark GJ. 2000. Detection of double-stranded RNA in *Macrophomina phaseolina*. *Mycologia* 92:900-907. DOI: 10.2307/3761586
- Piedra IE, De la Torre AR, Zuñiga G, Xoconostle CB and Ruiz MR. 2005. *Leonotis nepetifolia*: An important plant virus reservoir in central Mexico. *Phytoparasitica* 33: 480-494. DOI: 10.1007/BF02981397
- Pfeiffer P. 1998. Nucleotide sequence, genetic organization, and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *Journal of General Virology* 79:2349-2358. DOI: 10.1099/0022-1317-79-10-2349
- Quito-Avila DF, Jelkmann W, Tzanetakis I, Keller K and Martin RR. 2011. Complete sequence and genetic characterization of *Raspberry latent virus*, a novel member of the family *Reoviridae*. *Virus Research* 155:397-405. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.11.008
- Reyes PN, Marbán MN, Delgado SF y De la Torre AR. 2003. Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* BERK. y su relación con ARN de cadena doble. *Agrociencia* 37:495-502.
- Rodrigues de Souto E, Escalante C and Valverde RA. 2015. Detection of plant endornaviruses in wild plants of south Louisiana. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:S 224 (Suplemento).
- Romanos MA, Buck KW and Rawlinson CJ. 1981. A satellite double-stranded RNA in a virus from *Gaeumannomyces graminis*. *Journal of General Virology* 57:375-385. DOI: 10.1099/0022-1317-57-2-375
- Roossinck MJ. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annual Review of Genetics* 46, 359-369. DOI: 10.1146/annurev-genet-110711-155600
- Roossinck MJ. 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:1899-1905. DOI: 10.1098/rstb.2010.0057
- Rosner A, Bar-Joseph M, Moscovitz M and Mevarech M. 1983. Diagnosis of specific viral RNA sequences in plant extracts by hybridization with a polynucleotide kinase-mediated <sup>32</sup>P,- labeled double-stranded RNA probe. *Phytopathology* 73:699-702. DOI: 10.1094/Phyto-73-699
- Rott ME and Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420. DOI: 10.1023/A:1011264400482
- Sabanadzovic S and Valverde RA. 2011. Properties of two cryptoviruses from pepper (*Capsicum annum*). *Virus Genes* 43:307-312. DOI: 10.1007/s11262-011-0634-4
- Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic A and Valverde RA. 2010. Novel monopartite dsRNA virus from rhododendron. *Archives of Virology* 155:1859-1863. DOI: 10.1007/s00705-010-0770-5
- Sabanadzovic S, Wintermantel WM, Valverde RA, McCreight JD and Aboughanem-Sabanadzovic N. 2016. *Cucumis melo* endornavirus: Genome organization, host range and co-divergence with the host. *Virus Research* 214:49-58. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.01.001
- Sabanadzovic S, Valverde RA, Brown JK, Martin RR and Tzanetakis IE. 2009. Southern tomato virus: the link

- between the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Virus Research* 140:130-137. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.11.018
- Shamoun SF, Varga A, Valverde RA, Ramsfield T, Sumampong G, Elliott M, Masri S and James D. 2008. Identification and molecular characterization of a new dsRNA virus infecting *Chondrostereum purpureum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30:604-613. DOI: 10.1080/07060660809507561
- Schonborn J, Oberstra J, Breyel BE, Tittgen J, Schumacher J and Lukacs N. 1991. Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Research* 19:2993-3000. DOI: 10.1093/nar/19.11.2993
- Tzanetakis IE, Halgren GB, Keller KE, Hokanson SC, Maas JL, McCarthy PL and Martin RR. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease* 88:383-390. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.4.383
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2008. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *Journal of Virological Methods* 149:167-70. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.014
- Tzanetakis IE, Keller KE and Martin RR. 2005. The use of reverse transcriptase for efficient first-and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *Journal of Virological Methods* 124:73-77. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.11.006
- Valverde RA and Dodds JA. 1986. Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U5 strain and experimentally with the U1 strain of tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 67:1875-1884. DOI: 10.1099/0022-1317-67-9-1875
- Valverde RA and Glascock CB. 1991. Further examination of the RNA and coat protein of spring beauty latent virus. *Phytopathology* 81:401-404. DOI: 10.1094/Phyto-81-401
- Valverde RA and Sabanadzovic S. 2009. A new plant virus with unique properties infecting Japanese holly fern. *Journal of General Virology* 90:2542-2549. DOI: 10.1099/vir.0.012674-0
- Valverde RA, Arancibia RA and Can F. 1994. Nonradioactive probes by direct labelling of ssRNA from dsRNA. *BioTechniques* 17:70-72.
- Valverde RA, Black LL and Dufresne DJ. 1995. A comovirus affecting Tabasco pepper in Central America. *Plant Disease* 79:421-423. DOI: 10.1094/PD-79-0421
- Valverde RA, Dodds JA and Heick JA. 1986. Double stranded RNAs from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* 76:459-465. DOI: 10.1094/Phyto-76-459
- Valverde RA, Nameth ST and Jordan RL. 1990a. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74:255-258. DOI: 10.1094/PD-74-0255
- Valverde RA, Sabanadzovic S and Rush MC. 2011. Identification of *Oryza sativa endornavirus* in rice genotypes from breeding programmes in the United States. *Plant Breeding* 130:271-274. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2010.01778.x
- Valverde RA, Nameth ST, Abdalha AO, Desjardins PR and Dodds JA. 1990b. Indigenous double-stranded RNA from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Science* 67:195-201. DOI: 10.1016/0168-9452(90)90243-H
- Ward LI, Delmiglio C, Hill CF and Clover GRG. 2009. First report of Tobacco ringspot virus on *Sophora microphylla*, a native tree of New Zealand. *Plant Pathology* 58:784. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02125.x
- Wei CZ, Osaki H, Iwanami T, Matsumoto N and Ohtsu Y. 2003. Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. *Journal of General Virology* 84:2431-2437. DOI: 10.1099/vir.0.19098-0
- Winter S, Purac A, Leggett F, Frison EA, Rossel HW and Hamilton RI. 1992. Partial characterization and molecular cloning of a closterovirus from sweet potato infected with the sweet potato virus disease complex from Nigeria. *Phytopathology* 82:869-875. DOI: 10.1094/Phyto-82-869
- Wu Q, Ding S-W, Zhang Y and Zhu S. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology dependent and homology independent algorithms. *Annual Review of Phytopathology* 53:425-44. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120030
- Zelcer A, Weaber KF, Balazs E and Zaitlin M. 1981. The detection and characterization of viral related double-stranded RNAs in tobacco mosaic virus infected plants. *Virology* 113:417-427. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90171-9
- Zhang YP and Rowhani A. 2000. A strategy for rapid cDNA cloning from double-stranded RNA templates isolated from plants infected with RNA viruses using Taq DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 84:59-63. DOI: 10.1016/S0166-0934(99)00126-3

# Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines

## Las cenicillas en cultivos agrícolas de Sinaloa: Situación actual sobre su identificación y líneas futuras de investigación

<sup>1</sup>Rubén Félix-Gastélum\*, <sup>2</sup>Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza, <sup>1</sup>Hugo Beltran-Peña, <sup>1</sup>Miguel Ángel Apodaca-Sánchez, <sup>4</sup>Silvia Espinoza-Matías, <sup>1</sup>María del Carmen Martínez-Valenzuela, <sup>3</sup>Rosa María Longoria-Espinoza, <sup>1</sup>Noel Gerardo Olivas-Peraza, <sup>1</sup>Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Blvd. Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, CP 81223. Los Mochis, Sinaloa, México; <sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional (IPN), Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes N° 250, CP 81101. Guasave, Sinaloa, México; <sup>3</sup>Universidad de Occidente, Unidad Guasave, Departamento de Ciencias Biológicas, Av. Universidad s/n, CP 81120. Guasave, Sinaloa, México; <sup>4</sup>Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. CP 04510, Coyoacán, D.F., México. \*Autor para correspondencia: ruben.felix@udo.mx.

Recibido: 16 de julio 2016.

Aceptado: 20 de octubre 2016.

Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Beltran-Peña H, Apodaca-Sánchez MA, Espinoza-Matías S, Martínez-Valenzuela MC, Longoria-Espinoza RM, Olivas-Peraza NG. 2017. Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 106-129.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1607-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-4)

Primera publicación DOI: 24 de Noviembre, 2016.

First DOI publication: November 24, 2016.

**Resumen.** La presente revisión tiene como objetivo abordar la evolución de los procedimientos para identificar los agentes causales de las cenicillas. Las características morfométricas que se des-

**Abstract.** The present review aims to discuss the evolution of the procedures for the identification of the powdery mildew pathogens. The morphometric characteristics deciphered by light microscopy and scanning electron microscopy, and the availability of molecular tools have contributed to the identification of the anamorph in different species of Erysiphales in various regions around the world. In Sinaloa, the identification of these plant pathogens started in 2005. Applying morphometric studies to the teleomorph and anamorph of the powdery mildew fungus in squash and cucumber allowed the identification of *Podosphaera xanthii* as the causal agent; the anamorph of the same species was also identified in melon, watermelon, bottlegourd, and husk tomato. In subsequent studies, in addition to the morphometric characteristics, the ITS of rDNA

cifran mediante la utilización de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, así como el rango de hospedantes y herramientas moleculares han permitido la identificación del anamorfo en diferentes especies de Erysiphales, en diversas regiones del mundo. En Sinaloa, México, la identificación de este tipo de patógenos inició en 2005. Los estudios morfométricos del teleomorfo y anamorfo en calabaza y pepino permitieron la identificación de *Podosphaera xanthii* en estos hospedantes; el anamorfo del mismo hongo se identificó en melón, sandía, bule y tomatillo recurriendo a las mismas técnicas. En estudios subsiguientes, además de la morfometría se recurrió a los espaciadores transcritos internos (ITS; por su abreviatura en inglés) para la identificación de los anamorfos de *Erysiphe diffusa*, *Erysiphe quercicola* y *Podosphaera pannosa*. Las especies de Erysiphales conocidas a la fecha en Sinaloa son sólo un segmento de muchas de ellas que actualmente atacan a plantas cultivadas y silvestres; por lo que existe espacio para el surgimiento de líneas de investigación direccionadas hacia la etiología, epidemiología y el manejo de este tipo de enfermedades.

**Palabras clave adicionales:** Anamorfo, teleomorfo, microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido, morfometría.

En México, Sinaloa es el principal estado productor de hortalizas. En Sinaloa, durante el 2014, la superficie de siembra de calabacita (*Cucurbita pepo* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) fue de 31,716 ha mientras que la de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y mango (*Mangifera indica* L.) fue de 122,412 ha y 31,180 ha, respectivamente (SAGARPA, 2014). Aun cuando Sinaloa no se ubica como uno de los principales estados

was used for the identification of the anamorph of *Erysiphe diffusa*, *Erysiphe quercicola*, and *Podosphaera pannosa* on bean, mango, and roses, respectively. The known species of Erysiphales at the present time in Sinaloa might be only a segment of many of them infecting cultivated and wild species of plants; thus, there is an immense opportunity to focus research lines on the etiology, epidemiology, and control of this type of diseases.

**Additional keywords:** Anamorph, teleomorph, light microscopy, scanning electron microscopy, morphometry.

In Mexico, Sinaloa is the main vegetable-producing state. In Sinaloa, during 2014, the surface dedicated to the planting of zucchini (*Cucurbita pepo* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), Mexican husk tomato (*Physalis philadelphica* Lam.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) was 31,716 ha, whereas the surface for beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) was 122,412 ha and 31,180 ha, respectively (SAGARPA, 2014). Although Sinaloa is not one of the main producers of roses, the surface planted has increased due to the demand for this ornamental plant. In Sinaloa, fungal diseases constitute one of the main limiting factors in these crops (León-Gallegos, 1988; Cruz-Ortega *et al.*, 1998; Ramírez-Villapudúa *et al.*, 2006; Ramírez-Villapudúa and Sáinz-Rodríguez, 2006) and among the diseases that affect foliage, powdery mildew stands out, since it appears in every agricultural cycle, and its incidence and severity vary with the prevalent weather conditions. Powdery mildew is caused by a group of diverse fungi, complex in shape, reproductive structures, range of hosts, and geographic distribution (Bélanger and Labbé, 2002). They are found in the family Erysiphaceae of the order Erysiphales;

productores de rosas, la superficie de siembra se ha incrementado por la demanda que esta ornamental representa. En Sinaloa, las enfermedades de origen fúngico constituyen uno de los principales factores limitantes en estos cultivos (León-Gallegos, 1988; Cruz-Ortega *et al.*, 1998; Ramírez-Villapudúa *et al.*, 2006; Ramírez-Villapudúa y Sáinz-Rodríguez, 2006) y entre aquellas que afectan al follaje resaltan las cenicillas, las cuales invariablemente se presentan en todos los ciclos agrícolas y su incidencia y severidad varían con las condiciones ambientales prevalentes.

Las cenicillas, también llamadas cenicillas polvorientas o mildiu polvorientos, son causadas por un grupo de hongos diversos, complejos en su forma, en sus estructuras reproductivas, rango de hospedantes y distribución geográfica (Bélanger y Labbé, 2002). Se ubican en la familia Erysiphaceae del orden Erysiphales; son parásitos obligados (biótrofos) y parasitan alrededor de 9,838 especies de plantas que pertenecen sólo a las angiospermas (Amano, 1986). El 93% de las plantas hospedantes son dicotiledóneas, mientras que el 7 % son monocotiledóneas (Takamatsu, 2013).

Los Erysiphales producen ascocarpos esféricos llamados casmotecios (previamente denominados cleistotecios) así como conidióforos e hifas hialinas, septadas uninucleadas, y conidios que al desarrollarse en grandes cantidades sobre las superficies afectadas de la planta forman un polvillo blanco a manera de ceniza, lo que las hace fáciles de reconocer. Dichas estructuras se producen principalmente sobre las hojas, yemas, flores y frutos, y producen haustorios en las células epidermales de sus hospedantes (Boesewinkel, 1980). Su daño en las plantas es lento y son vulnerables a los fungicidas debido al hábito epífita en su interacción con el hospedante (Yarwood, 1973). Aunque las cenicillas son comunes y causan daños considerables en áreas frescas, son aún más comunes y severas en lugares

they are obligate parasites (biotrophes) and they parasitize around 9,838 species of plants that belong only to angiosperms (Amano, 1986). 93 % of host plants are dicotyledons, while 7 % are monocotyledons (Takamatsu, 2013).

Erysiphales produce spherical asci called chasmothecia (previously called cleistothecia), as well as conidiophores and hyaline hyphae, uninuclear septate hyphae, and conidia that form a white ash-like powder when developing in large amounts, making them easily recognizable. These structures are mainly produced on the leaves, buds, flowers, and fruits, and produce haustoria on the epidermal cells of their hosts (Boesewinkel, 1980). They damage plants slowly and are vulnerable to fungicides, due to the epiphytic habit in its interaction with the host (Yarwood, 1973). Although mildew is common and causes considerable damage in cool areas; they are even more common and severe in areas with warm, dry climates, because in these conditions the wind easily detaches and spreads the conidia (Romero-Cova, 1988); also, it has been established that mildew presents itself in the succulent tissue of the host in cool, shady areas (Yarwood, 1973). The lives of conidia are brief and they are favored by high relative humidity, but not by rain and immersion in water (Sivapalan, 1993a; Sivapalan, 1993b). In general, the mycelium is epiphytic, except in genera *Leveillula*, *Phyllactinia*, *Pleochaeta* where the mycelium is hemi-endophytic, and occasionally in species of *Cystotheca*; in this case, hyphae penetrate the leaves through the stomata and form mycelia inside, although the mycelia of the species of *Leveillula* are more abundant inside the leaf of the host (Braun *et al.*, 2002).

The development of the taxonomy of Erysiphales is vast and controversial and has been widely discussed in many publications (Braun, 1999; Braun *et al.*, 2002; Braun y Cook, 2012). In



con clima cálido y seco, porque en estas condiciones el viento fácilmente desprende y disemina los conidios (Romero-Cova, 1988); además se ha establecido que, las cenicillas se presentan en tejido succulento del hospedante en ambientes sombreados y frescos (Yarwood, 1973). La vida de los conidios es corta y les favorecen altos niveles de humedad relativa, pero no son favorecidos por lluvia e inmersión en agua (Sivapalan, 1993a; Sivapalan, 1993b). En general, el micelio es epifítico excepto en los géneros *Leveillula*, *Phyllactinia*, *Pleochaeta* el micelio es hemiofítico y ocasionalmente en especies de *Cystotheca*; en este caso, las hifas penetran las hojas a través de los estomas y forman micelio en el interior, sin embargo, el micelio de las especies de *Leveillula* es más abundante en el interior de la hoja del hospedante (Braun *et al.*, 2002).

El desarrollo de la taxonomía de los Erysiphales es basta y controversial y ha sido ampliamente discutida en un gran número de publicaciones (Braun, 1999; Braun *et al.*, 2002; Braun y Cook, 2012). En años recientes, con base en filogenia molecular, se ha demostrado que los Erysiphales pertenecen a los Leotiomycetes (Discomycetes inoperculados) y no a los Pirenomyces como se consideró durante muchos años (Glawe, 2008). Con los trabajos clásicos sobre los Erysiphales (Yarwood, 1957), era imposible referirse al anamorfo de los agentes causales de la cenicilla; sin embargo, el surgimiento de trabajos como los de Boesewinkel (1980) y Braun y Cook (2012) contribuyó al conocimiento del anamorfo y la relación de éste con el teleomorfo; estos autores introdujeron nuevos caracteres y un concepto de especie más amplio y natural; al mismo tiempo demostraron que muchas especies de cenicillas tienen un rango de hospedantes más amplio que el que se conoce.

Como lo establece Boesewinkel (1980), en la naturaleza las cenicillas se encuentran principalmente en su fase asexual. En ocasiones los

recent years, based on molecular phylogenetics, it has been shown that Erysiphales belong to the Leotiomycetes (unoperculated Discomycetes) and not to the Pirenomyces, as believed for many years (Glawe, 2008). With the classical works on the Erysiphales (Yarwood, 1957), it was impossible to refer to the anamorph of the causal agents of powdery mildew; however, research carried out by Boesewinkel (1980) and Braun and Cook (2012) contributed to the knowledge of the anamorph and its relation with the teleomorph; these authors introduced new characteristics and a wider and more natural concept of species, while showing that many powdery mildew species have a wider range of hosts than is known.

As established by Boesewinkel (1980), powdery mildews in nature are mainly found in their asexual phase. Occasionally, researchers underestimate a wide variety of morphological characteristics in the anamorphs, which are useful for identifying species. The structures considered include: the location of the mycelium in the host; the diameter and color of the hyphae; the characteristics of the haustoria, appressoria and their location in the mycelium; simple or branched conidiophores; individual conidia production or in chain; characteristics of the basal cell of the conidiophores; the shape of the conidia which varies from oval to cylindrical or lanceolated; as well as the presence of fibrosin bodies in the conidia (Boesewinkel, 1980). In most species, conidia are monomorphic, although the species *Leveillula*, *Pleochaeta* (Braun *et al.*, 2002) and *Phyllactinia* (Liberato, 2007) produce dimorphic conidia.

In Erysiphales, many species are related to certain plant families and genera, which is also useful in the process of identifying anamorphs. The morphological characteristics were combined and codes were created to identify members of the family Erysiphaceae (Boesewinkel, 1980). Later,

investigadores subestiman una amplia variedad de características morfológicas en los anamorfos, las cuales son útiles para la identificación a nivel especie. Las estructuras que se consideran, entre otras son: la ubicación del micelio en el hospedante; el diámetro y coloración de las hifas; las características de los haustorios, apresorios y su ubicación en el micelio; los conidióforos simples o ramificados; la producción individual o en cadena de conidios; las características de la célula basal del conidióforo; la forma de los conidios que varía desde ovoides a cilíndricos o lanceolados; así como, la presencia de cuerpos de fibrosina en los conidios (Boesewinkel, 1980). En la mayoría de las especies los conidios son monómorficos, aunque las especies de *Leveillula*, *Pleochaeta* (Braun *et al.*, 2002) y *Phyllactinia* (Liberato, 2007) producen conidios dimórficos.

En los Erysiphales, muchas especies están asociadas a ciertas familias y géneros de plantas lo que también es de utilidad en el proceso de identificación del anamorfo. Las características morfológicas se conjugaron y se elaboraron claves para la identificación de miembros de la familia Erysiphaceae (Boesewinkel, 1980). Posteriormente, el microscopio electrónico de barrido mostró que la pared de los conidios turgentes presenta una amplia variación (desde lisos hasta con diversas ornamentaciones) y cuando están deshidratados sus patrones de arrugamiento sinuoso, pueden ser longitudinales o transversales, reticulados, lineales, rectangulares, entre otros (Braun *et al.*, 2002). De igual manera, se encontraron diferentes patrones en la ornamentación del extremo del conidio, las cuales difieren de aquellas del resto del conidio (Cook *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2002; Braun y Cook, 2012). Algunos autores sostienen que las características de la pared celular son constantes pues se forman desde las capas interiores de la misma (Plumb y Turner, 1972), lo que contrasta con los apéndices del casmotecio,

the scanning electron microscope showed that the wall of the turgid conidia presents a wide variation (from smooth to diversely ornamented) and when they are dehydrated their sinuous wrinkling patterns can be longitudinal or transverse, reticulated, linear, or rectangular, among others (Braun *et al.*, 2002). Likewise, different patterns were found in the ornamentations of the end of the conidia, which differ from those of the rest of the conidia (Cook *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2002; Braun and Cook, 2012). Some authors claim that the cell wall characteristics are constant, since they form from its inner layers (Plumb and Turner, 1972), which contrasts with the appendices of the chasmothecium, which are modifiable by age and environmental factors (Cook *et al.*, 1997).

The Erysiphales taxonomy manual (Braun and Cook, 2012) locates tribes and genera and considers the morphology of the teleomorph, conidial germination and the characteristics of their walls under the electron microscope; it contains codes based on the characteristics of the anamorph, as well as codes for the anamorph only. In an orderly fashion, it shows codes for species in each genus, as well as tabular codes for species based on the families and genera of the hosts. The location of the tribes and genera is based on the recent phylogenetic classification of Erysiphales and describe 873 species that include 853 figures. This work undoubtedly contributes to the identification of the causal agents of mildew.

Identifying Powdery mildews can be difficult, depending on the reproductive state of the fungus (Braun and Cook, 2012), making molecular tools very useful, particularly if applied to specimens in which the teleomorph is not observed, as well as in herbarium material (Cunnington *et al.*, 2003). In taxonomical studies at a molecular level, the region of the internal transcript spacers (ITS) of the ribosomal DNA (rDNA) can be very

los cuales son modificables por la edad y factores ambientales (Cook *et al.*, 1997).

El manual de taxonomía de los Erysiphales (Braun y Cook, 2012) ubica las tribus y géneros, y considera la morfología del teleomorfo, la germinación de los conidios y las características de la pared de éstos bajo el microscopio electrónico; contiene claves con base en las características del anamorfo y teleomorfo, y presentan claves adicionales únicamente para el anamorfo. De manera ordenada muestra claves para especies en cada género, así como claves tabulares para especies con base en las familias y géneros de los hospedantes. La ubicación de las tribus y géneros se basa en la clasificación filogenética molecular reciente de los Erysiphales y se describen 873 especies que incluyen 853 figuras. Esta obra sin duda contribuye a la identificación de los agentes causales de las cenicillas.

La identificación de las cenicillas resulta difícil dependiendo del estado reproductivo del hongo (Braun y Cook, 2012), de ahí que las herramientas moleculares sean de gran utilidad, particularmente si se aplican a especímenes donde no se presenta el teleomorfo, así como en material de herbarios (Cunnington *et al.*, 2003). En los estudios taxonómicos a nivel molecular, la región de los espaciadores transcritos internos (ITS; por su abreviatura en inglés) del ADN ribosomal (ADNr) pueden ser de utilidad para relacionar el anamorfo de los especímenes con su respectivo teleomorfo. Estudios al respecto indican que al secuenciar las regiones del ITS de 25 especímenes anamorfos y al compararse con el ITS de sus potenciales teleomorfos, en la mayoría de los casos arrojaron similitudes mayores de 99 %; aun cuando el estudio no fue concluyente para algunos especímenes, esta técnica provee información que al complementarse con

useful to relate the anamorph of the specimens with their respective teleomorphs. Studies on this indicate that sequencing the regions of the ITS in 25 anamorphic specimens, and comparing them with the ITS of their potential teleomorphs gave, in most cases, similarities of over 99 %; although the study was not conclusive for some specimens, this technique provides information that, when complemented with the morphology and range of hosts, contributes to the identification of causal agents of mildew, as indicated in previous studies (Cunnington, *et al.*, 2003; Monkhang *et al.*, 2011). The current taxonomical systems resort to the morphological characteristics, the range of hosts, and to the molecular phylogenetic information (Glawe, 2008). The use of ITS and 18S sequences of the rDNA to infer phylogenetic relations of Erysiphales began in the 1990's (Saenz *et al.*, 1994; Saenz and Taylor, 1999).

On the other hand, as in the fungal taxonomy, the nomenclature codes have also changed. In the symposium “One fungus = which name” in Amsterdam in 2012, changes in the nomenclature of pleomorphic fungi were addressed; the conclusion reached was that this type of fungi will be treated as plants and other types of organisms (Braun, 2012), and therefore, the principle “one fungus = one name” is valid as specified in the new Melbourne Code (ICN), Art. 59 (McNeill *et al.*, 2012). This principle is applicable to the nomenclature of the species that cause mildew and the assignment of only the teleomorph in the species of Erysiphales (Braun, 2013) is proposed, implying that only one name will be assigned to each species.

Below is an analysis of the information available on the current situation of mildew in economically important crops in Sinaloa, and we propose lines of investigation on this type of diseases.

morfología y rango de hospedantes, contribuye a la identificación de agentes causales de cenicillas, tal como se indica en trabajos previos (Cunnington, *et al.*, 2003; Monkhung *et al.*, 2011). Los sistemas taxonómicos actuales recurren a las características morfológicas, al rango de hospedantes, así como a la información filogenética molecular (Glawe, 2008). El uso de secuencias ITS y 18S del ADN para inferir relaciones filogenéticas de Erysiphales inició en los años 90 (Saenz *et al.*, 1994; Saenz y Taylor, 1999).

Por otro lado, al igual que en la taxonomía de los hongos, los códigos de nomenclatura también han cambiado. En el simposio “Un hongo = Que nombre” con sede en Amsterdam en 2012, se abordaron cambios en la nomenclatura de los hongos pleomorfos; se concluyó que los hongos de este tipo serán tratados como plantas y otros grupos de organismos (Braun, 2012); por lo tanto, el principio “un hongo = un nombre” es válido como se especifica en el nuevo Código de Melbourne (ICN), Art. 59 (McNeill *et al.*, 2012). Dicho principio es aplicable a la nomenclatura de las especies causantes de cenicilla y se propone asignar únicamente el nombre del teleomorfo en las especies de los Erysiphales (Braun, 2013), lo que implica que se asignará sólo un nombre para cada especie.

A continuación se hace un análisis de la información disponible sobre la situación actual de las cenicillas en cultivos económicamente importantes en Sinaloa y se proponen líneas de investigación sobre este tipo de enfermedades.

## ETIOLOGÍA DE LAS CENICILLAS EN CULTIVOS DE SINALOA

### Cenicilla de las cucurbitáceas

Aun cuando estudios previos habían consignado a *Erysiphe cichoracearum* como agente causal

## ETHIOLOGY OF MILDEW IN PLANTATIONS IN SINALOA

### Cucurbit Powdery Mildew

Although previous studies had confirmed *Erysiphe cichoracearum* as a causal agent of the cucurbit powdery mildew (Alvarez, 1976; Cebreros *et al.*, 1991), the first paper that included morphometry and the teleomorph for the identification of cucurbit mildew in Sinaloa was published in 2005. Using the signs of the pathogen collected from various types of pumpkin, melon, watermelon, and gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley), a morphometric analysis was carried out on both the anamorph and teleomorph, resorting to light microscopes and scanning electron microscopes (Figure 1. A-F). The images of *Euoidium* conidia under the scanning electron microscope, the type of host, and the characteristics of the anamorph helped obtain a preliminary identification of *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Braun and N. Shishkoff, (*sin. Sphaerotheca fuliginea* (Schelechtend.:Fr.) Pollacci) as the species related to cucurbit mildew (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Studies on the teleomorph of different types of pumpkin helped confirm the identity of the fungus, as performed in California, U.S.A (Kontaxis, 1978), although this phase of the organism was not found in melon, gourd, or watermelon, even though commercial plantations of these crops were damaged by mildew and were sometimes adjacent to cucumber or pumpkin plantations where the teleomorph was found (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Later studies on the cucumber mildew in the Valley of Culiacán, Sinaloa helped identify the anamorph and teleomorph of *P. xanthii* in cucumbers, by means of morphological and molecular studies. Also, the presence of physiological breeds 1, 2F, 4, and

de la cenicilla de las cucurbitáceas (Alvarez, 1976; Cebrenos *et al.*, 1991), la primer publicación en la que se incluyó morfometría del anamorfo y el teleomorfo para la identificación de la cenicilla de las cucurbitáceas en Sinaloa, se publicó en 2005. De los signos del patógeno colectados en varios tipos de calabaza, melón, sandía y bule (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley), se realizó un análisis morfométrico tanto del anamorfo como del teleomorfo, recurriendo a microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (Figura 1. A-F). Las imágenes de los conidios tipo *Euoidium* bajo el microscopio electrónico de barrido, el tipo de hospedante y las características del anamorfo permitieron la identificación preliminar de *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Braun y N. Shishkoff, (*sin. Sphaerotheca fuliginea* (Schelechtend.:Fr.) Pollacci) como la especie asociada a la cenicilla de las cucurbitáceas (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Estudios del teleomorfo en diferentes tipos de calabaza permitieron confirmar la identidad del hongo, tal como se realizó en California, EUA (Kontaxis, 1978), pero esta fase del organismo no se encontró en melón, bule y sandía aun cuando plantaciones comerciales de estos cultivos se encontraban dañados por cenicilla y en ocasiones colindaban con lotes de pepino o calabaza donde se encontraba el teleomorfo (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Estudios posteriores sobre la cenicilla del pepino en el Valle de Culiacán, Sinaloa, permitieron la identificación del anamorfo y teleomorfo de *P. xanthii* en pepino, mediante estudios morfológicos y moleculares. Se consignó además, la presencia de las razas fisiológicas 1, 2F, 4, y 5 (Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012). De acuerdo a Ballantyne (1975) *Erysiphe cichoracearum* (*sin. Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V.P. Heluta), *Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud, *Erysiphe communis* (Wallr.) Schldtl., *Erysiphe polygoni* DC. y

5 were also confirmed (Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012). According to Ballantyne (1975) *Erysiphe cichoracearum* (*sin. Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V.P. Heluta), *Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud, *Erysiphe communis* (Wallr.) Schldtl., *Erysiphe polygoni* DC. and *Erysiphe polyphaga* Hammarl. have been found to be related to the disease in other parts of the world; however, these species were not found in the different cucurbits studied in four agricultural cycles (2000 to 2004) in northern Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2005), which coincides with studies on cucumber mildew in the Valley of Culiacán (Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012). However, in the Czech Republic *P. xanthii* and *G. cichoracearum* were found in one species of cucurbit (Lebeda *et al.*, 2004).

The absence of the teleomorph in melon, gourd, and watermelon in Sinaloa is difficult to explain; however, the fungus could be heterotallic, as is the case in *P. xanthii* (McGrath, 1994) and other mildew-causing species (Yarwood, 1935; Schnathorst, 1959; Smith, 1970; Coyier, 1972). Chasmothecia are not formed in all the species and varieties of cucurbitáceas (Khan and Khan, 1970), and in Sinaloa these were found in different types of pumpkins and cucumbers at the end of the cycle (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Previous studies indicate that the formation of chasmothecia begins when the formation of conidia decreases or stops due to the presence of the host, or otherwise by environmental and handling factors, such as limited nourishment conditions, low humidity levels and low temperatures (Yarwood, 1935). Environmental conditions that promote the development of mildew also influence the development of the teleomorph, since a greater foliar area covered by the fungus increases the probabilities of reproduction, and therefore the formation of chasmothecia (Schnathorst, 1965).

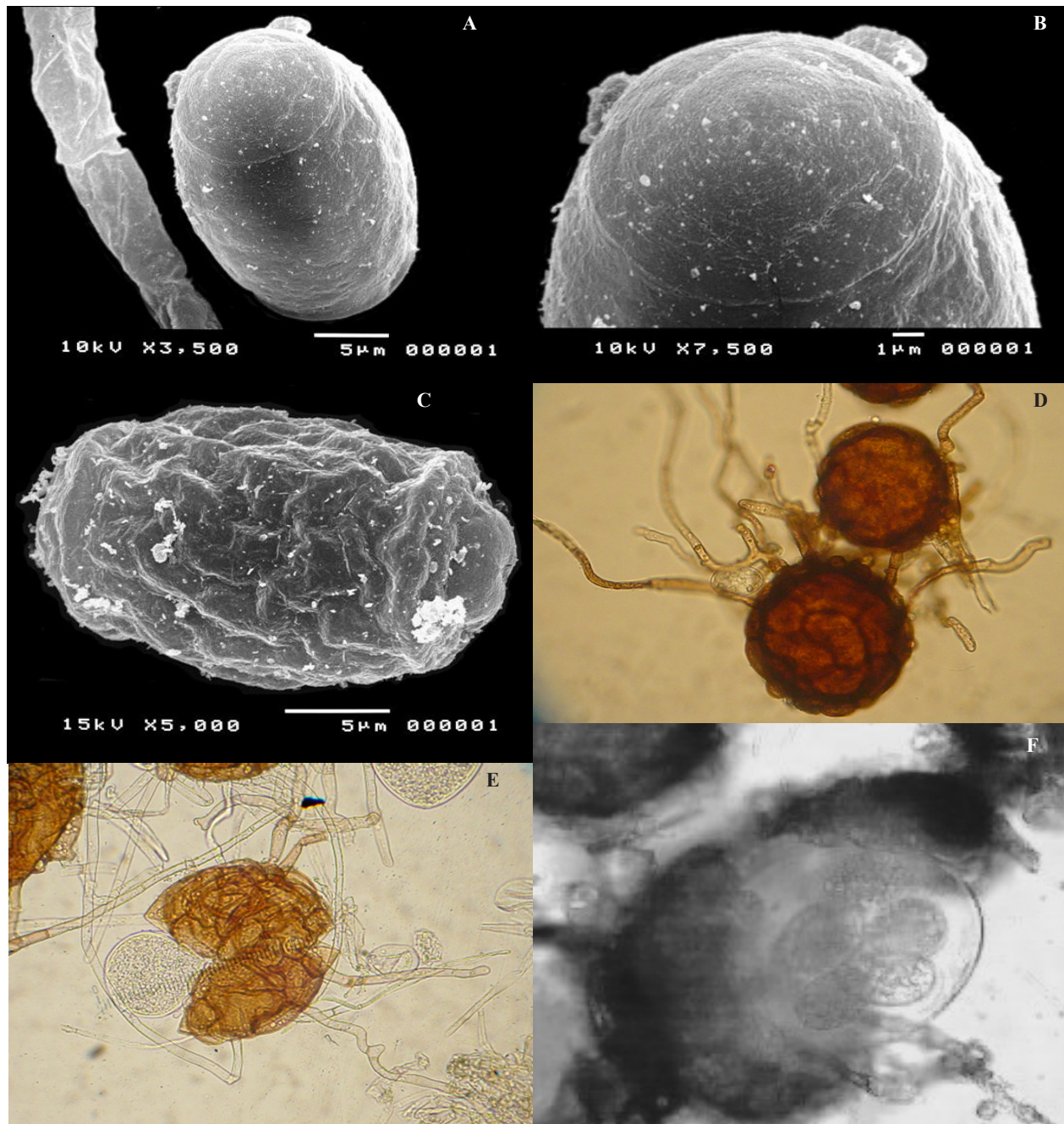


Figura 1. Micrografía con microscopía electrónica de barrido de *Podosphaera xanthii* en calabaza: A) Pared lisa del conidio, B) Parte terminal del mismo con anillos concéntricos tenues y proyecciones lobulares, C) Conidio parcialmente deshidratado con ondulaciones longitudinales y transversales. D) Casmotecios con apéndices miceliales septados. E) Asca hialina inmadura en un casmotecio parcialmente abierto. F) Asca con ascosporas en su interior.

Figure 1. Micrography with a scanning electron microscope of *Podosphaera xanthii* in pumpkin: A) Smooth conidium wall, B) Terminal part of the same structure with faint concentric rings and lobular projections, C) Partially dehydrated conidium with longitudinal and transversal wrinkles. D) Casmotecios with mycelial appendices with septa. E) Immature hyaline ascus in a partially open casmotecio. F) Ascus with ascospores inside.

*Erysiphe polyphaga* Hammarl. se han encontrado asociadas a la enfermedad en otras partes del mundo; sin embargo, estas especies no se encontraron en las diferentes cucurbitáceas estudiadas durante cuatro ciclos agrícolas (2000 a 2004) en el norte de Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2005), lo cual coincide con estudios sobre la cenicilla del pepino en el Valle de Culiacán (Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012). Sin embargo, en la República Checa se encontró a *P. xanthii* y *G. cichoracearum* en una misma especie de cucurbitácea (Lebeda *et al.*, 2004).

La ausencia del teleomorfo en plantas de melón, bule y sandía en Sinaloa resulta difícil de explicar; sin embargo, puede ser que el hongo sea heterotálico tal como sucede en *P. xanthii* (McGrath, 1994) y otras especies causantes de cenicillas (Yarwood, 1935; Schnathorst, 1959; Smith, 1970, Coyier, 1972). Los casmotecios no se forman en todas las especies y variedades de cucurbitáceas (Khan y Khan, 1970); y en Sinaloa éstos se encontraron en los diferentes tipos de calabaza y pepino, al final del ciclo de cultivo (Félix-Gastélum *et al.*, 2005). Estudios previos indican que la formación de casmotecios inicia cuando la formación de conidios disminuye o cesa por la senescencia del hospedante, o bien por factores ambientales y de manejo tales como las condiciones de nutrición limitadas, bajos niveles de humedad y baja temperatura (Yarwood, 1935). Las condiciones ambientales altamente favorables para el desarrollo de las cenicillas también influyen en el desarrollo del teleomorfo, pues a mayor área foliar cubierta por el hongo las probabilidades de apareamiento de los diferentes tipos de compatibilidad se incrementan y con ello la formación de casmotecios (Schnathorst, 1965).

### Cenicilla del tomatillo

(*Physalis philadelphica* Lam.). El agente causal de la cenicilla del tomatillo se identificó como

### Mildew in tomatillo

(*Physalis philadelphica* Lam.). The causal agent of mildew in tomatillo was identified as *P. xanthii* with a study on the morphometric characteristics of the anamorph and images of the conidia under the compound microscope (Figure 2 A and B) and the scanning electron microscope (Fig. 2 C); no structures were found that revealed the presence of the teleomorph of the fungus in infected plants (Félix-Gastélum *et al.*, 2007). Once again it was proven that the characteristics of the anamorph contributed towards the preliminary identification of mildew in tomatillo, as mentioned by other authors (Boesewinkel, 1980; Braun *et al.*, 2002; Braun y Cook, 2012). It is worth pointing out that in the bibliography there are only two reports of this disease: one in California, U.S.A. (Koike and Smith, 1988) and another in Taiwan (Cheng *et al.*, 2006). Preliminary results indicate that the causal agent of pumpkin mildew does not attack tomatillo, nor does mildew in tomatillo attack pumpkin (Félix-Gastélum, results not published), which corresponds with previous studies, which mention that most species that cause powdery mildew are specific to certain hosts; however, there are various species of this group of fungus that have a wide range of hosts, such as *Erysiphe quercicola* S. Takam. and U. Braun, which attacks temperate climate plants and some species of tropical trees (Takamatsu *et al.*, 2007).

### Mildew in beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

Regional literature has referred to *E. polygoni* as a causal agent of the bean plant (León-Gallegos, 1988). The first study to mention the morphometry of the anamorph and de molecular identification of the causal agent of the disease in Sinaloa was published recently (Félix-Gastélum *et al.*, 2011).

*P. xanthii* mediante el estudio de las características morfológicas del anamorfo e imágenes de los conidios bajo el microscopio compuesto (Figura 2 A y B) y el microscopio electrónico de barrido (Figura 2 C); no se encontraron estructuras que revelaran la presencia del teleomorfo del hongo en plantas infectadas (Félix-Gastélum *et al.*, 2007). De nuevo, se demostró que las características del anamorfo contribuyeron en la identificación preliminar de la cenicilla del tomatillo, tal como se menciona por otros autores (Boesewinkel, 1980; Braun *et al.*, 2002; Braun y Cook, 2012). Es importante señalar que, en la literatura sólo existen dos reportes de esta enfermedad: uno en California, EUA (Koike y Smith, 1988) y otro en Taiwán (Cheng *et al.*, 2006).

Faced with the absence of the teleomorph, we resorted to morphometric studies of the anamorfo, which was complemented with images of conidia under a scanning electron microscope (Figure 3. A and B). In addition, the ITS amplification of the rDNA confirmed the causal agent as *Pseudoidium* (Cook *et al.*, 1997), anamorph of *Erysiphe diffusa* (Cooke and Peck) U. Braun and S. Takam. (Takamatsu *et al.*, 2007).

Fortunately, mildew is not an important disease in Azufrado Higuera, the predominant bean variety in the region, but it is severe in creeping bean varieties, which account for less than 10% of the surface planted in Sinaloa. As in Brazil (Almeida *et al.*, 2008), the *E. diffusa* teleomorph has been

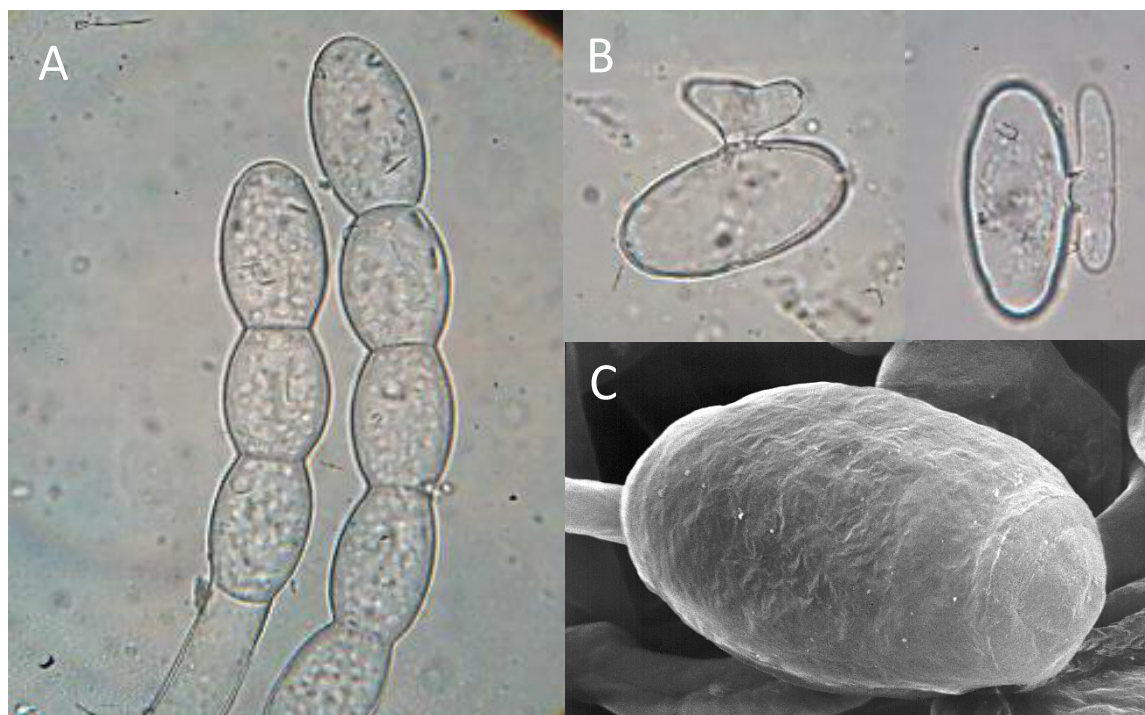


Figura 2. A) Conidióforos tipo *Euoidium* de cenicilla de tomatillo con conidios inmaduros y márgenes crenados característicos de *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii*. B) Conidios con tubo germinativo bifurcado originándose en la parte media del conidio. C) Micrografía con microscopía electrónica de barrido de conidio maduro con pared lisa.  
Figure 2. A) Mildew *Euoidium* conidiophora in tomatillo mildew with immature conidia and crenellated edges, typical of *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii*. B) Conidia with forked germinative tube originating in the middle section of the conidium. C) Micrography with a scanning electron microscope of a mature conidium with a smooth wall.



Resultados preliminares indican que el agente causal de la cenicilla de la calabaza no ataca al tomatillo y la de tomatillo no ataca a calabaza (Félix-Gastélum, resultados no publicados), lo cual coincide con estudios previos donde se menciona que la mayoría de las especies causantes de cenicillas son específicas para ciertos hospedantes; sin embargo, existen varias especies de este grupo de hongos que poseen un amplio rango de hospedantes, como el caso de *Erysiphe quercicola* S. Takam. y U. Braun el cual ataca a plantas de climas templados y algunas especies de árboles tropicales (Takamatsu *et al.*, 2007).

### Cenicilla del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

La literatura regional se ha referido a *E. polygoni* como agente causal de la cenicilla del frijol (León-Gallegos, 1988). El primer estudio donde se aborda la morfometría del anamorfo y la identificación molecular del agente causal de la enfermedad en Sinaloa se publicó en años recientes (Félix-Gastélum *et al.*, 2011). Ante la ausencia del teleomorfo del hongo, se recurrió a estudios morfométricos del anamorfo, lo cual se complementó con imágenes de conidios al microscopio electrónico de barrido (Figura 3. A y B). Adicionalmente, la amplificación de ITS del ADNr confirmó al agente causal como *Pseudoidium* (Cook *et al.*, 1997), anamorfo de *Erysiphe diffusa* (Cooke y Peck) U. Braun y S. Takam. (Takamatsu *et al.*, 2007).

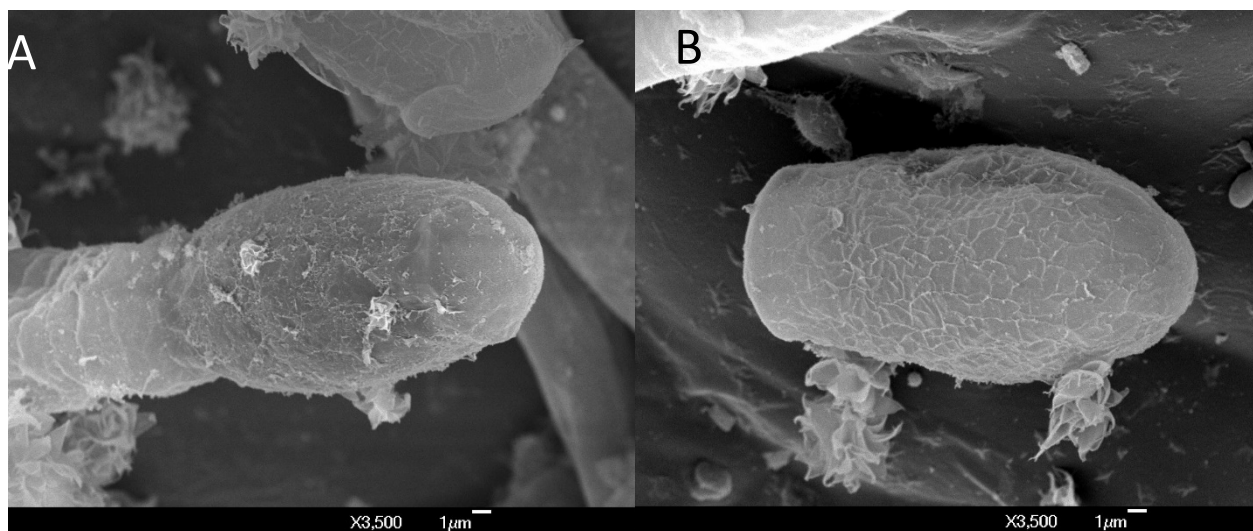
Afortunadamente, la cenicilla no es una enfermedad importante en frijol Azufrado Higuera, la variedad predominante en la región, pero es severa en variedades de frijol de hábito postrado, los cuales representan menos del 10 % de la superficie sembrada en Sinaloa. Al igual que en Brasil (Almeida *et al.*, 2008), el teleomorfo de *E. diffusa* no se ha observado en Sinaloa, por lo que se infiere que algunos hospedantes alternos podrían representar un

observado en Sinaloa, therefore some alternate hosts are inferred to play an important part in the life cycle and survival of the pathogen. Some wild legumes could act as a bridge for the survival of the pathogen in the absence of bean plants. This line of investigation, once explored, will surely contribute to understanding the biology of the pathogen and the epidemiology of the disease.

### Mildew in mango

(*Mangifera indica* L.). Mildew in mango is one of the most common and widespread diseases in the world (Nasir *et al.*, 2014), causing losses of up to 90 % when it appears during flowering (Misra, 2001). In Sinaloa, although sometimes underestimated by producers, this disease can cause losses of up to 70 % when it occurs at the beginning of the flowering period, during the months of January and February. The fungus attacks young tissues, mainly, including leaves, petioles, flower scales, flower buds, and fruits in initial development stages (Singh, 1960), symptoms which have also been observed in Sinaloa for decades. Regional literature referred to *Oidium mangiferae* Berthet as a causal agent of the disease for many years (Ramírez-Villapudúa *et al.*, 2006).

Based on morphometric studies, images of conidia under a scanning electron microscope (Figure 4 A y B), as well as molecular studies and phylogenetic analyses of the anamorph, the causal agent of the disease in Sinaloa was established to be *Pseudoidium anacardii* (F. Noack) U. Braun and R.T.A. Cook with *E. quercicola* as a teleomorph (Félix-Gastélum *et al.*, 2013). As in other mango-producing areas of the world (Nasir *et al.*, 2014), in northern Sinaloa the teleomorph was not found in specimens collected in mango vars. Kent and Keith in commercial or backyard orchard trees (Félix-Gastélum *et al.*, 2013). In other parts of



**Figura 3.** Micrografía con microscopía electrónica de barrido de *Erysiphe diffusa* en frijol: A) Conidio inmaduro unido al conidióforo tipo *Pseudoidium* y B) Conidio maduro, con reticulación en su pared.  
**Figure 3.** Micrography with a scanning electron microscope of *Erysiphe diffusa* in bean plants: A) Immature conidium joined to the *Pseudoidium* conidium, and B) Mature conidium, with a cross-link on its wall.

papel importante en el ciclo de vida y supervivencia del patógeno. Algunas leguminosas silvestres podrían actuar como puente para la sobrevivencia del patógeno en ausencia de frijol. Esta línea de investigación, una vez explorada, seguramente contribuirá al entendimiento de la biología del patógeno y a la epidemiología de la enfermedad.

#### **Cenicilla del mango (*Mangifera indica* L.).**

La cenicilla del mango es una de las enfermedades más comunes y más ampliamente diseminadas en el mundo (Nasir *et al.*, 2014), causando pérdidas hasta del 90 % cuando se presenta en floración (Misra, 2001). En Sinaloa, aunque en ocasiones subestimada por los productores, esta enfermedad puede causar hasta 70 % de pérdidas cuando ocurre al inicio de la floración durante los meses de enero y febrero. El hongo ataca principalmente al tejido joven incluyendo hojas, peciolas, escamas florales, yemas florales, y frutos en estados iniciales

the world, the fungus hibernates as mycelia or haustoria in buds or where it can remain in the dense tree canopies (Nasir *et al.*, 2014); its form of survival during the summer in Sinaloa is unknown. Dilucidating the form of survival of the *P. anacardii* anamorph remains as a future line of research. On the other hand, studies carried out in Guerrero and Michoacan indicated that the maximum severity of mildew in mango coincided with periods with temperatures of 20 °C and a relative humidity of 22-60 % in the first two flowering flushes; however, the third flush coincided with temperatures of 20-25 °C and a relative humidity of 60-80 %. Phenological stages 1 to 6 (swollen bud and elongation of panicles) behaved as tolerant, whereas stages 7 and 8 (floral opening) were considered susceptible and 9, 10 and 11 (full bloom and fruit growth) as highly susceptible (Guillen-Sánchez *et al.*, 2004). The efficient handling of powdery mildew in mango in Sinaloa requires the implementation of this type of studies, which integrate the relationship

de desarrollo (Singh, 1960), síntomas que también se han observado en Sinaloa desde hace décadas. La literatura regional se refirió a *Oidium mangiferae* Berthet como agente causal de la enfermedad durante muchos años (Ramírez-Villapudúa *et al.*, 2006).

Con base en estudios morfométricos, imágenes de conidios al microscopio electrónico de barrido (Figura 4 A y B), así como estudios moleculares y análisis filogenéticos del anamorfo, se determinó que el agente causal de la enfermedad en Sinaloa es *Pseudoidium anacardii* (F. Noack) U. Braun y R.T.A. Cook con *E. quercicola* como teleomorfo (Félix-Gastélum *et al.*, 2013). Al igual que en otras zonas productoras de mango en el mundo (Nasir *et al.*, 2014), en el Norte de Sinaloa no se encontró el teleomorfo en especímenes colectados en mangos. Kent y Keith en árboles de huertas comerciales y de traspatios (Félix-Gastélum *et al.*, 2013). En otras partes del mundo el hongo inverna como micelio o haustorios en yemas o puede permanecer en el follaje denso de los árboles (Nasir *et al.*, 2014);

between relative humidity, temperature and the phenology of the host with the severity of the disease. Also, the factor inherent to the varieties should be contemplated, since although the Kent variety is predominant, other cultivars such as Ataulfo, Haden, Keith and Tommy Atkins have been included in the production of mango in recent years.

#### Mildew in rosebushes

(*Rosa* spp.). On a global scale, mildew is the most common and important disease in rosebushes (Leus *et al.*, 2006) in greenhouses and in open fields (Hosseini *et al.*, 2014). However, no studies had been carried out in Sinaloa to elucidate the identity of the causal agent. Faced with the absence of the teleomorph, the anamorph was identified using morphometry, light microscopes, and scanning electron microscopes, as well as the amplification of the ITS region of the rDNA. The conclusion was that the causal agent of the disease is *Oidium*

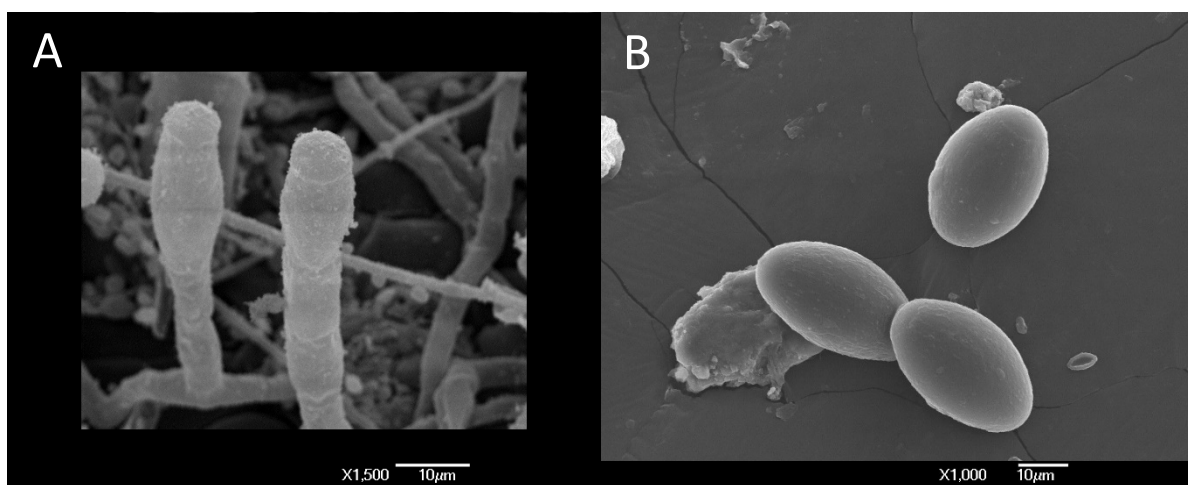


Figura 4. Micrografía con microscopía electrónica de barrido de *Pseudoidium anacardii* en mango: A) Conidióforo tipo *Pseudoidium* con conidio inmaduro y B) Conidios maduros ovoides con pared lisa.

Figure 4. Micrography with a scanning electron microscope of *Pseudoidium anacardii* in mango: A) *Pseudoidium* conidiophore with immature conidium, and B) Oval mature conidia with smooth wall.

se desconoce la forma de supervivencia durante el verano en Sinaloa. El dilucidar la forma de sobrevivencia del anamorfo de *P. anacardii* permanece como futura línea de investigación. Por otro lado, estudios realizados en Guerrero y Michoacán indicaron que la severidad máxima de la cenicilla del mango coincidió con períodos de temperatura de 20 °C y humedad relativa de 22-60 % en los dos primeros flujos de floración; sin embargo, el tercer flujo de floración coincidió con temperaturas de 20-25 °C y humedad relativa de 60-80 %. Las etapas fenológicas 1 a 6 (yema hinchada y elongación de panículas) se comportaron como tolerantes, mientras que las etapas 7 y 8 (apertura floral) se consideraron susceptibles y la 9, 10 y 11 (floración plena e inicio del desarrollo del fruto) como muy susceptibles (Guillen-Sánchez *et al.*, 2004). El manejo eficiente de la cenicilla del mango en Sinaloa requiere de la implementación de este tipo estudios, en los que se integren la relación entre la humedad relativa, la temperatura y la fenología del hospedante con la severidad de la enfermedad. Además, deberá contemplarse, el factor inherente a las variedades, pues aunque predomina la variedad Kent, otros cultivares como Ataulfo, Haden, Keith y Tommy Atkins, se han incluido en la producción de mango en años recientes.

### Cenicilla del rosal (*Rosa* spp.).

A nivel mundial, la cenicilla es la enfermedad más común e importante en rosas (Leus *et al.*, 2006) en invernadero y a campo abierto (Hosseini *et al.*, 2014). Sin embargo, en Sinaloa no se habían realizado estudios para dilucidar la identidad del agente causal. Ante la ausencia del teleomorfo, la identificación del anamorfo se logró mediante la aplicación de morfometría, microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, así como la amplificación de la región ITS del ADNr. Se

(=*Euoidium*) *leucoconium* with Bary *Podosphaera pannosa* (Wallr.) as a teleomorph (Félix-Gastélum *et al.*, 2014). Although the teleomorph has not been observed in Sinaloa, it has been confirmed in Korea (Shin, 1999; Lee *et al.*, 2011) and Yugoslavia (Ranković and Čomić, 1997). In other latitudes, in rosebushes planted in the open, the fungus hibernates as a mycelium in leaf bud primordia; in the spring, when the new tissue emerges from the buds, the fungus produces plenty of inoculant, which is dispersed and infects healthy tissue. Although chasmothecia have been found on damaged tissue, its presence is erratic, therefore its efficiency as a means of survival is unlikely (Horst, 1983). In Sinaloa, the survival of the fungus in the summer could take place in bud primordia or leaves which remain attached after trimming, in such a way that in the winter and spring, the disease presents itself again in the rosebushes.

### Mildew in tomato

(*Solanum lycopersicum* L.). This disease was first reported in Sinaloa in the 1979-1980 cycle (Sánchez-Castro, 1983). The causal agent was identified as *Oidiopsis taurica* (Lév.) E.S. Salmon, which was only supported using a morphometry of the anamorfo, since the teleomorfo was not found in the mentioned cycle or in the following ones. According to Hirata (quoted by Correl *et al.*, 1987) the pathogen infects 710 plant species included in 290 genera of 59 families, predominantly annual, although it also infects perennial plants such as olives and others. The disease has also been found in eggplant in the Valley of Culiacán where it is considered less important, since it presents itself sporadically, and because the damages it causes are not significant (Cebreros-Sánchez and Sánchez-Castro, 1998). It is worth pointing out that the symptoms of mildew, similar to those observed

concluyó que el agente causal de la enfermedad es *Oidium* (= *Euoidium*) *leucoconium* con *Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary como teleomorfo (Félix-Gastélum *et al.*, 2014). Aun cuando el teleomorfo no se ha observado en Sinaloa, éste se ha consignado en Korea (Shin, 1999; Lee *et al.*, 2011) y Yugoslavia (Ranković y Čomić, 1997). En otras latitudes, en rosales cultivados en campo abierto, el hongo inverna como micelio en primordios de yemas de las hojas; en primavera, cuando el nuevo tejido emerge de las yemas el hongo produce abundante inóculo el cual se dispersa e infecta el tejido sano. Aun cuando se han encontrado casmotecios sobre el tejido dañado, su presencia es errática, por lo que su eficacia como medio de supervivencia es poco probable (Horst, 1983). En Sinaloa, la supervivencia del hongo durante el verano podría ocurrir en primordios de yemas o en hojas que permanecen adheridas después de las podas, de tal manera que durante el invierno y primavera, la enfermedad se presenta de nuevo en los rosales.

#### **Cenicilla del tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Esta enfermedad se reportó por primera vez en Sinaloa en el ciclo hortícola 1979-1980 (Sánchez-Castro, 1983). El agente causal se identificó como *Oidiopsis taurica* (Lév.) E.S. Salmon, lo cual sólo se sustentó con morfometría del anamorfo, pues el teleomorfo no se encontró en dicho ciclo agrícola ni en los subsiguientes. De acuerdo a Hirata (citado por Correl *et al.*, 1987) el patógeno infecta a 710 especies de plantas incluidas en 290 géneros de 59 familias, predominantemente anuales, aunque también infecta a plantas perennes como el olivo y otras plantas perennes. La enfermedad también ha sido consignada en berenjena en el Valle de Culiacán donde se le considera de menor importancia, debido a que se presenta en forma esporádica y porque los daños que ocasiona no son de trascendencia

in tomato and eggplant, have also been observed in the ornamental plant known as the Jerusalem cherry (*Solanum pseudocapsicum* L.) and the ruderal plant known as the silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) (Félix-Gastélum, not published). Although mildew has appeared at epidemic levels in tomato, there are no studies that support the identification of the pathogen in plants cultivated plants, as well as in the ornamental and ruderal plants mentioned above; also, its role in the ecology of the pathogen and the epidemiology of the disease are unknown.

#### **FUTURE LINES OF INVESTIGATION ON POWDERY MILDEW IN SINALOA**

The knowledge of mildew in Sinaloa and the rest of Mexico is limited. Even after having identified the anamorph of some species, considering their morphometry, including images of conidia under the scanning electron microscope, as well as molecular studies in some of them, there is much room for exploration in regards to identifying the causal agents of this type of diseases; for example, in melon, watermelon, gourd, and tomatillo, the fungus related to mildew was identified preliminarily as the anamorph of *P. xanthii*. However, additional studies that include molecular and phylogenetic analyses are justified as support elements for the identification of the pathogen.

In virtue of the fact that the teleomorph of the causal agent of mildew in bean, mango, and rosebush has not been described, either, the identity of a broader group of specimens related to their respective hosts must be developed in Sinaloa, since preliminary works included an average of ten specimens in northern Sinaloa. Also, it is important to research its alternate potential hosts or other forms of survival in the absence of economically

(Cebreros-Sánchez y Sánchez-Castro, 1998). Es importante señalar que los síntomas de cenicilla, similares a los observados en tomate y berenjena, también se han observado en la planta ornamental denominada cereza de Jerusalén (*Solanum pseudocapsicum* L.) y la planta ruderal conocida como trompillo (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) (Félix-Gastélum, no publicado). Aun cuando la cenicilla del tomate se ha presentado en niveles epidémicos, no existen estudios que sustenten la identificación del patógeno en plantas cultivadas así como en la ornamental y en la ruderal antes mencionadas, además de que su papel en la ecología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad se desconoce.

#### FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN SOBRE LAS CENICILLAS EN SINALOA

El conocimiento de las cenicillas en Sinaloa y el resto de México es limitado. Aun cuando se ha identificado el anamorfo de algunas especies, considerando su morfometría, incluyendo imágenes de conidios al microscopio electrónico de barrido, así como estudios moleculares en algunas de ellas, existe un amplio espacio por explorar en lo relativo a la identificación de los agentes causales de este tipo de enfermedades; por ejemplo, en melón, sandía, bule y tomatillo el hongo asociado a la cenicilla se identificó preliminarmente como el anamorfo de *P. xanthii*; sin embargo, se justifican estudios adicionales donde se incluyan análisis moleculares y filogenéticos como elementos de soporte para la identificación del patógeno.

En virtud de que el teleomorfo del agente causal de la cenicilla del frijol, mango y rosál tampoco se ha descrito, la identidad de un grupo más amplio de especímenes asociados a sus respectivos hospedantes se deberá desarrollar en Sinaloa, pues en trabajos preliminares se incluyeron en promedio diez especímenes del norte de Sinaloa. Además, es

importante señalar que los síntomas de cenicilla, similares a los observados en tomate y berenjena, también se han observado en la planta ornamental denominada cereza de Jerusalén (*Solanum pseudocapsicum* L.) y la planta ruderal conocida como trompillo (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) (Félix-Gastélum, no publicado). Aun cuando la cenicilla del tomate se ha presentado en niveles epidémicos, no existen estudios que sustenten la identificación del patógeno en plantas cultivadas así como en la ornamental y en la ruderal antes mencionadas, además de que su papel en la ecología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad se desconoce.

important hosts, since this will contribute to the knowledge on the life cycle of these pathogens, crucial for the design of disease management strategies. Although the teleomorph in many species of Erysiphales is unknown, mainly in tropical and subtropical areas (Monkhung *et al.*, 2011), the characteristics of the anamorph, as described by Boesewinkel (1980), as well as the images of conidial walls under the scanning electron microscope (Cook *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2002), the range of hosts (Cook *et al.*, 1997), as well as molecular and phylogenetic analyses (Cunnington *et al.*, 2003) are elements that contribute thoroughly to the identification of species that cause mildew, which is important for the management of this type of diseases and in the genetic breeding programs aimed at obtaining hybrids and resistant varieties.

The host range of Erysiphales has been studied broadly and it is known that a limited number of species hold a wide range of hosts, such as in the cases of *L. taurica* (Braun and Cook, 2012; Palti, 1988) and *E. polygoni* (Salmon, 1900). Based on these precedents, it is important to determine the pathogenicity of tomatillo *P. xanthii* in cucurbits and vice-versa, since both hosts present symptoms of the disease in the autumn-winter agricultural cycle in northern Sinaloa. Usually, a plant species is only host to one species of mildew, but *Erysiphe trina* Harkn., *Microsphaera alni* (DC.) G. Winter, and *Phyllactinia corylea* (Pers.) P. Karst. were identified in species of *Quercus* (Yarwood, 1973).

In Sinaloa in the two only studies in several species of cucurbits, only *P. xanthii* is found (Félix-Gastélum *et al.*, 2005; Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012), although for many years *G. cichoracearum* was mentioned as a causal agent of the disease (León-Gallegos, 1988). Nowadays, the reason for, and ways in which, *P. xanthii* displaced *G. cichoracearum* in the region are unknown, or

importante el desarrollo de investigación sobre sus potenciales hospedantes alternos u otras formas de supervivencia en ausencia de los hospedantes económicamente importantes, ya que esto contribuirá al conocimiento del ciclo de vida de estos patógenos, aspecto esencial para diseñar estrategias de manejo de la enfermedad.

Aun cuando el teleomorfo de muchas especies de Erysiphales se desconoce, principalmente en áreas tropicales y subtropicales (Monkhung *et al.*, 2011), las características del anamorfo tal como lo describe Boesewinkel (1980), así como imágenes de la pared de los conidios al microscopio electrónico de barrido (Cook *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2002), el rango de hospedantes (Cook *et al.*, 1997), además de análisis moleculares y filogenéticos (Cunnington *et al.*, 2003) son elementos que de manera integral contribuyen a la identificación de las especies causantes de cenicillas, lo cual es importante en el manejo de este tipo de enfermedades y en los programas de mejoramiento genético orientados hacia la obtención de híbridos y variedades resistentes.

El rango de hospedantes de los Erysiphales se ha estudiado ampliamente y se sabe que un número limitado de especies poseen un amplio rango de hospedantes como en los casos de *L. taurica* (Braun y Cook, 2012; Palti, 1988) y *E. polygoni* (Salmon, 1900). Con base a estos antecedentes, es importante determinar la patogenicidad de *P. xanthii* de tomatillo en cucurbitáceas y viceversa, pues ambos hospedantes presentan síntomas de la enfermedad durante el ciclo agrícola otoño-invierno en el Norte de Sinaloa. Por lo general, una especie de planta sólo es hospedante de una especie de cenicilla pero en especies de *Quercus* se identificaron *Erysiphe trina* Harkn., *Microsphaera alni* (DC.) G. Winter y *Phyllactinia corylea* (Pers.) P. Karst. (Yarwood, 1973).

En Sinaloa en los dos únicos estudios en varias especies de cucurbitáceas, sólo se encuentra

perhaps previous efforts were not made to correctly identify the pathogen. The presence of *P. xanthii* as the only species related to cucurbits in Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2005; Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012) coincides with earlier reports that record its presence in Spain, Israel, and Turkey as the only species present in cucurbits, whereas in some countries *G. cichoracearum* and *P. xanthii* were found in coinfections or individually (Křístková *et al.*, 2009).

Although *P. xanthii* chasmothecia have been found in diverse types of pumpkin and cucumber in Sinaloa, there is no knowledge on its potential as a source of primary inoculant for the outbreak of epidemics in cucurbits in the following agricultural cycle. There are few species of causal agents of mildew in which the infection process of ascospores has been determined (Jarvis *et al.*, 2002), as in the case of *Erysiphe necator* Schwein., the ascospores of which germinated, produced appressoria 12 h after inoculation at 20 °C, and immediately afterwards, somatic structures typical of the pathogen appeared on the inoculated leaves (Pearson and Gadoury, 1987). The survival of the chasmothecia during the summer after its incorporation with the stubble that takes place in postharvest is questionable in Sinaloa, since unlike sclerotia, such structures of sexual origin are not capable of surviving on the ground in summer, although its survival in wild cucurbits must also be taken into account. In this sense, in Sinaloa mildew symptoms have been observed in buffalo gourd (*Cucurbita foetidissima* Kunth.), as in the Czech Republic (Lebeda *et al.*, 2004). Studies on its role and that of other wild cucurbits as potential sources of inoculants are worthy of attention, since *P. xanthii* has been found to infect species of the families Asteraceae, Lamiaceae, Scrophulariaceae and Solanaceae (Pérez-García *et al.*, 2009). In recent years, the fungus has been found in association with papaya and bitter melon (*Momordica charantia* L.)

*P. xanthii* (Félix-Gastélum *et al.*, 2005; Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012), aun cuando por muchos años se mencionó a *G. cichoracearum* como agente causal de la enfermedad (León-Gallegos, 1988). Actualmente se desconocen las razones y cuándo *P. xanthii* desplazó a *G. cichoracearum* en la región o quizás no se realizaron esfuerzos previos para la identificación correcta del patógeno. La presencia de *P. xanthii* como única especie asociada a las cucurbitáceas en Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2005; Bojórquez-Ramos *et al.*, 2012) coincide con reportes previos que la registran en España, Israel y Turquía como la única especie presente en cucurbitáceas; mientras que, en algunos países *G. cichoracearum* y *P. xanthii* se encontraron en coinfecciones o en forma individual (Křístková *et al.*, 2009).

Aun cuando los casmotecios de *P. xanthii* se han encontrado en diversos tipos de calabaza y pepino en Sinaloa, se desconoce su potencial como fuentes de inóculo primario para el brote de epidemias en cucurbitáceas en el ciclo agrícola siguiente. Son pocas las especies de agentes causales de cenicilla en las que se ha determinado el proceso de infección de las ascosporas (Jarvis *et al.*, 2002), tal es el caso de *Erysiphe necator* Schwein. cuyas ascosporas germinaron, produjeron apresorios 12 h después de la inoculación a 20°C y enseguida se observaron estructuras somáticas típicas del patógeno sobre las hojas inoculadas (Pearson y Gadoury, 1987). La supervivencia de los casmotecios durante el verano después de su incorporación junto con los residuos de cultivos que ocurre en postcosecha, en suelos de Sinaloa es cuestionable, pues a diferencia de los esclerocios, dichas estructuras de origen sexual no poseen la capacidad de sobrevivir en el suelo durante el verano; aunque también se debe considerar su supervivencia en cucurbitáceas silvestres. En este sentido, en Sinaloa se han observado síntomas de cenicilla en meloncillo (*Cucurbita foetidissima* Kunth.), como ocurre en la República Checa (Lebeda *et al.*, 2004). Estudios sobre el papel de ésta

(Huang and Wuang, 2007; Tsay *et al.*, 2011; Joa *et al.*, 2013; Liu and Kirschner, 2015), as well as with members of Solanaceae which include *Petunia* (Kiss *et al.*, 2008; Brielmaier-Liebetanz *et al.*, 2015) and eggplant (Liu *et al.*, 2015). By virtue of the fact that several *P. xanthii* hosts, recorded in other parts of the world, are found in Sinaloa, the association of the pathogen with such hosts must be determined in this region.

Basic molecular biology studies involving pathogenesis processes in powdery mildew deserve attention in Sinaloa; for example, the pre-penetration and post-penetration of the fungus into the host requires high-level de novo protein biosynthesis (Both 2005). In this case specific proteomic aspects in the formation of haustoria and other phases of pathogenesis should be included (Noir *et al.*, 2009).

On the other hand, studies on mildew in zucchini caused by *P. xanthii* indicate that the combination of high concentrations of CO<sub>2</sub> (800 ppm) and high temperatures (28 °C in the day and 22 °C at night) stimulate the development and severity of the pathogen (Pugliese *et al.*, 2012). Studies of this type in Sinaloa could explain if the increase in temperature derived from climate change could be the cause of the presence of *P. xanthii* instead of *G. cichoracearum*, as it occurred in some regions of the Czech Republic (Lebeda *et al.*, 2009).

The spatial and temporary distribution of species and breeds that cause mildew and their respective virulence in different cucurbit hybrids and other crops in Sinaloa should also be determined. This is essential in studies on ecology, epidemiology, and particularly in the development of hybrids resistant to this disease (Coffey *et al.*, 2006).

Considering that the studies on the biological effectiveness of mildew control-friendly substances have taken place mainly in greenhouse conditions (Pérez-Ángel *et al.*, 2010; Yáñez *et al.*, 2012), it is important to carry out investigations aimed at



y otras cucurbitáceas silvestres como potenciales fuentes de inóculo merecen atención, pues *P. xanthii* se ha encontrado infectando a especies de las familias Asteraceae, Lamiaceae, Scrophulariaceae y Solanaceae (Pérez-García *et al.*, 2009). En años recientes, el hongo se ha encontrado asociado a papaya y melón amargo (*Momordica charantia* L.) (Huang y Wuang, 2007; Tsay *et al.*, 2011; Joa *et al.*, 2013; Liu y Kirschner, 2015), así como a miembros de Solanaceae que incluyen a *Petunia* (Kiss *et al.*, 2008; Brielmaier-Liebetanz *et al.*, 2015) y berenjena (Liu *et al.*, 2015). En virtud de que varios de los hospedantes de *P. xanthii*, consignados en otras partes del mundo, se encuentran en Sinaloa, la asociación del patógeno con dichos hospedantes debe determinarse en esta región.

Estudios básicos de biología molecular que involucren procesos de la patogénesis en las cenicillas merecen atención en Sinaloa; por ejemplo, la pre-penetración y pos-penetración del hongo al hospedante requiere biosíntesis de altos niveles de proteínas de novo (Both 2005); en este caso, se deberían incluir aspectos de proteómica específicos en la formación de haustorios y otras fases de la patogénesis (Noir *et al.*, 2009).

Por otro lado, estudios sobre la cenicilla de la calabaza zucchini causada por *P. xanthii* indican que la combinación de alta concentración de CO<sub>2</sub> (800 ppm) y altas temperaturas (28 °C durante el día y 22 °C durante la noche) estimulan el desarrollo y severidad del patógeno (Pugliese *et al.*, 2012). Estudios de este tipo en Sinaloa podrían explicar si el incremento de temperatura derivado del cambio climático podría ser la causa de la presencia de *P. xanthii* en lugar de *G. cichoracearum*, como ha ocurrido en algunas regiones de la República Checa (Lebeda *et al.*, 2009).

También se debería determinar la distribución espacio temporal de especies y razas causantes de cenicilla y su respectiva virulencia en diferentes

the search of endemic antagonistic organisms and determine their biological effectiveness in greenhouse and open fields and that these studies be used to determine the effect of climatic parameters that affect the control of the disease.

## CONCLUSIONS

Powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales) are diseases that appear frequently in cultivated and wild plants worldwide. Although these diseases affect the yield and quality of crops such as tomato, *tomatillo*, chili, cucurbits, and others, knowledge on their ethiology, epidemiology, and control in and the rest of Mexico is limited. The appearance of molecular tools and the use of light microscopy and scanning electron microscopy have contributed significantly to identifying the anamorph of the causal agents of mildew in regions where the fungal teleomorph is not found. There are several lines of investigation that need to be explored regarding this type of diseases in Sinaloa. For example, the search for potential teleomorphs of mildew in tomato, *tomatillo*, chili, mango, rosebush, and some cucurbits such as watermelon, melon, and gourd will contribute to the knowledge of the life cycle of these pathogens in these crops. The determination of the host of range of the causal agents of this type of disease also requires special attention, since this will contribute to the knowledge of the ecology and epidemiology of mildews, which would support more efficient measures for their control, in which the use of environment-friendly measures, such as organic and inorganic products, as well as biocontrol agents, endemic of Sinaloa.

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

híbridos de cucurbitáceas y otros cultivos en Sinaloa, lo cual es esencial en estudios sobre ecología, epidemiología y particularmente en el desarrollo de híbridos resistentes a la enfermedad (Coffey *et al.*, 2006).

En vista de que los estudios de efectividad biológica de sustancias amigables para el control de cenicilla se han llevado a cabo principalmente en condiciones de invernadero (Pérez-Ángel *et al.*, 2010; Yáñez *et al.*, 2012), es importante desarrollar investigación orientada a la búsqueda de organismos antagónicos endémicos y determinar su efectividad biológica en invernadero y en campo abierto y que a través de estos estudios se determine el efecto de parámetros climáticos que afecten el control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las cenicillas (Ascomycota, Erysiphales) son enfermedades que se presentan con frecuencia en plantas cultivadas y silvestres a nivel mundial. Aun cuando estas enfermedades afectan rendimiento y calidad en cultivos como tomate, tomatillo, chile, cucurbitáceas, entre otros, su conocimiento sobre etiología, epidemiología y control en Sinaloa y el resto de México es limitado. El advenimiento de herramientas moleculares, y la utilización de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido han contribuido de manera significativa en la identificación del anamorfo de los agentes causales de las cenicillas en regiones donde no se encuentra el teleomorfo del hongo. Existen varias líneas de investigación en las que se debe de incursionar en este tipo de enfermedades en Sinaloa. Por ejemplo, la búsqueda de los potenciales teleomorfos de la cenicilla del tomate, tomatillo, chile, mango, rosal y algunas cucurbitáceas como sandía, melón y bule contribuirá al conocimiento del ciclo de vida

de estos patógenos en dichos cultivos. Atención especial merece también la determinación del rango de hospedantes de los agentes causales de este tipo de enfermedades, pues esto contribuirá al conocimiento de la ecología y la epidemiología de las cenicillas, en lo que sustentarán medidas más eficaces para su control, donde se deberá privilegiar el uso de medidas amigables con el ambiente tales como productos orgánicos e inorgánicos, así como agentes de biocontrol endémicos de Sinaloa.

LITERATURA CITADA

- Almeida AMR, Binneck E, Piuga FF, Marin SSR, Ribeiro do Valle PRZ and Silveira CA. 2008. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. *Tropical Plant Pathology* 33:20-26. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000100004>
- Amano K. 1986. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 741p. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19861318791>
- Ballantyne BJ. 1975. Powdery Mildew, of Cucurbitaceae: Identity, Distribution, host range and source Resistance. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 99:100-120.
- Bélanger RR and Labbé C. 2002. Control of powdery mildews without chemicals: Prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. Pp. 256-267. *In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, and Carver TLW (eds.) The powdery mildews: a comprehensive treatise. Academic Press. American Phytopathological Society. St. Paul Mn, USA. 292 p.*
- Boesewinkel HJ. 1980. The morphology of the imperfect stages of powdery mildews (Erysiphaceae). *Bot Rev (Lancaster)* 46: 167-224. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02860869>
- Bojórquez-Ramos C, León-Félix J, Allende-Molar R, Murrugarán MD, Carrillo-Facio JA, Valdez-Torres JB, López-Soto FSM and García-Estrada RS. 2012. Characterization of powdery mildew in cucumber plants under greenhouse conditions in the Culiacan Valley, Sinaloa, Mexico. *African Journal of Agricultural Research* 7:3237-3248. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.2093>
- Both M, Eckert SE, Csukai M, Müller E, Dimopoulos G and Spanu PD. 2005. Transcript profiles of *Blumeria graminis* development during infection reveal a cluster of genes that are potential virulence determinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:125-133. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-18-0125>
- Braun U. 1982. Taxonomic notes on some powdery mildews. *Mycotaxon* 15:138-154. Disponible en línea: <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/109/109-21.html>

- Braun U. 1999. Some critical notes on the classification and the generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3:48-54.
- Braun U, Cook RTA, Inman AJ and Shin HD. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. Pp. 13- 55. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ and Carver TLW (eds.) The powdery mildews: a comprehensive treatise. American Phytopathological Society Press. St. Paul Mn., USA. 292 p.
- Braun U. 2012. The impact of the discontinuation of dual nomenclature of pleomorphic fungi: the trivial facts, problems and strategies. *IMA fungus* 3:81-86. <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2012.03.01.08>
- Braun U and Cook RTA. 2012. Taxonomic manual of the *Erysiphales* (powdery mildews). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 707 p.
- Braun U. 2013. (2210–2232) Proposals to conserve the teleomorph-typified name *Blumeria* against the anamorph-typified name *Oidium* and twenty-two teleomorph typified powdery mildew species names against competing anamorph-typified names (Ascomycota: Erysiphaceae). *Taxon* 62:1328-1331. <http://dx.doi.org/10.12705/626.20>
- Brielmaier-Liebetanz U, Field AE, Warfield CY and Braun U. 2015. Powdery mildew Erysiphaceae) on *Calibrachoa* hybrids in Germany, Nicaragua and the USA. *Plant Pathology and Quarantine* 5: 1-5. Disponible en línea: <http://www.plantpathologyquarantine.org/volume-5/issue-1.html>
- Catlin N. 2012. Powdery mildew on Petunia. *E-Gro Alert* 1(12), 1–2. Disponible en línea: http://www.e-gro.org/pdf/Petunia_Powdery_Mildew.pdf
- Cebrenos-Sánchez F, Sánchez-Castro MA y Acosta-M. I. 1991. Supervivencia de *Erysiphe cichoracearum* De Candolle causante de la cenicilla de las cucurbitáceas en el Valle de Culiacán. Memorias del XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puebla, Puebla, México. 120 p.
- Cebrenos-Sánchez F y Sánchez-Castro MA. 1998. Enfermedades de la berenjena. P. 161-175. In: Cruz-Ortega JE, García-Estrada RS y Carrillo-Facio JA (coordinadores). Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Rosales, Sinaloa, México. 234 p.
- Chávez-Solis AL, Pedroza-Sandoval A, Nava-Díaz C, Cano-Ríos P y Castro-Franco R. 2014. Control de la cenicilla del melón (*Podosphaera xanthii*) mediante el uso de extracto de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (L.). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 13:103-113. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rhsza.2012.08.038>
- Cheng CW, Chen RS, Chang WH and Tsay JG. 2006. The occurrence of powdery mildew on *Physalis angulata* caused by *Podosphaera xanthii*. *Plant Protection Bulletin* 48:41-51. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/?target=%2f2f2cabdirect%2fabstract%2f20063166427>
- Coffey MD, McCreight JD and Miller T. 2006. New races of the cucurbit powdery mildew *Podosphaera xanthii* present in California. *Phytopathology* 96:S25 (Abstr.). Disponible en línea: <http://apsjournal.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2006.96.6.S1>
- Cook RTA, Inman AJ and Billings C. 1997. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycological Research* 101:975-1002. <http://dx.doi.org/10.1017/S095375629700364X>
- Coyier DL. 1972. Heterothalms in the apple powdery mildew, *Podosphaera leucotricha*. *Phytopathology* 62:1102. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-64-246>
- Cruz-Ortega JE, García-Estrada RS y Carrillo-Facio JA. 1998. Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Rosales, Sinaloa, México. 234 p.
- Cunnington JH, Takamatsu S, Lawrie AC and Pascoe IG. 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Australasian Plant Pathology* 32:421-428. <http://dx.doi.org/10.1071/AP03045>
- Félix-Gastélum R, Apodaca-Sánchez MA, Martínez-Valenzuela MC y Espinosa-Matías S. 2005. *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Brawn & N. Shishkoff en Cucurbitáceas en el Norte de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:162-168. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223209>
- Félix-Gastélum R, Ávila-Díaz JA, Valenzuela-Cota BO, Trigueros-Salmerón JA y Longoria-Espinoza RM. 2007. Identificación y control químico de los agentes causales de la mancha foliar y la cenicilla del tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) en el Norte de Sinaloa México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:1-10. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a1.pdf>
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Herrera-Rodríguez G, Martínez-Valenzuela C, Espinosa-Matías S, Cordero-Ramírez JD and Martínez-Álvarez JC. 2011. Powdery mildew on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Northern Sinaloa, Mexico. *Sydowia* 63:169-182.
- Félix-Gastélum R, Herrera-Rodríguez G, Martínez-Valenzuela C, Longoria-Espinoza RM, Maldonado-Mendoza IE, Quiroz-Figueroa FR, Martínez-Álvarez JC, García-Pérez LM and Espinoza-Matías S. 2013. First report of powdery mildew (*Pseudoidium anacardii*) of mango trees in Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 97:994. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1014-PDN>
- Félix-Gastélum R, Herrera-Rodríguez G, Martínez-Valenzuela C, Maldonado-Mendoza IE, Quiroz-Figueroa FR, Brito-Vega H and Espinosa-Matías S. 2014. First report of powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) of roses in Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 98:1442. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0605-PDN>
- Glawe DA. 2008. The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46:27-61. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- Guillen-Sánchez D, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Nieto-Angel D, Cárdenas-Soriano E, Siebe-Grabach C y Villanueva-Jiménez JA. 2004. La severidad de la cenicilla (*Oidium mangiferae* Berthet) del mango (*Mangifera indica* L.) y su relación con las emisiones de ceniza de una central termoeléctrica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2:90-99. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222112>
- Horst RK. 1983. Compendium of rose diseases. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 50 p.

- Hosseini MH, Dewitte A, Van Bockstaele E, Van Huylbroeck J and Leus L. 2014. Roses exhibit pathotype-specific resistance responses to powdery mildew. *Journal of Phytopathology* 62:107-115. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12159>
- Huang JH and Wang YH. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* causing melon powdery mildew in Taiwan. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 56:307-315. Disponible en línea: <http://ir.tari.gov.tw:8080/bitstream/345210000/323/1/56-4-6.pdf>
- Jarvis WR, Gubler WD and Grove GG. 2002. Epidemiology of powdery mildew in agricultural pathosystems. Pp.169-199. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ and Carver TLW (eds.) *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. American Phytopathological Society Press. St. Paul Mn., USA. 292 p.
- Joa JH, Chung BN, Han KS, Cho SE and Shin HD. 2013. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* on papaya in Korea. *Plant Disease* 97:1514. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0581-PDN>
- Khan MW and Khan AM. 1970. Studies on the cucurbit powdery mildew. I Perithecial production in cucurbit powdery mildew in northern India. *Indian Phytopathology* 23:497-502. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711606353>
- Kiss L, Jankovics T, Kovács GM and Daughtrey ML. 2008. *Oidium longipes*, a new powdery mildew fungus on petunia in the USA: A potential threat to ornamental and vegetable solanaceous crops. *Plant Disease* 92:818-825. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0818>
- Koike ST and Smith RF. 1988. First report of powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca* on tomatillo in California. *Plant Disease* 82:711 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.711C>
- Kontaxis DG. 1978. Cleistothecia of cucurbit powdery mildew in California. A new record. *Plant Disease Reporter* 63:278.
- Křístková E, Lebeda A and Sedláková B. 2009. Species spectra, distribution and host range of cucurbit powdery mildews in the Czech Republic, and in some other European and Middle Eastern countries. *Phytoparasitica* 37:337-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-009-0045-4>
- Lebeda A, Sedláková B and Křístková E. 2004. Distribution harmfulness and pathogenic variability of cucurbit powdery mildew in the Czech Republic. *Acta fytotechnica et zootechnica* 7:174-176. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/267785272_DISTRIBUTION_HARMFULNESS_AND_PATHOGENIC_VARIABILITY_OF_CUCURBIT_POWDERY_MILDEW_IN_THE_CZECH_REPUBLIC
- Lebeda A, Sedláková B, Křístková E and Vysoudil M. 2009. Long-lasting changes in the species spectrum of cucurbit powdery mildew in the Czech Republic – influence of air temperature changes or random effect?. *Plant Protection Science* 45:S41–S47 Disponible en línea: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/13967.pdf>
- Lee SH, Han KS, Park JH and Shin HD. 2011. Occurrence of *Podosphaera pannosa* teleomorph on *Rosa rugosa* from Korea. *The Plant Pathology Journal* 27:398. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.4.398>
- León-Gallegos HM. 1988. Enfermedades de cultivos en el Estado de Sinaloa. Tercera Edición. CAEVACU-CIAPAN-INIFAP. Culiacán, Sinaloa, México. 262 p.
- Leus L, Dewitte A, Van Huylbroeck J, Vanhoutte N, Van Bockstaele E, and Höfte M. 2006. *Podosphaera pannosa* (syn. *Sphaerotheca pannosa*) on *Rosa* and *Prunus* spp.: characterization of pathotypes by differential plant reactions and ITS sequences. *Journal of Phytopathology* 154:23-28. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01053.x>
- Liberato JR. 2007. Taxonomic notes on two powdery mildews: *Phyllactinia chorisiae* and *Ovulariopsis wissadulae* (Erysiphaceae: Phyllactiniaceae). *Mycotaxon* 101:29-34. Disponible en línea: <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/101/101-29.html>
- Liu Sh.-Y, Men X.-Y and Li Y. 2015. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* on *Solanum melongena* (Eggplant) in China. *Plant Disease* 9:1856. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0176-PDN>
- Liu WA and Kirschner R. 2015. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* on wild bitter gourd in Taiwan. *Plant Disease* 9:726. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0910-PDN>
- McGrath MT. 1994. Heterothalms in *Sphaerotheca fuliginia*. *Mycologia* 86:517-523. <http://dx.doi.org/10.2307/3760745>
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme Van Reine WF, Smith GF, Wiersma JH and Turland NJ (eds.). 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia. (Regnum Vegetabile, 154). XXX, 240 p.
- Misra AK. 2001. Powdery mildew - a serious disease of mango. *Journal of Applied Horticulture* 3:63-68. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/Ak_Misra3/publication/281590887_Powdery_mildew_-_A_serious_disease_of_mango/links/55ef0b5d08ae0af8ee1b0920.pdf
- Monkhung S, To-anun C and Takamatsu S. 2011. Molecular approach to clarify taxonomy of powdery mildew on chili plants caused by *Oidiopsis sicula* in Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 7:1081-1808 Disponible en línea: http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v7_n6_11_November/30_IJAT%202011_7_6_Dr.%20Chaiwat_FX.pdf
- Nasir M, Mughal SM, Mukhtar T and Awan MZ. 2014. Powdery mildew of mango: A review of ecology, biology, epidemiology and management. *Crop Protection* 64:19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.003>
- Noir S, Colby T, Harzen A, Schmidt J and Panstruga R. 2009. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. *Molecular Plant Pathology* 10:223-236. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00524.x>
- Palti J. 1988. The *Leveillula* mildews. *Botanical Review* 54:423-535. Disponible en línea: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02858418>
- Pearson RC and Gadoury DM. 1987. Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. *Phytopathology* 77:1509-1514. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-77-1509>
- Pérez-Ángel R, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, Angulo-Escalante MA, Valdez-Torres JB, Muij-Rangel MD,

- García-López AM y Villarreal-Romero M. 2010. Control de Cenicilla (*Sphaerotheca fuliginea* Schlechtend.:Fr, Pollaci) con aceites vegetales y sales minerales en pepino de invernadero en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:17-24. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a2.pdf>
- Pérez-García A, Romero D, Fernández-Ortuño D, López-Ruiz F, De Vicente E and Tóres JA. 2009. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. *Molecular Plant Pathology* 10:153-160. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2008.00527.X>
- Plump RT and Turner RH. 1972. Scanning electron microscopy of *Erysiphe graminis*. *Transaction of the British Mycological Society* 59:149-150. [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0007-1536\(72\)80052-4](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0007-1536(72)80052-4)
- Pugliese M, Liu J, Titone P, Garibaldi A and Gullino ML. 2012. Effects of elevated CO₂ and temperature on interactions of zucchini and powdery mildew. *Phytopathologia Mediterranea* 51:480-487. Disponible en línea: <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/download/9801/11450>
- Ramírez-Villapudúa J, Sáinz-Rodríguez RA y Quiñonez-Félix JA. 2006. Cultivo, enfermedades y plagas del mango bajo el sistema convencional y orgánico. *Gobierno del Estado de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México*. 256 p.
- Ramírez-Villapudúa J y Sáinz-Rodríguez RA. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ª edición. Once ríos editores. Culiacán, Sinaloa. 360 p.
- Ranković B and Čović L. 1997. Contribution to the knowledge of fungi of the genus *Sphaerotheca* in Yugoslavia. *Mycotaxon* 63:301-305.
- Romero-Cova S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. 347 p.
- Saenz GS, Taylor JW and Gargas A. 1994. 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the Erysiphales. *Mycologia* 86:212-216. <http://dx.doi.org/10.2307/3760639>
- Saenz GS and Taylor JW. 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77:150-168. <http://dx.doi.org/10.1139/b98-235>
- Salmon ES. 1900. A monograph of Erysiphaceae. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 91:1-292. Disponible en línea: <https://www.jstor.org/stable/pdf/43383647.pdf>
- Sánchez-Castro MA. 1983. La cenicienta del tomate, causada por *Oidiopsis taurica* (Lév.) Salmon, una enfermedad en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2:3-6.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2014. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México, D. F. Disponible en línea: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consultado el 09 de junio de 2016).
- Schnathorst WC. 1959. Heterothallism in the lettuce strain of *Erysiphe cichoracearum*. *Mycologia* 51:708-711. <http://dx.doi.org/10.2307/3755898>
- Schnathorst WC. 1965. Environmental relationships in the powdery mildews. *Annual Review of Phytopathology* 3:343-366. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.03.090165.002015>
- Shin HD. 1999. Teleomorph of *Sphaerotheca pannosa* on Durian Rose in Korea. *Mycotaxon* 72:1-5.
- Singh LB. 1960. The mango: botany, cultivation and utilization. London, L. Hill; New York Interscience Publishers 438 p.
- Sivapalan A. 1993a. Effects of water on germination of powdery mildew conidia. *Mycological Research* 97:71-76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81115-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81115-5)
- Sivapalan A. 1993b. Effects of impacting rain drops on the growth and development of powdery mildew fungi. *Plant Pathology* 42:256-263. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01498.x>
- Smith CG. 1970. Production of powdery mildew cleistocarps in a controlled environment. *Transactions of the British Mycological Society* 55:355-365. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80057-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80057-2)
- Takamatsu S, Braun U, Limkaisang S, Kom-Un S, Sato Y and Cunnington JH. 2007. Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides sensu lato*. *Mycological Research* 111:809-826. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.013>
- Takamatsu S. 2013. Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience* 54:75-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.004>
- Tsay JG, Chen RS, Wang HL, Wang WL and Weng BC. 2011. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe diffusa*, *Oidium neolycopersici*, and *Podosphaera xanthii* on papaya in Taiwan. *Plant Disease* 95:1188. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0362>
- Yáñez JMG, León RJF, Godoy ATP, Gastélum LR, López MM, Cruz OJE y Cervantes DL. 2012. Alternativas para el control de la cenicienta (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:259-270. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/733/704>
- Yarwood CE. 1935. Heterothallism of sunflower powdery mildew. *Science* 82:417-418. <http://dx.doi.org/10.1126/science.82.2131.417>
- Yarwood CE. 1957. Powdery mildews. *Botanical Review* 233:235-301. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02872581>
- Yarwood CE. 1973. Pyrenomyces: Erysiphales. Pp. 71-86. *In: Ainsworth GC, Sparrow FK and Sussman AS (eds.). The fungi. An advanced treatise. Vol. IV A taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti.* Academic Press. New York, USA. 621 p.

Looking for natural antifungal agent: Sensitive assay to detect fungal endo-1,3- β -glucanase inhibitors from crude plant extracts

Buscando agentes antifúngicos naturales: Ensayo sensible para detectar inhibidores de endo-1,3- β -glucanasa en extractos crudos de plantas

Irasema Vargas-Arispuro*, Marisol Fraijo-Martínez, Socorro Vallejo-Cohen, Consuelo Corrales-Maldonado, Miguel Ángel Martínez-Téllez. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. A la Victoria Km 0.6, 83304 Hermosillo, Sonora, México. * Autor para correspondencia: iris@ciad.mx

Recibido: 20 de junio 2016.

Aceptado: 03 de octubre 2016.

Vargas-Arispuro I, Fraijo-Martínez M, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C, Martínez-Téllez MA. 2017. Looking for natural antifungal agent: Sensitive assay to detect fungal endo-1,3- β -glucanase inhibitors from crude plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 130-138.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-5)

Primera publicación DOI: 22 de Octubre, 2016.

First DOI publication: October 22, 2016.

Resumen. La enzima 1,3- β -glucanasa está implicada en la construcción de la pared celular de hongos, en la formación del septum de división y en el ensamblado de la pared de ascosporas. Razón por la cual la 1,3- β -glucanasa es un sitio blanco para el desarrollo de nuevas generaciones de agentes antifúngicos naturales. Con el objetivo de buscar compuestos antifúngicos en extractos de plantas, nosotros implementamos un simple y sensible ensayo para detectar inhibidores de endo-1,3- β -glucanasa

Abstract. 1,3- β -glucanase is an enzyme involved in fungal cell wall construction, division septum deposition and ascospore wall assembly. Hence, the 1,3- β -glucanase is a target site to develop into new generations of natural antifungal agents. With the aim of seeking antifungal compounds in plant extracts, we implemented a simple and sensitive assay to detect inhibitors of endo-1,3- β -glucanase from crude plant extracts. The assay, especially useful for screen large number of crude plant extracts, is based on the diffusion of glucanase enzyme from wells through agarosa gel containing the enzyme substrate (laminarin). As the substrate is depolymerized, glucanase diffuses outward in a radial manner leaving a circular zone around the well, unstained by dye calcofluor. A linear relationship between the diameter of hydrolyzed zone and pure enzyme concentration, provide the basis for the method. Results of the assay using plant extracts obtained in methanol or dichloromethane are discussing.

fúngica en extractos crudos de plantas. El ensayo es especialmente útil para evaluar un gran número de extractos crudos de plantas, está basado en la difusión radial de la enzima glucanasa incluida en pozos realizados en un gel de agarosa, el cual contiene el sustrato de la enzima (laminarina). Conforme el sustrato es depolimerizado en el gel por acción de la enzima, la cual difunde de forma radial, dejando unas zonas circulares alrededor de los pozos, las cuales no son teñidas por el colorante calcoflúor. La relación lineal entre el diámetro de la zona hidrolizada y las concentraciones de enzima pura, es la base del método. Se discuten resultados de la utilización del ensayo con extractos de plantas obtenidos con metanol o diclorometano.

Palabras clave: Fungicida natural, sitio blanco fúngico, extractos de plantas, hidrolasa.

La mayoría de los agroquímicos antifúngicos están perdiendo su efectividad debido al desarrollo de resistencia de los hongos patógenos (Dooley *et al.*, 2016). Una forma potencial y de amplia aceptación para descubrir nuevos agentes de control de enfermedades vegetales es buscar compuestos derivados de plantas, que se ha demostrado que mejoran las actividades antifúngicas y reducen la toxicidad (Mishra *et al.*, 2010).

Un aspecto importante de la actual investigación de fungicidas es el uso del adecuado y novedoso sitio-objetivo, en los que los compuestos ejercen su efecto fungicida, afectando un proceso que debería ser esencial para el crecimiento de los hongos, y de preferencia uno que sea requerido para mantener la viabilidad celular. Entre los sitios-objetivo, la pared celular fúngica ha surgido como uno de los más importantes, ya que los hongos están encerrados en una pared que contiene hidratos de carbono. En consecuencia, los agentes que inhiben

Key words: Natural fungicide, fungal target site, plant extracts, hydrolase.

Most of the available antifungal agrochemicals are losing their effectiveness because of the development of fungi pathogens resistance (Dooley *et al.*, 2016). A potential and widely accepted way to discover new plant disease control agents is to look for plant-derivatives compounds, which have been showed to improve antifungal activities and reduce toxicity (Mishra *et al.*, 2010).

An important aspect of current fungicide research is the used of suitable and novel target site, in which compounds exerts its fungicide effect, affecting a process that should be essential to the fungal growth and preferably one that is required to maintain cell viability. Among these, the fungal cell wall has emerged as a major target, since fungal are encased in a carbohydrate-containing wall. In consequence, agents that inhibits the synthesis of the fungal cell wall will be more selective (Liu and Balasubramanian, 2001). Fungal cell wall of ascomycetes, deuteromycetes, basidiomycetes and some oomycetes, are composed of β -glucans (Douglas, 2001), that are β -1,3-linked glucose homopolymers, with variable amounts of 1,6- β and 1,4- β -linked glucose side chains and chitin that are responsible for cell rigidity (Gastebois *et al.*, 2010). The dynamic structural reorganization of fungal cell wall requires undergo partial lysis to obtain plasticity during morphological changes as cell growth (branching), cell division and germination in filamentous fungi or the cell separation in yeast, where endo- β -1,3-glucanases play an essential role during such morphogenetic events (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado, *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 2011). Therefore a strategy for discovering plant disease control agents would be to looking in plant derivatives endo- β -1,3-glucanase inhibitors

la síntesis de la pared celular fúngica serán más selectivos (Liu y Balasubramanian, 2001). La pared celular fúngica de ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y algunos oomicetos, están compuestos de β -glucanos (Douglas, 2001), que son homopolímeros de β -1,3-unidos a glucosas, con cantidades variables de cadenas de β -1,6 y β -1,4-unidos a glucosa y quitina que son responsables de mantener la rigidez celular (Gastebois *et al.*, 2010). La reorganización estructural dinámica de la pared celular fúngica debe alcanzar una lisis parcial para hacerse de plasticidad durante los cambios morfológicos como el crecimiento celular (ramificación), división celular y germinación en hongos filamentosos o la separación celular en la levadura, donde las endo- β -1,3-glucanasas juegan un papel esencial durante tales eventos morfogénicos (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado, *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 2011). Por lo tanto, una estrategia para descubrir agentes de control de enfermedades vegetales sería buscar en los compuestos de las plantas sustancias inhibitoras de endo- β -1,3-glucanasas como un sitio-objetivo específico de aquellos hongos cuyas paredes celulares contienen β -glucanos, específicamente en el enlace β -1,3-glucano. Hay limitados metodologías para evaluar de forma masiva a derivados de plantas y otras fuentes poco comunes para ciertos tipos de actividad biológica, tal como la actividad de enzimas fúngicas (Muller, 2002). Por el contrario, se han obtenido grandes avances en las industrias farmacéuticas y miles de compuestos con actividad biológica en potencia pueden ser evaluados de forma rápida en busca de cierto tipo de actividad biológica (Kurtz y Rex, 2001).

Nuestro laboratorio ha evaluado extractos crudos de plantas del desierto de Sonora en busca de compuestos antifúngicos derivados de material vegetal, evaluando cientos de extractos crudos usando un ensayo antifúngico tradicional (Rivera-Castañeda *et al.*, 2001; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005). Considerando que algunos extractos crudos

as a specific target site of those fungi that their cell wall contained β -glucans, specifically in 1,3-glucan link. There are limited screening methodologies to evaluate in a massive way, plant derivatives and other unusual sources for certain type of biological activity such as fungal enzymes activity (Muller, 2002). On the contrary, in the pharmaceutical industries great advances have been made and thousands of compounds with potential biological activity can be screened in rapid fashion, looking for certain type of biological activity (Kurtz and Rex, 2001).

Our laboratory has been evaluated crude extracts of Sonora Desert plants looking for antifungal plant-derived compound, screening hundreds of crude extract using a traditional antifungal assay (Rivera-Castañeda *et al.*, 2001; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005). Considering that some crude extracts have showed antifungal properties against a panel of phytopathogenic fungi, we focused on looking for those plant extract that would selectively inhibit the synthesis of the fungal cell wall, thorough of inhibit endo- β -1,3-glucanase in those fungi that contained it, such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Tilletia*, *Botryotinia*, *Alternaria*, *Phytophthora*, among others (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). In this work, we implemented a simple high-throughput and target-oriented assay for screening of 40 medicinal plant crude extracts for detecting inhibitors to fungal endo-1,3- β -glucanase. This assay would facilitate the biological evaluation of plant crude extracts during the Hit-to-lead transition of a novel class of plant disease control agent discovery.

Forty medicinal/aromatic plants species listed in Table1, were collected from native populations of the Sonora Desert and sun-dried for several weeks. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of Universidad de Sonora (Mexico).

To plant extracts, five hundred grams of leaves and small stems of dried plants were sequentially

han presentado propiedades antifúngicas contra un panel de hongos fitopatogénicos, nos concentramos en la búsqueda de aquellos extractos de plantas que inhibiría de forma selectiva la síntesis de la pared celular fúngica, mediante la inhibición de la endo- β -1,3-glucanasa, en aquellos hongos que lo contienen, tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Tilletia*, *Botryotinia*, *Alternaria*, *Phytophthora*, entre otros (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). En el presente trabajo implementamos un ensayo simple pero orientado a un sitio-objetivo para la evaluación de 40 extractos crudos de plantas medicinales para la detección de inhibidores de la endo-1,3- β -glucanasa fúngica. Este ensayo facilitaría la evaluación biológica de extractos crudos de plantas durante el descubrimiento de moléculas guías para desarrollar una nueva clase de agente de control de enfermedades ocasionadas por hongos.

Cuarenta plantas medicinales/aromáticas, enlistadas en el Cuadro 1, fueron recolectadas de poblaciones nativas del desierto de Sonora y secadas al sol por varias semanas. Un espécimen voucher fue depositado en el Herbario de la Universidad de Sonora (México).

Para obtener los extractos de las plantas, se extrajeron secuencialmente 500 gramos de hojas y pequeños tallos de cada planta seca con diclorometano (1 L) y metanol (1 L), la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 7 días en la oscuridad. Los filtrados de cada solvente fueron evaporados por completo bajo presión reducida para obtener un residuo viscoso, llamado el extracto crudo de la planta. Los extractos crudos fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido para llevar a cabo el ensayo de difusión en gel.

Para preparar el gel de agarosa, se disolvieron 1.6 g de agarosa en 100 mL de buffer de incubación (0.1 M ácido cítrico, 0.2 M fosfato de sodio, pH 5.0) en un horno de microondas. Se dejó enfriar la mezcla a 50 °C y fue agregado de forma gradual laminarin de *Laminaria digitata* (0.5 g en 100 mL de

extracted with dichloromethane (1 L) and methanol (1 L), the slurry was held at room temperature for 7 days in darkness. The filtrates of each solvent were evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a viscous residue, called plant crude extract. The crude extracts were re-suspended in dimethylsulfoxide to perform the gel diffusion assay.

To agarose gel preparation, one point six grams of agarose were dissolved in 100 mL of incubation buffer (0.1 M citric acid, 0.2 M sodium phosphate, pH 5.0) in a microwave oven. The mix was cooled at 50 °C and laminarin from *Laminaria digitata* (0.5 g in 100 mL of 0.1 M citric acid/0.2 M sodium phosphate buffer, pH 5.0) was gradually added, and the solution was vigorously shaken. Twenty mL of warm agarose-laminarin mix were pipeted into glass Petri dishes (14 cm x 2 cm) and let them cooled at room temperature until agarose solidified. After that, a cork borer was used to cut 2-mm diameter wells in the gel, evenly spaced as radii in the Petri dishes. Excised gel pieces were removed by vacuum.

To Diffusion assay, endo1,3- β -glucanase standard from *Trichoderma* species (5 unit) was dissolved in 1 mL of 0.1 M citric acid/0.2 M sodium phosphate buffer (pH 5.0) to prepare a standard stock solution. Crude plant extracts (17.5 mL) and pure glucanase (2.5 mL) were pipeted into individual wells in the gel plates. One well with pure glucanase (2.5 mL) and incubation buffer (17.5 mL) were added to each Petri dish as a positive control and one well with 20 mL of incubation buffer were added as negative control. The Petri dishes were incubated at 28 °C for 16 h. After incubation, gels were stained with 20 mL of freshly prepared calcofluor [0.1 g in 100 mL of 500 mM Tris-HCl (pH 8.9)] for 10 min. The gels were gently washed three times with distilled water during two hours, using a shaker.

Hydrolyzed laminarin zones in the gel were visualized by UV transillumination as

Cuadro 1. Evaluación de extractos de plantas obtenidos en metanol (MeOH) or diclorometano (DCM) para detectar inhibidores de endo- β -1,3-glucanasa usando el ensayo de difusión de gel.

Table 1. Evaluation of plant extract obtained in methanol (MeOH) or dichloromethane (DCM) to detect fungal endo- β -1,3-glucanase inhibitors using the gel diffusion assay.

| Plant | MeOH Extract | DCM extract |
|------------------------------------|--------------|-------------|
| <i>Ambrosia ambrosioides</i> | --- | +++ |
| <i>Ambrosia confertiflora</i> | --- | --- |
| <i>Anemopsis californica</i> | --- | --- |
| <i>Argemone mexicana</i> | --- | --- |
| <i>Artemisia ludoviciana</i> | --- | --- |
| <i>Atriplex elegans</i> | --- | --- |
| <i>Avicennia germinans</i> | --- | --- |
| <i>Baccharis glutinosa</i> | --- | --- |
| <i>Bursera laxiflora</i> | --- | --- |
| <i>Bursera mycophylla</i> | --- | --- |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i> | --- | +++ |
| <i>Damiana officinalis</i> | --- | --- |
| <i>Datura stramonium</i> (leaves) | --- | --- |
| <i>Datura stramonium</i> (flowers) | --- | --- |
| <i>Encelia farinosa</i> | --- | +++ |
| <i>Euphorbia aerea</i> | --- | --- |
| <i>Euphorbia postrata</i> | --- | --- |
| <i>Euphorbia hyssopifolia</i> | --- | --- |
| <i>Forchaheria watsoii</i> | --- | --- |
| <i>Guasuma ulmifolia</i> | --- | --- |
| <i>Haemaxilon brazziletto</i> | --- | --- |
| <i>Hibiscus cannabinus</i> | --- | --- |
| <i>Jatropha cinerea</i> | --- | --- |
| <i>Jacquinia macrocarpa</i> | --- | --- |
| <i>Larrea tridentate</i> (leaves) | +++ | --- |
| <i>Mascagnia macroptera</i> | --- | --- |
| <i>Maximowczia sonora</i> | --- | --- |
| <i>Mellia azedarach</i> | --- | --- |
| <i>Neirum oleander</i> | --- | --- |
| <i>Nicotina glauca</i> | --- | --- |
| <i>Proboscidea parviflora</i> | +++ | --- |
| <i>Pachycormus discolor</i> | --- | --- |
| <i>Ricinus communis</i> | --- | --- |
| <i>Rizophora mangle</i> | --- | +++ |
| <i>Sarcostemma cynanchoides</i> | --- | --- |
| <i>Strathantas palmen</i> | --- | --- |
| <i>Turnera diffusa</i> (leaves) | --- | --- |
| <i>Turnera diffusa</i> (stems) | +++ | --- |
| <i>Valeriana officinalis</i> | --- | --- |
| <i>Vallessia glabre</i> | --- | --- |

0.1 M ácido cítrico /0.2 M buffer de fosfato de sodio, pH 5.0) y la solución se agitó vigorosamente.

nonfluorescent dark circles in a fluorescent background (undigested laminarin stained by

Se vertieron 20 mL de la mezcla tibia de agarosa-laminarin en cajas Petri de vidrio (14 cm x 2 cm) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que la agarosa se solidificara. Posteriormente, se usó un sacabocados para cortar pozos de 2 mm de diámetro en el gel, separados equitativamente, como radios en las cajas Petri. Los pedazos de gel fueron removidos con aspiradora.

Para el ensayo de difusión en gel, el estándar de endo-1,3- β -glucanasa de *Trichoderma* sp. (5 unidades) se disolvió en 1 mL de 0.1 M ácido cítrico /0.2 M buffer de fosfato de sodio (pH 5.0) para preparar una solución stock del estándar. Los extractos crudos de plantas (17.5 mL) y glucanasa pura (2.5 mL) fueron pipetados individualmente en pozos del gel. Un pozo con glucanasa pura (2.5mL) y buffer de incubación (17.5 mL) fueron agregados a cada caja Petri como control positivo y un pozo con 20 mL de buffer de incubación fue agregado como control negativo. Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C por 16 h. Después de la incubación, los geles fueron teñidos con 20 mL de calcoflúor recientemente preparado [0.1 g en 100 mL de 500 mM Tris-HCl (pH 8.9)] por 10 min. Los geles fueron lavados tres veces con agua destilada por dos horas.

Usando un transiluminador de UV se visualizaron las zonas hidrolizadas de laminarin como círculos oscuros no fluorescentes en un fondo fluorescente (laminarin no digerida teñida por calcoflúor). Los diámetros de las zonas hidrolizadas fueron medidos (mm) en el gel de agarosa. El ensayo fue llevado a cabo al menos cinco veces usando ocho réplicas para cada extracto.

Durante la estandarización del ensayo de difusión de gel, el laminarin incorporada en gel de agarosa fue fácilmente hidrolizada por la acción de la enzima endo-1,3- β -glucanasa, produciendo círculos transparentes alrededor de los pozos, que fueron medibles. La Figura 1 muestra una relación lineal entre los diámetros de las zonas hidrolizadas en el gel con las unidades de enzimas añadidas al

calcoflúor). The diameter of hydrolyzed zone were measured (mm) on agarose gel. The assay were conducted at least five times using eight replicates for each extract.

During standardization of gel diffusion assay, laminarin incorporated in agarose gel was easily hydrolyzed by action of endo-1,3- β -glucanase enzyme, produced a clear circles around the wells, which were measurable. Figure 1 shows a linear relationship between the diameters of the hydrolyzed zones in the gel with the units of enzyme added to the well. The coefficient of determination for the regression line was 0.9879. Similar results were obtained in five other experiments. This result suggests that assay can be used for qualitative and quantitative analysis when been necessary.

After the assay conditions were established, we evaluated 80 crude plant extracts (40 from dichloromethane and 40 from methanol) in order to detect endo- β -(1-3)-glucanase inhibitors. Figure 2 shows images of gel diffusion agar assay in which dark circles around the wells represent plant extracts that did not contain inhibitors of endoglucanase activity (E_3 - E_{11}). On the contrary, wells in which no dark circles appeared were considered as plant extracts that contained compounds that inhibit the enzyme activity (E_1 , E_2 and E_{12}).

Results of the radial gel diffusion assay to detect inhibitors of fungal endo- β -(1-3)-glucanase activity in crude plant extracts are shown in Table 1. Of the 80 plant extracts evaluated just 3 obtained with methanol (MeOH) and 4 obtained in dichloromethane (DCM), showed endo-1,3- β -glucanase inhibition (Table 1). These results suggest that 7.5 % of MeOH extracts and 10 % of DCM extract, contain compounds that inhibit fungal enzyme. Although other assays to detect glucanase inhibitors may be more sensitive and accurate, they may also be time consuming, and require specialized equipment (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) or several steps (Pan *et al.*, 1991).

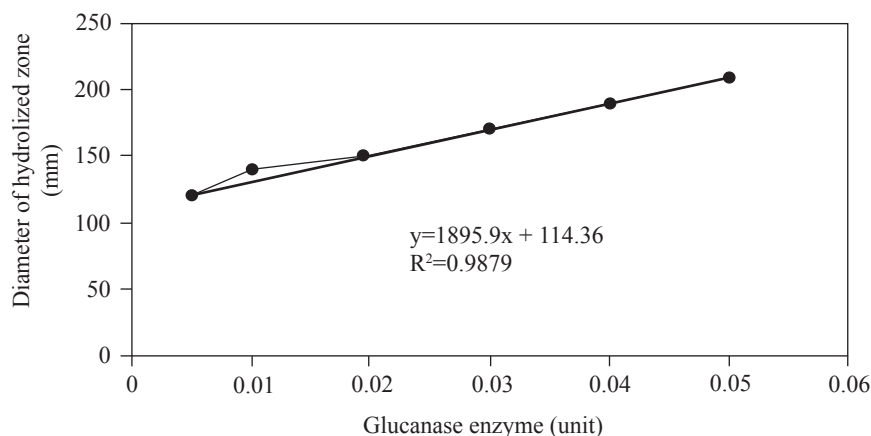


Figure 1. Línea de regresión que correlaciona el diámetro de las zonas hidrolizadas en el gel de agarosa con unidades de glucanasa pura. Cada punto representa las medias de 8 muestras de réplica. En otros cinco experimentos se obtuvieron ecuaciones de regresión similares.

Figura 1. Regression line correlating the diameter of hydrolyzed zones in the plate with unit of pure glucanase. Each point represents the means of 8 replicate samples. Similar regression equations were obtained in five other experiments

pozo. El coeficiente de determinación de la línea de regresión fue de 0.9879. Otros cinco experimentos obtuvieron los mismos resultados. Este resultado indica que el ensayo puede ser usado para análisis cualitativos o cuantitativos cuando sea necesario.

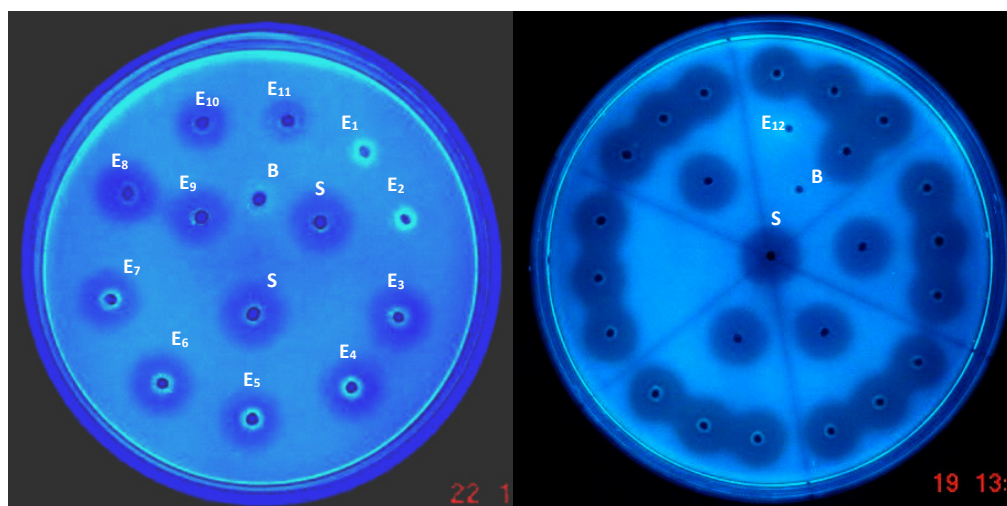
Después de establecer las condiciones, evaluamos 80 extractos crudos de plantas (40 de diclorometano y 40 de metanol) para poder detectar inhibidores de endo- β -(1-3)-glucanasa. La Figura 2 muestra imágenes del ensayo de difusión en gel, donde los círculos oscuros alrededor de los pozos representan extractos de plantas que no contenían inhibidores de actividad de endoglucanasa (E_3 - E_{11}). Por el contrario, los pozos en los que no aparecían círculos oscuros fueron considerados extractos de plantas que contenían compuestos que inhiben la actividad enzimática (E_1 , E_2 and E_{12}).

Los resultados del ensayo de difusión de gel radial para detectar inhibidores de la actividad fúngica de endo- β -(1-3)-glucanasa en extractos crudos de plantas, se muestran en el Cuadro 1. De los 80 extractos de plantas evaluados, sólo 3 obtenidas

Natural products screening remains one of the most useful avenues for finding new, unique molecules to serve as leads for the development of novel crop protection agents (Thompson *et al.*, 2000). Developing more rapid throughput screens for natural products should greatly accelerate progress in the discovery of these molecules. Because of limited screening methodologies, often hundreds of natural compounds are discarded. The gel diffusion assay is a valuable tool for screening crude plant extract in a massive, rapid and inexpensive way, compared with Somogyi and Nelson coupled procedure.

Several experiments indicating a high reproducibility of the assay, for this reason, we can concluded that the gel diffusion assay was successfully used to detection of inhibitors of fungal endo- β -(1-3)-glucanase present in crude plant extracts.

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



**Figura 2.** Imágenes del ensayo de gel de difusión para detectar inhibidores de  $\beta$ -(1-3)-glucanasa en extractos crudos de plantas. Cada pozo etiquetado con **E** contenía 17.5  $\mu$ L de extracto crudo de planta y 2.5  $\mu$ L de glucanasa. El pozo **S** contenía 2.5  $\mu$ L (0.125 unidad) de glucanasa pura de la especie *Trichoderma* y 17.5  $\mu$ L de buffer de incubación. El pozo **B** contenía 20  $\mu$ L de buffer de incubación como control.

**Figure 2.** Images of gel diffusion agar assay to detect inhibitors of  $\beta$ -(1-3)-glucanase in crude plant extracts. Each well label as **E** contained 17.5  $\mu$ L of crude plant extract and 2.5  $\mu$ L of glucanase. Well **S** contained 2.5  $\mu$ L (0.125 unit) of pure glucanase from *Trichoderma* species and 17.5  $\mu$ L of incubation buffer. Well **B** contained 20  $\mu$ L of incubation buffer

con metanol (MeOH) y 4 obtenidas en diclorometano (DCM), mostraron inhibición de endo-1,3- $\beta$ -glucanasa (Cuadro 1). Estos resultados sugieren que 7.5 % de los extractos de MeOH y 10 % de los extractos de DCM contienen compuestos que inhiben la enzima fúngica. Si bien otros ensayos para detectar inhibidores de glucanasa pueden ser más sensibles y precisos, también pueden ser tardados y requerir de equipo especializado (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) o muchos pasos en el proceso de evaluación (Pan *et al.*, 1991).

La evaluación de productos naturales sigue siendo una de las vías más útiles para encontrar moléculas nuevas y únicas que sirvan como pistas para el desarrollo de nuevos agentes para la protección de los cultivos (Thompson *et al.*, 2000). Desarrollar metodologías de evaluación más rápidas para los productos naturales, podría acelerar mucho el proceso de descubrimiento de estas moléculas. Debido a la falta de metodologías de evaluación

masiva, muchas veces se descartan cientos de compuestos naturales con potencial antifúngico. El ensayo de difusión de gel es una herramienta valiosa para evaluar extractos crudos de planta de forma masiva, rápida y económica, en comparación con el procedimiento acoplado de Somogyi y Nelson.

Varios experimentos indican una alta reproducibilidad del ensayo, por lo que podemos concluir que el ensayo de gel de difusión fue usado de manera exitosa para detectar inhibidores de endo- $\beta$ -(1-3)-glucanasa fúngica presente en extractos crudos de plantas.

## LITERATURE CITED

- Baladrón V, Ufano S, Dueñas E, Martín-Cuadrado B, Del Rey F and Vazquez de Aldana C. 2002. Eng1p, an endo-1,3- $\beta$ -1,3-glucanase localized at the daughter side of cell separation in *Sacharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1:774-786. doi: 10.1128/EC.1.5.774-786.2002

- Dooley H, Shaw MW, Spink J and Kildea S. 2016. The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest Management Science* 72:1150-1159. doi:10.1002/ps.4093
- Douglas, A.M. 2001. Fungal  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Medical Mycology* 39 Suppl. 1:55-66. Available online: [www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/mmy.39.1.55.66](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/mmy.39.1.55.66).
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latge JP and Fontaine T. 2010. Characterization of a new  $\beta(1-3)$ -Glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry* 285:2386-2396. doi:10.1074/jbc.M109.077545
- Hartl L, Gastebois A, Aimaniananda V and Latgé J.P. 2011. Characterization of the GPI-anchored Endo- $\beta(1-3)$ -Glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biological* 48:185-191. doi:10.1016/j.fgb.2010.06.011
- Kurtz, MB and Rex JH. 2001. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Advances in Protein Chemistry* 56:423-475. doi:10.1016/S0065-3233(01)56011-8
- Liu J and Balasubramanian M. 2001. 1,3- $\beta$ -glucan synthase: A useful target for antifungal drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 1:159-169. doi:http://dx.doi.org/10.2174/1568005014606107
- Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vazquez de Aldana C R and Del Rey F. 2003. The endo- $\beta(1,3)$ -glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 116:1689-1698. doi:10.1242/jcs.00377
- Mishra SN, Rao Ch V, Ojha SK, Vijayakumar M and Verma A. 2010. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1:29-46. doi: [http://dx.doi.org/10.13040/IJP-SR.0975-8232.1\(1\).29-46](http://dx.doi.org/10.13040/IJP-SR.0975-8232.1(1).29-46)
- Muller, U. 2002. Chemical crop protection research. Methods and challenges. *Pure and Applied Chemistry* 74:2241-2246. doi: 10.1351/pac200274122241
- Nelson, N. A. 1944. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153:375-380. Available online: <http://www.jbc.org/content/153/2/375.citation.full.html#ref-list-1>
- Pan SQ, Ye XS and Kuc J. 1991. A technique for detection of chitinase,  $\beta(1,3)$ -glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology* 81:970-974. Available online: [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/Phyto81n09\\_970.pdf](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/Phyto81n09_970.pdf)
- Rivera-Castañeda G, Martínez-Téllez MA, Vallejo-Cohen S, Vargas-Arispuro I, Moya-Sanz P and Primo-Yúfera E. 2001. In vitro Inhibition of Mycelial Growth of *Tilletia indica* by Extracts of Native Plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:2014-217. Available online: [ww.socmexfito.org/images/stories/revista\\_smf/2001/002/61219213.pdf](http://www.socmexfito.org/images/stories/revista_smf/2001/002/61219213.pdf).
- Somogyi, M. 1952. Notes in sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23. Available online: <http://www.jbc.org/content/195/1/19.full.pdf>
- Thompson G, Duton R and Sparks T. 2000. Spinosad-a case atudy: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56:696-702. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<696::AID-PS182>3.0.CO;2-5
- Vargas-Arispuro I, Contreras-Valenzuela A and Martinez-Tellez, MA. 2009. Lignans from *Larrea tridentata* (Creosote Bush) as fungal  $\beta(1,3)$ -glucanase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94:60-63. doi:10.1016/j.pestbp.2009.04.002
- Vargas-Arispuro I, Reyes-Baez R, Rivera-Castañeda G, Martínez-Téllez MA, Rivero-Espejel I. 2005. Antifungal lignans from Creosote Bush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products* 22:101-107. doi:10.1016/j.indcrop.2004.06.003.

# ***In vitro* first report of nutrients and silicon effect over the growth of *Phaeocryptopus gaeumannii* a pathogen of *Pseudotsuga menziesii***

## ***In vitro* primer reporte del efecto de nutrimentos y del silicio en el crecimiento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, un patógeno de *Pseudotsuga menziesii***

Juan Velázquez-Mendoza<sup>1</sup>, Oscar Javier Salgado-Feregrino<sup>1</sup>, María de Jesús Yáñez-Morales<sup>2</sup>, Marcos Jiménez-Casas<sup>1</sup>. Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, <sup>1</sup>Postgrados de Ciencias Forestales y <sup>2</sup>Fitopatología, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo-Texcoco, Estado de México, México, CP 56230. Tel., Fax (595) 95-2-02-00, ext. 1610, 1663. \*Autor para correspondencia: yanezmj@colpos.mx

**Recibido:** 04 de septiembre de 2016.

**Aceptado:** 12 de diciembre de 2016.

Velázquez-Mendoza J, Salgado-Feregrino OJ, Yáñez-Morales MJ, Jiménez-Casas M. 2017. *In vitro* first report of nutrients and silicon effect over the growth of *Phaeocryptopus gaeumannii* a pathogen of *Pseudotsuga menziesii*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 139-149.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1609-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1609-2)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

**Resumen.** El desarrollo de *Phaeocryptopus gaeumannii*, Ascomycota, causante del Tizón Suizo del follaje de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), es influenciado por la composición nutrimental de las acículas. El objetivo del estudio fue examinar el efecto de diferentes elementos esenciales, macronutrimentos y micronutrimentos, para las plantas y del silicio (Si), sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gaeumannii*. Con diferentes nutrimentos y Si se establecieron dos experimentos completamente al

**Abstract.** The development of *Phaeocryptopus gaeumannii*, Ascomycota, the cause of Swiss needle cast on Douglas-fir foliage (*Pseudotsuga menziesii*), is influenced by the nutritional composition of the needles. The objective of the study was to examine the effect of different essential elements, macronutrients and micronutrients, for plants and silicon (Si), on the *in vitro* growth of *P. gaeumannii*. Two completely random experiments were established with different nutrients. The first was the culture of the fungus in 2 % Malt Extract Agar with 10 treatments, and the relative growth rate was calculated; and the second was in liquid medium of Potato Dextrose with 21 treatments, and the mass of the mycelium was measured. Macronutrients favored the growth of *P. gaeumannii*. In contrast, Cu, Mn and Zn micronutrients inhibited the development of the fungus in double doses. In general, Si inhibited the growth of the fungus. The complete nutrient solution of macronutrients

azar. El primero fue el cultivo del hongo en Extracto de Malta-Agar al 2 % con 10 tratamientos, y se calculó la Tasa de Crecimiento Relativo instantánea; y el segundo fue en medio líquido de Papa Dextrosa con 21 tratamientos, y se midió masa del micelio. Los macronutrientes favorecieron el crecimiento de *P. gaeumannii*. En contraste los micronutrientes Cu, Mn y Zn inhibieron el desarrollo del hongo en dosis doble. En general, el Si inhibió el crecimiento del hongo. La solución nutritiva completa de macronutrientes + micronutrientes más 250 y 1000 ppm de Si, indicaron que estas formulaciones pueden contribuir para eventual control de *P. gaeumannii*. Este ensayo preliminar *in vitro*, al parecer es el primer estudio.

**Palabras clave:** Árbol de navidad, coadyuvante, macronutrientes, micronutrientes, tizón suizo, México.

La producción de árbol de navidad Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] en plantaciones forestales ubicadas en Valle de Bravo, estado de México, México, requiere anualmente una fertilización edáfica y foliar con un balance: 5N:1P:1K para favorecer el crecimiento de los brotes nuevos. Aunque éstos brotes y todas las acículas del follaje son susceptibles a *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak un Ascomycota (Shaw *et al.*, 2011) que crece intercelularmente en las acículas (Stone *et al.*, 2008), y forma pseudotecios globosos y negros que se alinean sobre los estomas en el envés (Dennis, 1978), e induce defoliación severa (Skilling, 1981). La fertilización se ha usado para controlar la enfermedad. El exceso de N incrementa la severidad del tizón suizo (El-Hajj *et al.*, 2004), y en balance con P no la incrementa (Mulvey *et al.*, 2013); y acículas sanas en proporción al N, tienen baja dosis de P (Mohren *et al.*, 1986). El silicio (Si)

+ micronutrientes with 250 and 1000 ppm of Si, indicated that these formulations may contribute to eventual control of *P. gaeumannii*. This preliminary *in vitro* trial appears to be the first study.

**Key words:** Christmas tree, adjuvant, macronutrients, micronutrients, swiss needle cast, Mexico.

The production of the Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] Christmas tree in forest plantations located in Valle de Bravo, State of Mexico, Mexico, requires yearly edaphic and foliar fertilization with a balance: 5N:1P:1K to enhance the growth of the new sprouts. Although these sprouts and all the needles of the foliage are vulnerable to *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. An Ascomycota (Shaw *et al.*, 2011) that grow intercellularly in the needles (Stone *et al.*, 2008), and forms black globose pseudothecia that align on the stomata on the underside (Dennis, 1978), and induces severe defoliation (Skilling, 1981). Fertilization has been used to control the disease. The excess N increases the severity of Swiss needle cast (El-Hajj *et al.*, 2004), and balanced with P, it does not increase it (Mulvey *et al.*, 2013); and healthy needles in proportion to N have low P doses (Mohren *et al.*, 1986). Silicon (Si) has not been used to control Swiss needle cast. In other conifers, it is thought to help reduce toxicity by aluminum (Hodson and Sangster, 1999). Si is not included in nutrient formulations since it is not considered essential. Plants accumulate it naturally in the intercellular spaces, in the cell wall, the cell lumen, epidermis, and cuticle; and it possible acts as an adverse factor in the adequate nutrition of fungi. This is based on the fact that in diverse crops it contributes to the reduction of diseases (Datnoff *et al.*, 2011). Based on the general concepts by



no ha sido empleado para el control del tizón suizo. En otras coníferas se considera puede ayudar a disminuir la toxicidad por Aluminio (Hodson y Sangster, 1999). El Si no se incluye en las formulaciones nutritivas por no ser esencial. En forma natural las plantas lo acumulan en los espacios intercelulares, en la pared celular, lumen de la célula, epidermis y cutícula; y actúa posiblemente como un factor adverso en la adecuada nutrición de hongos. Esto en base que en diversos cultivos agrícolas coadyuva a reducir sus enfermedades (Datnoff *et al.*, 2011). Con base en los conceptos generales de Griffin (1994) y Jennings (2007) sobre nutrición y crecimiento micelial de hongos, se puede extrapolar que, al adherirse el Si a la pared celular, las enzimas de las hifas no actúan eficientemente en desdoblar la celulosa a glucosa, y la nutrición del hongo es afectada negativamente por lo que la enfermedad se reduce (Datnoff *et al.*, 2011). En México esta enfermedad se ha detectado en 11 estados, en poblaciones silvestres de *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2007; Cibrián *et al.*, 2014), y en 2005 en la región de estudio con severa defoliación y su control es solo químico (Stone *et al.*, 2007). El objetivo del estudio fue evaluar *in vitro* el efecto de diferentes macronutrientes y micronutrientes y el Si sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gaeumannii*. Se hipotetizó que los macronutrientes y micronutrientes agregados al medio de cultivo afectan el crecimiento del hongo, que el Si le es tóxico, y en presencia del Si el hongo no puede absorber adecuadamente las fuentes de carbono del medio de cultivo reduciendo su tasa de crecimiento hifal.

El estudio se hizo con un aislamiento de *P. gaeumannii* (# JN204508, NCBI) de la Colección de Cultivos del Colegio de Postgraduados-Fitopatología (# CP-A032), aislado de árboles de navidad de *P. menziesii* en Valle de Bravo. La colonia se incrementó en medio de cultivo al 2 % de Extracto de Malta-Agar (MEA) (Crous *et al.*, 2009) (Oxoid

(1994) and Jennings (2007) on fungal nutrition and mycelial growth, we can extrapolate that, when Si adheres to the cell wall, the hyphal enzymes do not act efficiently when unfolding cellulose into glucose, and fungal nutrition is affected negatively, reducing the disease (Datnoff *et al.*, 2011). In Mexico this disease has been found in 11 states, in populations of wild *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2007; Cibrián *et al.*, 2014), and in 2005, in the region studied, with severe defoliation, and its control is only chemical (Stone *et al.*, 2007). The aim of the study was to evaluate *in vitro* the effect of different macronutrientes and micronutrientes and the Si on the growth *in vitro* of *P. gaeumannii*. We hypothesized that the macronutrientes and micronutrientes added to the culture medium affect the fungal growth, that Si is toxic, and in the presence of Si the fungus cannot properly absorb the sources of carbon of the culture medium, reducing its hyphal growth rate.

The study was carried out with an isolation of *P. gaeumannii* (# JN204508, NCBI) from the Culture Collection of the Colegio de Postgraduados-Plant Pathology (# CP-A032), isolated from *P. menziesii* Christmas trees in Valle de Bravo. The culture was increased in a 2 % Malt Extract Agar (MEA) (Crous *et al.*, 2009) (Oxoid LTD, LM0059, England) at a constant temperature of 21 °C and complete darkness for 20 days. To compare the growth responses and as a double evaluation in time, two *in vitro* experiments were conducted. One, in a solid medium (2 % MEA), and the other, in a liquid Potato Dextrose (PD) medium.

**First experiment.** In a factorial experiment with a completely random design, five repetitions and a total of 50 experimental units, ten treatments were evaluated (Table 1). The macronutrient solution had the nutritional balance of 3N: 1P: 3K (100 mL<sup>-1</sup> per treatment), and sodium metasilicate (44 % Si;

LTD, LM0059, Inglaterra) a temperatura constante de 21 °C y oscuridad total durante 20 días. Para comparar las respuestas de crecimiento y como una doble evaluación en tiempo, se condujeron dos experimentos *in vitro*. Uno en medio sólido (2 % MEA) y otro en medio líquido de Papa Dextrosa (PD).

**Primer experimento.** En un experimento factorial con diseño completamente al azar, cinco repeticiones y 50 unidades experimentales en total, se evaluaron diez tratamientos (Cuadro 1). La solución nutritiva de macronutrientes tuvo el balance nutricional de 3N: 1P: 3K (100 mL<sup>-1</sup> por tratamiento), y metasilicato de sodio (44 % Si; Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) como fuente de Si. Los micronutrientes se prepararon y aplicaron como lo describe Hewitt y Smith (1975). A las soluciones (Cuadro 1) se adicionó 2 % MEA, se esterilizaron a 120 °C por 20 min, se midió el pH y se ajustó a 5.5 con 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se vació el medio en cajas Petri de plástico estériles de 8.5 cm de diámetro (diám.). Por caja se sembraron fragmentos de 1 mm de diám. de la colonia de *P. gaeumannii* de 20 días edad de edad, e incubaron a temperatura constante de 21 °C y oscuridad total por 42 días. El crecimiento del diám. colonial (mm) se registró cada siete días y los datos se analizaron con la técnica de análisis de crecimiento de Fisher (1921). Los datos se convirtieron a logaritmo natural (Ln) y se hizo una regresión lineal (Hunt, 2003). La Tasa de Crecimiento Relativo instantáneo (R o TCRi) se obtuvo con el siguiente modelo:  $\text{Ln } a = b + R$  (DDIE) [Dónde:  $a$  = variable evaluada,  $b$  = valor donde la recta cruza la ordenada,  $R$  = TCRi, y DDIE = Días Después de Iniciado el Experimento]. La TCRi del testigo se restó a cada tratamiento y los datos se muestran en Figura 1A. Los valores arriba (+) del eje de las “x” fueron las diferencias en que cada tratamiento superó la TCRi del testigo, y los valores abajo (-) del eje de las “x” fueron las

Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) as a source of Si. The micronutrients were prepared and applied as described by Hewitt and Smith (1975). To the solutions (Table 1) were added 2 % MEA, sterilized them at 120 °C for 20 min, it was measured the pH and adjusted it to 5.5 with 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and pour the medium into sterilized plastic Petri dishes with 8.5 cm in diameter (diam.). For each dish, 1 mm fragment of the 20 day old *P. gaeumannii* culture were plated and incubated at a constant temperature of 21 °C and total darkness for 42 days. The growth of the diam. of the culture (mm) was measured every seven days and the data were analyzed using Fisher’s growth analysis technique (1921). The data were converted into a natural logarithm (Ln) and a linear regression was carried out (Hunt, 2003). The Instant Relative Growth Rate (R or iRGR) was obtained with the following model:  $\text{Ln } a = b + R$  (DDIE) [where:  $a$  = variable evaluated,  $b$  = value where the straight line crosses the ordinate,  $R$  = iRGR and DABE = Days After the Beginning of the Experiment]. The iRGR of the control was subtracted from each treatment and the data are shown in Figure 1A. The values above (+) the “x” axis were the differences in which each treatment surpassed the iRGR of the control, and the values below (-) the “x” axis were the differences in which each treatment fell below the iRGR of the control.

**Second experiment.** This was carried out in a completely random design with five repetitions, 21 treatments (11-31) (Table 1), and a total of 105 experimental units. The control (T31) was only the liquid medium of Potato Dextrose [PD; broth: 200 g white potato without the peel, cut into small pieces and boiled for 20 min in distilled water, and 14 g dextrose (J.T. Baker, 1916-01, Mexico) per liter of distilled water] plus the fungus. Into the medium was added the same nutrient solution mentioned above, some doses changed (Table 1),

**Cuadro 1.** Nutrientes y dosis de Silicio utilizados en dos experimentos *in vitro* en medio solido 2 % de MEA y liquido PD para determinar el crecimiento de la colonia (cm) y el peso seco (mg) del micelio de *Phaeocryptopus gaeumannii*.

**Table 1.** Nutrients and doses of silicon used in two *in vitro* experiments in a solid medium 2 % of MEA and liquid PD to determine the growth of the colony (cm) and the dry weight (mg) of the mycelium of *Phaeocryptopus gaeumannii*.

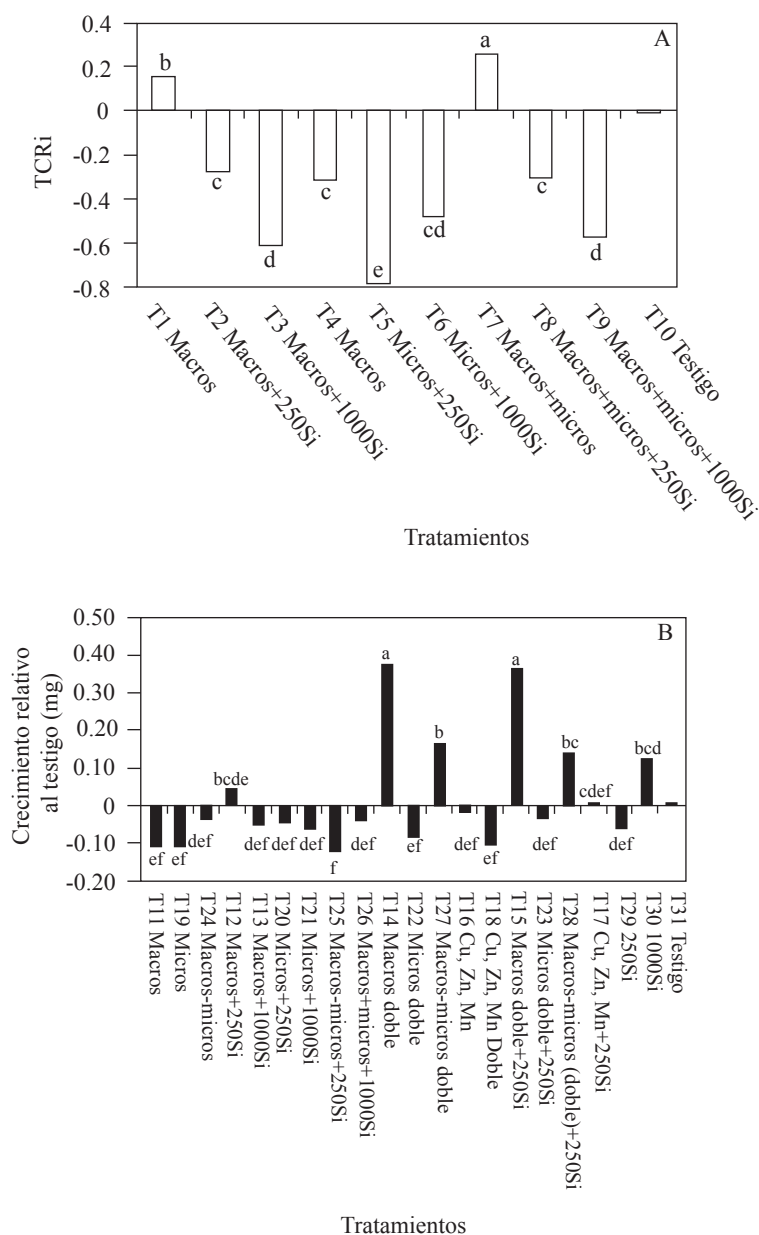
| Medio y Tratamientos (T)                          |                                    | Nutrimento                                  | Silicio<br>(ppm) |
|---------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|------------------|
| Exp. 1: Solido<br>2%MEA <sup>v</sup>              | Exp. 2: Liquido<br>PD <sup>x</sup> |                                             |                  |
| Macronutrientes (macros; 3N: 1P: 3K) <sup>y</sup> |                                    |                                             |                  |
| T1                                                | T11                                | N P K Ca Mg S                               | 0                |
| T2                                                | T12                                | N P K Ca Mg S                               | 250              |
| T3                                                | T13                                | N P K Ca Mg S                               | 1000             |
|                                                   | T14                                | N P K Ca Mg S, en dosis doble               | 0                |
|                                                   | T15                                | N P K Ca Mg S, en dosis doble               | 250              |
| Micronutrientes (micros) <sup>z</sup>             |                                    |                                             |                  |
|                                                   | T16                                | Cu Mn Zn                                    | 0                |
|                                                   | T17                                | Cu Mn Zn                                    | 250              |
|                                                   | T18                                | Cu Mn Zn, en dosis doble                    | 0                |
| T4                                                | T19                                | Fe Cu B Mo Zn Mn                            | 0                |
| T5                                                | T20                                | Fe Cu B Mo Zn Mn                            | 250              |
| T6                                                | T21                                | Fe Cu B Mo Zn Mn                            | 1000             |
|                                                   | T22                                | Fe Cu B Mo Zn Mn, en dosis doble            | 0                |
|                                                   | T23                                | Fe Cu B Mo Zn Mn, en dosis doble            | 250              |
| Completa (macros + micros)                        |                                    |                                             |                  |
| T7                                                | T24                                | N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn              | 0                |
| T8                                                | T25                                | N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn              | 250              |
| T9                                                | T26                                | N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn              | 1000             |
|                                                   | T27                                | N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn, dosis doble | 0                |
|                                                   | T28                                | N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn, dosis doble | 250              |
|                                                   | T29                                | Medio liquido sin nutrientes                | 250              |
|                                                   | T30                                | Medio liquido sin nutrientes                | 1000             |
| T10                                               | T31                                | Testigos (solo el medio de cultivo)         | 0                |

<sup>v</sup>Extracto de Malta-Agar; <sup>x</sup>Papa Dextrosa; <sup>y</sup>Formulación en texto; <sup>z</sup>Hewitt y Smith, 1975 / <sup>v</sup>Malt extract Agar; <sup>x</sup>Potato Dextrose; <sup>y</sup>Formulation in text; <sup>z</sup>Hewitt and Smith, 1975.

diferencias en que cada tratamiento fue menor a la TCRi del testigo.

**Segundo experimento.** Este fue en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, 21 tratamientos (11-31) (Cuadro 1), y un total de 105 unidades experimentales. El testigo (T31) fue sólo el medio líquido [PD; caldo de 200 g de papa blanca libre de cascara, cortada en pequeñas piezas, y

and an incubation period for 35 days. The colony developed in each tube was extracted from the liquid medium, placed in sterilized aluminum foil, and the humidet weight was taken on an electronic scale with an approximation of 0.001 g (AP210- O, Ohaus, New Jersey, U.S.A.). The mycelium samples were transferred to crystal (Pyrex) 5.0 cm Petri dishes and dehydrated in an oven (Craft Instrumentos Cientificos, Mexico) at 35 °C for 48 h and the dry



**Figura 1.** Crecimiento de *P. gaeumannii* en medios sólido y líquido suplementado con diferentes nutrientes y dosis de Silicio. A) Tasa de Crecimiento Relativo instantáneo (TCRi) en medio sólido de 2 % Extracto de Malta-Agar por 42 días, B) Crecimiento relativo (mg) en medio líquido de Papa Dextrosa determinado a los 35 días. Barras arriba del eje de las “x” (+) indicaron que la diferencia de crecimiento del tratamiento fue mayor en relación al testigo, y por debajo del eje (-), que fue menor con relación al testigo. Macros = macronutrientes, Micros = micronutrientes, Si = Silicio.

**Figure 2.** Growth of *P. gaeumannii* in solid and liquid media supplemented with different nutrients and doses of silicon. A) Relative Growth Rate (iRGR) in a solid medium of 2 % Malt Extract Agar for 42 days, B) Relative growth (mg) in liquid Potato Dextrose medium determined after 35 days. Bars above the “x” axis (+) indicated that the difference in growth of the treatment was higher in relation to the control, and below the axis (-), it was lower in relation to the control. Macros = macronutrients, Micros = micronutrients, Si = Silicon.

hervida por 20 min en agua destilada, y 14 g de dextrosa (J.T. Baker, 1916-01, México) por litro de agua destilada] más el hongo. Al medio se agregó la misma solución nutritiva arriba mencionada, algunas dosis cambiaron (Cuadro 1) e incubación por 35 días. La colonia desarrollada en cada tubo se extrajo del medio líquido, se colocó en papel aluminio estéril y se registró peso húmedo en una balanza electrónica con aproximación de 0.001 g (AP210-O, Ohaus, New Jersey, EE. UU.). Las muestras de micelio se transfirieron a cajas Petri (Pyrex) de cristal estériles de 5.0 cm, y se deshidrataron en estufa de cultivo (Craft Instrumentos Científicos, México) a 35 °C por 48 h y se registró el peso seco. A cada variable de peso húmedo y seco, se hizo un análisis de varianza y comparación de medias por Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el paquete estadístico SAS (2009) versión 9.3 (SAS The Power to Know, USA). A cada media de peso seco de los tratamientos se les resto la media del testigo. Datos en Figura 1B.

Los resultados de los dos experimentos fueron estadísticamente significativos.

**Primer experimento.** En todos los tratamientos hubo crecimiento de la colonia de *P. gaeumannii* (Figura 1A). Los macronutrientes (T1) solos favorecieron la TCRi, no obstante, cuando se adicionaron los micronutrientes (T7) el estímulo de crecimiento se incrementó como se espera en una formulación balanceada. Por otro lado, cuando sólo hubo microelementos en el medio (T4) se redujo la TCRi. Con la presencia de macronutrientes (T1 y T7) el hongo dispuso de N y P, elementos básicos para la formación de sustancias proteínicas y metabolitos secundarios que contribuyeron al crecimiento del hongo. El efecto negativo de los microelementos (T4) se redujo debido a la presencia de macroelementos (T7) lo cual favoreció un balance nutritivo para la TCRi. Por el contrario, la adición

weight was taken. For each humid and dry weight variable, an analysis of variance was carried out and a Tukey comparison of averages ( $\alpha =0.05$ ) using the statistical package SAS (2009) version 9.3 (SAS The Power to Know, USA). Each dry weight average for the treatments was subtracted the average of the control. Data in Figure 1B.

The results of both experiments were statistically significant.

**First experiment.** In all treatments there was growth of the *P. gaeumannii* colony (Figure 1A). The macronutrients (T1) alone favored the iRGR, although, when the micronutrients were added (T7) the growth stimulus increased, as expected in a balanced formulation. On the other hand, when there were only micronutrients in the medium (T4) iRGR decreased. In the presence of macronutrients (T1 and T7) the fungus obtained N and P, basic elements for the formation of protein substances and secondary metabolites that contribute to the growth of the fungus. The negative effect of the microelements (T4) was reduced in the presence of macroelements (T7) which promoted a nutritional balance for the iRGR. On the other hand, the addition of Si in the other treatments reduced the iRGR (Figure 1A). The greatest reduction in the growth of the colony was observed when the medium contained micronutrients (T5) and 250 ppm of Si (Figure 1A). The highest concentration of Si (1000 ppm) (T6), did not surpass the inhibitory effect due to the combination micronutrients - 250 ppm Si (T5). This leads to infer that the concentration of the microelements must be balanced with that of Si for an effective inhibition of fungal growth. The inhibitory effect of the Si was corroborated in the treatment in which macronutrients were added to the medium, along with micronutrients plus 1000 ppm of Si (T9). Since there are no reports in the

de Si en los otros tratamientos disminuyó la TCRi (Figura 1A). La mayor reducción en el crecimiento de la colonia se observó cuando el medio contenía micronutrientes (T5) y 250 ppm de Si (Figura 1A).

La concentración más alta de Si (1000 ppm) (T6), no superó el efecto inhibitorio debido a la combinación micronutrientes-250 ppm de Si (T5). Lo anterior lleva a inferir que la concentración de los microelementos debe estar balanceada con la del Si para una efectiva inhibición del crecimiento del hongo. El efecto inhibitorio del Si se corroboró en el tratamiento en el que se adicionaron al medio macronutrientes, micronutrientes más 1000 ppm de Si (T9). Dado que no hay reportes en la literatura sobre el efecto inhibitorio del Si en el crecimiento de hongos *in vitro*, se hipotetiza que ésta podría ser una respuesta de toxicidad. Además, al considerar que en la nutrición de las plantas (incluye a los árboles de navidad, *P. menziesii*) se requiere de una formulación balanceada entre macronutrientes y micronutrientes, el tratamiento T9 debería continuarse estudiando. Aunque el tratamiento T5 fue el mejor de todos, los micronutrientes por si solos no nutren a las plantas, no obstante indicó que la concentración de éstos fue clave para reducir la TCRi del hongo.

**Segundo experimento.** Los resultados se basaron en el peso seco (no hubo diferencias significativas con el peso húmedo). Los tratamientos que mejor estimularon el crecimiento micelial de *P. gaeumannii* fueron siete (barras arriba del eje de las "x"), y donde sobresalieron los tratamientos con doble concentración de macronutrientes sin o con Si (T14, T15) (Figura 1B). Esto, como ya se indicó pudo deberse al N y P que favorecieron un mayor crecimiento micelial. Aunque en dosis normal su efecto fue negativo (T11). Esto pudo atribuirse a que en medio sólido (T1) las hifas tuvieron mayor eficiencia de crecimiento por ser un hongo aeró-

bibliography on the inhibitory effect of Si on the growth of fungi *in vitro*, our hypothesis is that this could be a toxicity response. Also, if we consider that in plant nutrition (including *P. menziesii* Christmas trees) a balanced formula is required between macronutrients and micronutrients, studies on treatment T9 should continue. Although treatment T5 was the best of all, the micronutrients on their own do not nourish plants, yet it indicated that their concentration was key in the reduction of fungal iRGR.

**Second experiment.** Results were based on the dry weight (there were no significant differences with the humid weight). The treatments that best stimulated the mycelial growth of *P. gaeumannii* were seven (bars above the "x" axis), and where the treatments with double concentrations of macronutrients with or without Si (T14, T15) stood out (Figure 1B). This, as mentioned earlier, could have been due to the N and P that favored a greater mycelial growth, although in normal doses, its effect was negative (T11). This could be due to the fact that in a solid medium (T1) hyphae had a greater growth efficiency because it is an aerobic fungus (Griffin, 1994), and in the liquid medium, treatment T14 required twice as many macronutrients to favor the growth in an adverse condition. Treatment T30 with only high doses of Si also promoted fungal growth although in lower amounts. This is possibly due to the nutrients of the liquid medium such as starches (N) and traces of protein derived from the potato extract (PD). On the contrary, in low doses (T29), Si inhibited fungal growth. Both results must continue to be studied using a treatment with water and Si alone. It would also be recommendable to use other Si sources such as Silica Gel,  $\text{NaSiO}_3$  (Griffin, 1994), etc. The other 14 treatments displayed an inhibitory effect in fungal growth (bars below the "x" axis) (-). In

bico (Griffin, 1994), y en medio líquido el tratamiento T14 requirió el doble de macros para favorecer el crecimiento en una condición adversa. El tratamiento T30 con solo dosis alta de Si también promovió el desarrollo del hongo aunque en baja cantidad. Posiblemente, esto pudo deberse a los nutrientes propios del medio líquido como almidones (N) y trazas de proteínas derivados del extracto de papa (PD). Por el contrario, en baja dosis (T29), el Si inhibió el crecimiento del hongo. Ambos resultados deben continuar estudiándose empleando un tratamiento solo con agua y Si. Además sería recomendable usar otras fuentes de Si como el Silica Gel,  $\text{NaSiO}_3$  (Griffin, 1994), etc. Los otros 14 tratamientos mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo (barras abajo del eje de las "x") (-). En relación a los micronutrientes completos (Cuadro 1; seis elementos) en dosis normal y con o sin Si se comportaron como en el primer experimento, y también en dosis doble (T22, T23), y restringieron el crecimiento del hongo. Al reducir los micronutrientes a tres elementos (Cuadro 1; Cu, Mn, Zn), el tratamiento T18 se comportó igual a T19 (seis elementos). Lo que ayudo a inferir que estos tres micronutrientes pueden ser los que inhibieron el crecimiento micelial y en particular el Mn. Griffin (1994) señaló que el exceso de Mn como en tratamiento T18, actúa inhibiendo el crecimiento fungal. No obstante, al adicionar el Si el crecimiento del hongo no se afectó (T17; dosis normal) y el crecimiento fue similar al testigo. Habría que diseñar otros experimentos con dosis dobles de micronutrientes + Si. Los macronutrientes más micronutrientes en dosis doble, y sin o con Si, estimularon el crecimiento micelial (causas arriba expuestas); y en dosis normal la restringieron (Figura 1). El tratamiento que sobresalió fue el T25 con la mayor inhibición micelial. La formulación

relation to the complete micronutrients (Table 1; six elements) in normal doses and with or without Si they behaved as in the first experiment, and also in a double dose (T22, T23), and restricted fungal growth. When reducing micronutrients to three elements (Table 1; Cu, Mn, Zn), treatment T18 behaved the same as T19 (six elements), which led to infer that these three micronutrients could be the ones that inhibited mycelial growth, and Mn in particular. Griffin (1994) pointed out that the excess Mn, as in treatment T18, acts by inhibiting fungal growth. However, when adding Si, fungal growth was not affected (T17; normal dose) and growth was similar to the control. More experiments should be designed with double doses of micronutrients + Si. Macronutrients plus micronutrients in double doses, and with and without Si, stimulated mycelial growth (causes mentioned above); and in normal doses, they restricted it (Figure 1). The treatment that stood out was T25 with the highest mycelial inhibition. The balanced formulation of macroelements and microelements expected in the nutrition of plants, which also included Si as a coadjuvant, indicate that T25 is the best treatment in the liquid medium, which was also observed for treatment T9 in the solid medium. In this way, considering that Si may contribute to reduce the disease (Datnoff *et al.*, 2011), and in complementing an adequate fertilization formulation, it would help to balance the nutritional content of the plant (Mohren *et al.*, 1986), the possibilities of controlling Swiss needle cast could be feasible in future studies. In conclusion, this is the first study on the effect of Si and micronutrients Cu, Mn, Zn on the inhibition of the growth *in vitro* of the fungus *P. gaeumannii*, causal agent of *P. menziesii* in Christmas tree plantations.

balanceada de macroelementos y microelementos esperada en la nutrición de plantas, que incluyó además al Si como coadyuvante, indican que T25 es el mejor tratamiento en medio líquido lo cual también se observó en el tratamiento T9 en medio sólido. Así considerando que con la ayuda del Si se podría coadyuvar en reducir la enfermedad (Datnoff *et al.*, 2011), y en complemento a una adecuada formulación de fertilización se contribuiría a balancear el contenido nutrimental de la planta (Mohren *et al.*, 1986), por ello, las posibilidades del control del Tizón Suizo pueden ser factibles en futuros estudios. En conclusión, este es el primer estudio sobre el efecto del Si y los micronutrientes Cu, Mn, Zn, en la inhibición del crecimiento *in vitro* del hongo *P. gaeumanni*, agente causal de *P. menziesii* en plantaciones de árboles de navidad.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACyT por la beca al segundo autor, a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por uso del Laboratorio en Colegio de Postgraduados, y a la C. Julieta Martínez de la Universidad Autónoma Chapingo, por apoyar los experimentos.

#### LITERATURA CITADA

- Cibrián TD., Alvarado RD., y García-Díaz SE. 2007. Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico. Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Forestal de América del Norte/Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service and Forestry Commission North America. Universidad Autónoma Chapingo. México. 587p. Disponible en línea: <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000036646>
- Cibrián TD., Pérez-Vera OA., García-Díaz SE., Cibrián LVD., Cruz JJ., and Hernández AG. 2014. Tizón Suizo (*Phaeocryptopus gaeumanni* (Rhode) Petrak) en *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr. Rev. Mex. Cien. For. 5:104-115. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11322014000200008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322014000200008)
- Crous PW., Verkley GJM., Groenewald JZ., and Samson RA. (eds.). 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to CONACyT for the scholarship granted to the second author, Dr. Raquel Alatorre Rosas, for the use of the laboratory in the Colegio de Postgraduados, and to C. Julieta Martínez of the Universidad Autónoma Chapingo, for her support with the experiments.

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

- Manual Series, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 269p. Disponible en línea: <http://www.cbs.knaw.nl/Biologicsnews.aspx?Category=laboratory%20manual%20series>
- Datnoff LE, Snyder GH., and Korndörfer GH. (eds). 2011. Silicon in Agriculture. Studies in Plant Science, 8. Florida, USA. 403p. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420\(01\)80001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420(01)80001-X)
- Dennis RWG. 1978. British Ascomycetes. J. Cramer. Vaduz, Alemania. 585p. Disponible en línea: <https://www.amazon.es/British-Ascomycetes-R-W-Dennis/dp/3768205525>
- El-Hajj Z., Kavanagh K., Rose C., and Kanaan-Atallah Z. 2004. Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. New Phytologist 163:139-147. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01102.x
- Fisher RA. 1921. Some remarks on the methods formulated in a recent article on "The quantitative analysis of plant growth". Annals of Applied Biology 7:367-372. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1921.tb05524.x
- Griffin DH. 1994. Fungal Physiology. Wiley-Liss. New York, USA. 458p. Disponible en línea: <http://www.nature.com/subjects/fungal-physiology>
- Hewitt EJ., and Smith TA. 1975. Plant Mineral Nutrition. The English Universities Press. London, UK. 298p. Disponible en línea: <https://www.iberlibro.com/buscar-libro/titulo/plant-mineral-nutrition/autor/hewitt-e-j-smith-t-a/>
- Hodson MJ., and Sangster AG. 1999. Aluminium/silicon interactions in conifers. J. Inorganic Biochem. 76:89-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00119-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00119-1)
- Hunt R. 2003. Growth analysis, individual plants. Pp:579-588. In: Thomas B., Murphy DJ., and Murray D. (eds.). Encyclopedia of Applied Plant Sciences 588-596. Academic Press. London. 600p. Disponible en línea: http://people.exeter.ac.uk/rh203/EAPS_article.pdf
- Jennings DH. 2007. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press. New York, USA. 622p. DOI: 10.1007/BF02908824
- Mohren GMJ., Den Burg J. van, and Burger FW. 1986. Phosphorus deficiency induced by nitrogen input in Douglas fir in the Netherlands. Plant and Soil 95:191-200. DOI: 10.1007/BF02375071
- Mulvey RL., Shaw DC., and Maguire DA. 2013. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western

- Oregon. For. Ecol. and Management 287:147-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2012.08.050>
- Shaw DC., Filip GM., Kanaskie A., Maguire DA., and Littke WA. 2011. Managing an epidemic of Swiss needle cast in the Douglas-fir region Oregon: the role of the Swiss Needle Cast Cooperative. Journal of Forestry 109:109-119. Disponible en línea: <http://sncc.forestry.oregonstate.edu/sites/default/files/2011%20Shaw%20et%20al%20Managing%20SNC%20JoF.pdf>
- Skilling DD. 1981. Control of Swiss needle cast in Douglas-fir. American Christmas Tree J. 25:34-37. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n07_790.PDF
- Stone JK, Reeser PW., and Kanaskie A. 2007. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. West. J. Appl. For. 22 (4), 248-252. Disponible en línea: http://www.cof.orst.edu/coops/sncc/pdfs/pubs/Stone%20et%20al._2007_fungicidal%20suppression.pdf
- Stone JK., Capitano BR., and Kerigan JL. 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. Mycologia 100:431-444. Doi: 10.3852/07-170R1

First record of *Fusarium solani* and *F. equiseti* in plantations of *Jatropha curcas* in Mexico

Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México

Elizabeth Herrera-Parra, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Mocochoá. Mérida, Yucatán, C.P. 97454, México; **Jairo Cristóbal-Alejo**, Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico S/N Conkal, Yucatán. C.P. 97345, México; **Misael Martínez-Bolaños**, INIFAP, Campo Experimental Rosario Izapa. km. 18 de la carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, C.P. 30870, México; **Marianguadalupe Hernández-Arenas**, INIFAP, Campo Experimental Zacatepec, Zacatepec, Morelos, C.P. 62780, México; **Guillermo López-Guillén**^{3*}, INIFAP, Campo Experimental Rosario Izapa. km. 18 de la carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, C.P. 30870, México. *Autor para Correspondencia: lopez.guillermo@inifap.gob.mx.

Recibido: 04 de septiembre de 2016.

Aceptado: 21 de diciembre de 2016.

Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Martínez-Bolaños M, Hernández-Arenas M, López-Guillén G. 2017. First record of *Fusarium solani* and *F. equiseti* in plantations of *Jatropha curcas* in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 150-161.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1608-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1608-1)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

Resumen. El piñón (*Jatropha curcas*) es una planta multipropósitos que ha adquirido importancia debido a que el aceite que se extrae de sus semillas, se puede transformar en biodiesel. Desde el año 2012, en plantaciones de *J. curcas* ubicadas en Yucatán, México, se observaron síntomas de marchitez, necrosamiento de tejido vascular y

Abstract. Physic nut (*Jatropha curcas*) is a multipurpose plant that has acquired importance as biofuel; due to the oil extracted, its seed can be used to produce biodiesel. Vascular tissue necrosis, vascular wilting, root rot, dieback and shortening symptoms were observed in *J. curcas* plantations in Yucatan, Mexico. The objective this work was to identify the causal agent of symptoms using conventional and molecular techniques. Pathogenicity tests in the greenhouse, morphological characterization and sequence analysis showed that the causal agents of the disease were *Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*. This is the first report of *F. solani* as causal agent of vascular tissue necrosis, vascular wilting and root rot, and also the first report of *F. equiseti* to cause dieback and shortening in *J. curcas* in Mexico.

acortamiento de entrenudos. El objetivo del trabajo fue identificar el agente causal de los síntomas descritos por medio de métodos convencionales y moleculares. Las pruebas de patogenicidad en invernadero, caracterización morfológica, así como el análisis de secuencias mostraron que los agentes causales de los síntomas de la enfermedad fueron *Fusarium solani* y *Fusarium equiseti*. Este es el primer reporte de *F. solani* como agente causal de necrosamiento de tejido vascular, marchitez y pudrición de raíz, y también es el primer reporte de *F. equiseti* como responsable de muerte descendente y acortamiento de entrenudos en plantas de *J. curcas* en México.

Palabras clave: *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, fitopatógenos, piñón.

El piñón (*Jatropha curcas*) es un arbusto perenne multipropósitos que pertenece a la familia Euphorbiaceae; se considera nativo de Centroamérica, particularmente de México (Openshaw, 2000; Pecina-Quintero *et al.*, 2014). Esta planta, se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América, en donde se cultiva con la finalidad de extraer aceite de sus semillas y producir biodiesel (Heller, 1996; Wang *et al.*, 2008). *Jatropha curcas* es resistente a la sequía y por su toxicidad se considera resistente y/o tolerante al ataque de plagas y enfermedades (Heller, 1996; Zamarripa-Colmenero *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010).

La expansión global de *J. curcas* como cultivo, ha contribuido a la aparición de enfermedades de etiología desconocida, a pesar de la supuesta resistencia y/o tolerancia que se le atribuye (Machado y Pereira, 2012; Machado *et al.*, 2014). De acuerdo con la literatura, *J. curcas* es atacada por 42 hongos, cuatro bacterias y dos virus (Alonso y Lezcano, 2014). Entre las enfermedades más comunes en plantaciones de *J. curcas*, están las causadas por

Key words: *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, phytopathogens, *physic nut*.

Physic nut (*Jatropha curcas*) is a perennial multipurpose flowering plant that belongs to the family Euphorbiaceae. It is native to Central America but most likely to Mexico (Openshaw, 2000; Pecina-Quintero *et al.*, 2014). Physic nut is distributed across tropical and subtropical regions of Asia, Africa and America, where it is grown for seed oil extraction and biodiesel production (Heller, 1996; Wang *et al.*, 2008). *Jatropha curcas* is resistant to drought and, because of its toxicity, it is considered to be resistant and/or tolerant to plant pests and diseases (Heller, 1996; Zamarripa-Colmenero *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010).

The global expansion of *J. curcas* as a crop has contributed to disease outbreaks of unknown etiology in spite of the supposed resistance and/or tolerance attributed to this species (Machado and Pereira, 2012; Machado *et al.*, 2014). According to literature, *J. curcas* is infested by 42 fungi, four bacteria and two viruses (Alonso and Lezcano, 2014). Among the most common diseases found in *J. curcas* plantations are those caused by fungi, including *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* (anthracnosis); *Passalora jatrophi*, *Cercospora jatrophi*, *Pseudocercospora jatrophae* (leaf spot); *Pseudoidium jatrophae* (powdery mildew); *Phakopsora arthuriana* (rust); *Lasiodiplodia theobromae* (dieback); *Fusarium solani* (root rot); *Macrophomina phaseolina* (crown and root rot); *Rhizoctonia bataticola* (root rot); *Botryosphaeria dothidea* (canker) and other fungi (Kumar *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2011; Machado and Pereira, 2012; Ellison, 2015).

In Mexico, as a result of research conducted by different institutions, there have been reports of damage caused by plant pathogens to *J. curcas*. Valdez-Rodríguez *et al.* (2011) reported the presence

hongos, tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* (antracnosis); *Passalora jatrophi-gena*, *Cercospora jatrophiicola*, *Pseudocercospora jatrophae* (mancha foliar); *Pseudoidium jatrophae* (cenicilla); *Phakopsora arthuriana* (roya); *Lasiodiplodia theobromae* (muerte descendente); *Fusarium solani* (pudrición de la raíz); *Macrophomina phaseolina* (pudrición de corona y raíz); *Rhizoctonia bataticola* (pudrición de raíz); *Botryosphaeria dothidea* (cancro) y otros hongos (Kumar *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2011; Machado y Pereira, 2012; Ellison, 2015).

En México, como resultado de investigaciones desarrolladas por diferentes instituciones se han reportado problemas ocasionados por fitopatógenos en *J. curcas*. Valdéz-Rodríguez *et al.* (2011) reportaron la presencia de *Pythium aphanidermatum* en plántulas y semillas cultivadas en Veracruz, mientras que Espinoza *et al.* (2012) encontraron a *Alternaria alternata* en inflorescencias con síntomas de necrosamiento en Sinaloa. Otras enfermedades de *J. curcas* que se han reportado en México son causadas por *C. gloeosporioides*, *C. circinans*, *P. arthuriana*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Ralstonia solanacearum* (Valdez-Rodríguez *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012; Nolasco-Guzmán *et al.*, 2013; Quiroga-Madrugal *et al.*, 2013; Salazar-Pinacho *et al.*, 2016).

En Yucatán, México, se observaron en algunas plantaciones de *J. curcas* desde el año 2012, síntomas de marchitez, necrosis, acortamiento de entrenudos y muerte de plantas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar el (los) agente (s) causal (es) de los síntomas en plantaciones de *J. curcas*.

Los muestreos se realizaron en dos plantaciones experimentales de *J. curcas* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicadas en el Campo Experimental

of *Pythium aphanidermatum* in seedlings and seed cultivated in Veracruz, while Espinoza *et al.* (2012) found *Alternaria alternata* in inflorescences showing symptoms of necrosis in Sinaloa. Other *J. curcas* diseases reported in Mexico are caused by *C. gloeosporioides*, *C. circinans*, *P. arthuriana*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Ralstonia solanacearum* (Valdez-Rodríguez *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012; Nolasco-Guzmán *et al.*, 2013; Quiroga-Madrugal *et al.*, 2013; Salazar-Pinacho *et al.*, 2016)

In Yucatán, Mexico, symptoms of wilting, necrosis, shortened internodes and dead plants have been observed since 2012 in some plantations. For this reason, this research was aimed at identifying the agent or agents causing symptoms of diseases in *J. curcas* plantations.

Samplings were conducted in two *J. curcas* experiment plantations of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in the Campo Experimental Mocochoá (21° 06' N and 89° 26' O at 13 masl) and Sitio Experimental Uxmal, in Yucatán (20° 25' N and 89° 46' O, at 50 masl), respectively. The two plantations accounted for 3,000 plants; directed samplings of plants with symptoms of necrotic vascular tissue, wilting, root rot, dieback and shortened internodes were conducted at both sites. At least 2 % of plants were sampled in each plantation.

Samples with infected tissue were placed in brown paper bags and taken to the Laboratory of Plant Pathology of the Instituto Tecnológico de Conkal for testing purposes.

In the laboratory, to isolate fungi associated with root and internodes rot, 0.5 cm² cuttings of diseased tissue were made, which then were disinfected with 2 % sodium hypochlorite for 1 min, washed twice with distilled water and placed on sterile absorbent paper to remove excess of moisture. Later, separately, each sample was sown in 90 mm

Mocochá (21° 06' N y 89° 26' O, a 13 msnm) y Sitio Experimental Uxmal, en Yucatán (20° 25' N y 89° 46' O, a 50 msnm), respectivamente. Las dos plantaciones cuentan con 3,000 plantas, en las cuales se realizaron muestreos dirigidos en plantas con síntomas de necrosamiento de tejido vascular, marchitez, pudrición de raíz, muerte descendente y acortamiento de entrenudos. En cada plantación se muestreó al menos el 2 % de las plantas.

Las muestras con tejido infectado, se introdujeron en bolsas de papel estraza y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal para su estudio.

En laboratorio para el aislamiento de los hongos asociados a la pudrición de raíz y entrenudos, se realizaron cortes de 0.5 cm² del tejido enfermo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min, se lavaron con dos cambios de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente por separado, cada muestra se sembró en cajas Petri de 90 mm conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), colocando cinco cortes por caja Petri. Éstas se incubaron a 28±1 °C hasta observar crecimiento de micelio. Finalmente, con una aguja estéril, porciones de micelio fueron transferidos individualmente a nuevas cajas Petri con PDA.

La identificación del agente causal del necrosamiento de tejido vascular, marchitez, pudrición de raíz, muerte descendente y acortamiento de entrenudos de *J. curcas*, se realizó por medio de la observación de preparaciones temporales y permanentes de hongos de acuerdo con la metodología de Cristóbal-Alejo *et al.* (2013). La identificación a nivel de género y especie se hizo usando claves de Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006), respectivamente. Las preparaciones observadas con microscopio compuesto, se fotografiaron con una cámara Sony Cbershot.

Petri dishes (five cuts per Petri dish) containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. The samples were incubated at 28±1 °C until mycelium growth was observed. Finally, using a sterile needle, portions of mycelium were individually transferred to new Petri dishes with PDA.

The identification of the causal agent of *J. curcas* necrotic vascular tissue, wilting, root rot, dieback and internodes shortening was made through observation of temporary and permanent preparations of fungi using the methodology by Cristóbal-Alejo *et al.* (2013); the identification at the genus and species levels was made following the keys of Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006), respectively. Pictures of the preparations observed under a compound microscope were taken with a Sony Cybershot digital camera.

The molecular identification of fungi was based on a sequence analysis of specific DNA regions (Seifert *et al.*, 2007). The DNA extraction was carried out with a Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™, and the DNA integration was verified through 1.2 % agarose gel electrophoresis. The conventional polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the internal regions ITS1 and ITS2 between the ribosomal genes (rADN) 18S-5.8S and 28S with the primers ITS1 and ITS4 (Manter and Vivanco, 2007). The reaction mixture included the primers ITS1 and ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA Polymerase (2.5 units) and DNA (100 ng) for a final volume of 50 µL. The amplification was performed in a Thermocycler (TECHNE®-312, Minnesota, USA) under the following conditions: initial denaturation of 2 min at 95 °C, followed by 30 cycles (denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 54 °C for 30 s and an extension of 1 min at 72 °C) with a final extension of 5 min at 72 °C (White *et al.*, 1990).

La identificación molecular de los hongos se basó en un análisis de la secuencia de regiones del ADN específicas (Seifert *et al.*, 2007). Para la extracción de ADN se utilizó el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ y la integración del ADN se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, para la amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 28S con los iniciadores ITS1 e ITS4 (Manter y Vivanco, 2007). La mezcla de reacción consistió en iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 µL. La amplificación se realizó en un Termociclador (TECHNE®-312, Minnesota, EE.UU.), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (White *et al.*, 1990).

Los productos finales de la amplificación, se visualizaron en gel de agarosa al 2 % (Ultra Pure™). Los fragmentos amplificados se enviaron a la empresa MacroGen (EE.UU.) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con las depositadas en el banco de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information) con ayuda del programa BLASTn. Las secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank para obtener su número de acceso.

Se implementaron los postulados de Koch para confirmar la patogenicidad de los aislados fúngicos que se obtuvieron consistentemente a partir de los tejidos sintomáticos de plantas de *J. curcas*. Para el hongo aislado de plantas con síntomas de necrosamiento de tejido vascular, marchitez y pudrición de raíz, se desinfectaron semillas de *J. curcas* con hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min, se

The final products of the amplification were visualized in 2% agarose gel (Ultra Pure™). The amplified fragments were delivered to the company MacroGen (USA) to be sequenced. The sequences obtained were analyzed and compared with the sequences stored at the gene bank of NCBI (National Center for Biotechnology Information) using BLASTn. The sequences were submitted to the GenBank database to obtain their access number.

The Koch's postulates were used to confirm the pathogenicity of fungi isolates obtained consistently from asymptomatic tissue of plants of *J. curcas*. For the isolate fungus of plants with necrotic vascular tissue, wilting and root rot, seeds of *J. curcas* were disinfected with 1 % sodium hypochlorite for 2 min, washed twice with sterile distilled water and sown in 1L polystyrene cups containing sterile soil. After seed germination, twenty 40-day-old plants were selected; 2mm-deep cuts in the plant neck or bottom were made and inoculated by spraying a 1 x 10⁶ mL⁻¹ spore concentration. Twenty plants sprayed with sterile distilled water were used as control. The cuts of all the plants were covered with Parafilm® paper and left in the greenhouse until symptoms appeared. For the fungus isolate of plants showing dieback and shortened internodes, the same methodology was used, but the fungus inoculation was performed 15 cm above the plant's neck or base.

From plants of *J. curcas* with necrotic roots, wilting and necrotic vascular tissue, *Fusarium solani* was isolated and identified (Figure 1A, B y C). These symptoms were also observed by Sharma *et al.* (2001), Wu and Yu (2011), Machado and Pereira (2012), and Machado *et al.* (2012). *Fusarium solani* is the causal agent of root rot symptoms in *J. curcas* plantations in China (Wuet *al.*, 2011), whose teleomorph was identified as *Nectria haematococca*. According to

lavarón con dos cambios de agua destilada estéril y se sembraron en vasos de poliestireno de 1 L de capacidad que contenían suelo estéril. Después de la germinación de las semillas, se seleccionaron 20 plantas de 40 días de edad, a las que se le realizaron incisiones de 2 mm de profundidad en la base del cuello o base de las plantas, y posteriormente, se inocularon por aspersión de esporas a concentración de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. La misma cantidad de plantas se consideraron como testigos en las cuales solo se realizaron incisiones y se asperjó agua destilada estéril. Las incisiones en todas las plantas se cubrieron con papel Parafilm® y se mantuvieron en invernadero hasta la aparición de síntomas. Para el hongo aislado de plantas con muerte descendente y acortamiento de entrenudos se siguió la misma metodología que el caso anterior, con la diferencia que la inoculación del hongo se realizó a 15 cm sobre el cuello o base de la planta.

De plantas de *J. curcas* con raíces necrosadas, marchitez y necrosamiento de tejido vascular, se aisló e identificó a *Fusarium solani* (Figura 1A, B y C). Estos síntomas, también fueron observados por Sharma *et al.* (2001), Wu y Yu (2011), Machado y Pereira (2012), y Machado *et al.* (2012). *Fusarium solani* es el agente causal de los síntomas de pudrición de la raíz en plantaciones de *J. curcas* en China (Wu *et al.*, 2011), cuyo teleomorfo fue identificado como *Nectria haematococca* y de acuerdo con la revisión de literatura, este es el primer reporte en plantaciones de *J. curcas* localizadas en México. *Fusarium solani* presentó micelio algodonoso, septado de color crema con cambios de coloración de azul-verde; microconidios unicelulares, ovoides-arriñonados con 2.7-8.9 μm de largo por 2-4 μm de ancho, producidos en conidióforos individuales o en pares y largos; macroconidios en forma de canoa o media luna, con un diámetro 9.1-38.9 μm por 2.2-4.4 μm con 1-4 septos, paredes gruesas, cilíndricas, superficie dorsal y ventral paralela en

literature reviews, this is the first report in *J. curcas* plantations in Mexico.

Fusarium solani presented cottony mycelium, cream colored septate that changed from blue to green; unicellular and egg-kidney-shaped micronidia 2.7-8.9 μm long x 2-4 μm wide produced in large conidiophores, single and in twos; canoe- or crescent-shaped 9.1-38.9 μm x 2.2-4.4 μm in diameter with 1-4 septates, thick cylindrical walls, back and ventral surface parallel along its entire length, blunt and rounded apical cell with a slot at the base, globose chlamydospores, single and in twos, 6.2-11.1 μm in diameter (Figure 1D and E). These morphological characteristics agree with those described by Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006) for *F. solani*.

Results of search for homology using BLASTn with nucleotide sequences reported by NCBI were 99 % similar to the sequence of the *F. solani* fungus (Access Number U733636). The nucleotides sequence was submitted to the GenBank database with Access Number KY013237.

In plants of *J. curcas* inoculated with *F. solani*, wilting symptoms were observed seven days after inoculation (dpi), followed by a loss of turgidity in plants and chlorosis in leaves, which gradually turned brown (Figure 1C). Root extraction of *J. curcas* at 13 dpi showed necrosis in the vascular system; from the symptoms observed, *F. solani* was isolated. The control plants did not show any symptom. The symptoms observed correspond to those reported by Wu *et al.* (2011) in *J. curcas* plantations in China; the authors found that 2 months after inoculating seedlings of *J. curcas*, they showed symptoms of root rot, leaf chlorosis, leaves falling and necrotic and rotten roots. Similar symptoms were also reported by Herrera-Parra *et al.* (2011) in wilted plants of *Thevetia peruviana*, as well as by Hasan *et al.* (2014) in plants of *Hibiscuss abdariffa* with symptoms of root rot and wilting.

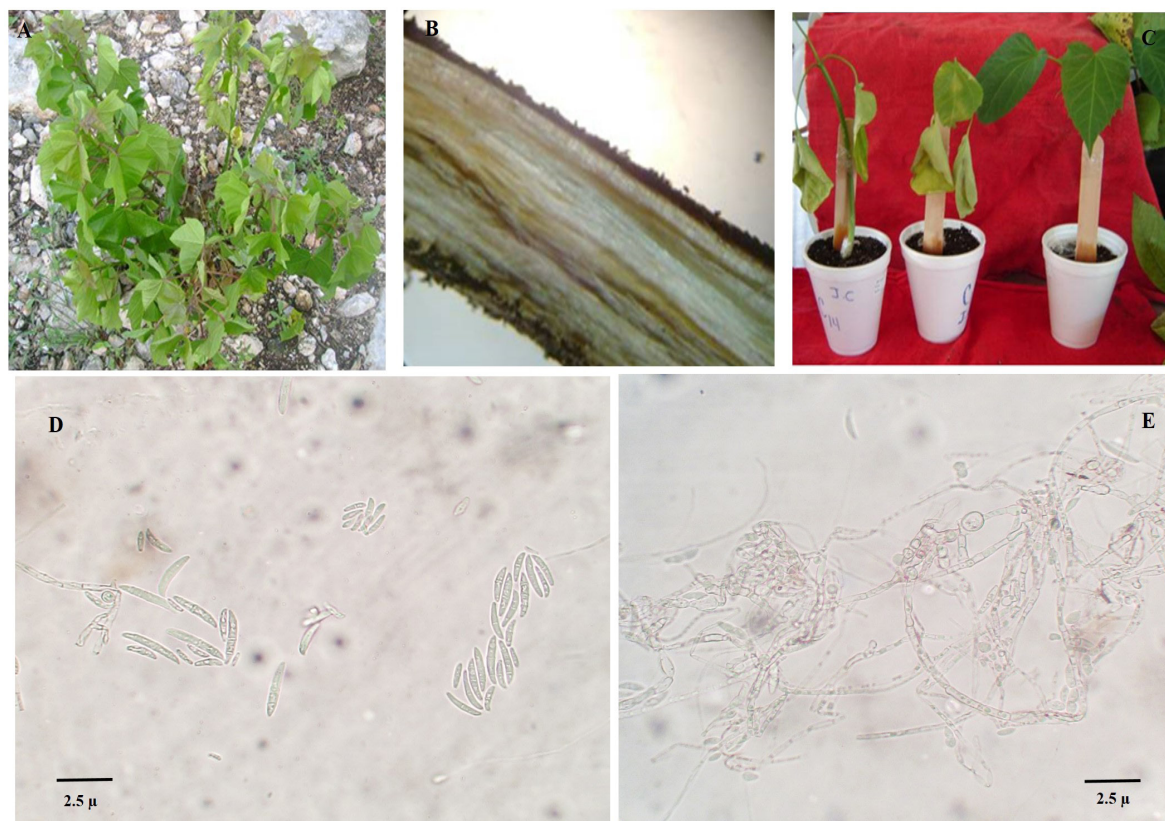


Figura 1. Síntomas inducidos en *Jatropha curcas* por *Fusarium solani* y características microscópicas de *Fusarium solani*. (A) Plantas con síntomas de marchitez. (B) Necrosamiento del sistema radical. (C) Reproducción de síntomas de marchitez en plántulas. (D) Microconidios y macroconidios. (E) Formación de clamidosporas.

Figure 1. Symptoms caused by *Fusarium solani* in *Jatropha curcas*, and microscopic characteristics of *Fusarium solani*. (A) Plants with wilting symptoms. (B) Root system necrosis. (C) Dissemination of wilting symptoms in seedlings. (D) Microconidia and macroconidia. (E) Chlamydoconidia formation.

toda su longitud, célula apical roma y redondeada con una muesca en la base; clamidosporas globosas, solas y en pares, con diámetros de 6.2-11.1 µm (Figura 1D y E). Estas características morfológicas coinciden con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para el caso de *F. solani*.

Los resultados de la búsqueda de homología por BLASTn con secuencias de nucleótidos reportadas en NCBI, mostró un 99 % de similitud con la secuencia del hongo *F. solani* (No. de acceso U733636). La secuencia de nucleótidos, se depositó

In plants of *J. curcas* with symptoms of dieback and stems with shortened internodes, *Fusarium equiseti* was isolated and identified (Figure 2A, B, D and E). There are other reports of *F. equiseti* but as causal agent of damping-off, root rot and wilting in *Pinus halepensis*, *H. sabdariffa* and *Panax quiquefolius* (Punja *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2014; Lazreg *et al.*, 2014), as well as inducer of floral necrosis and young fruit falling in *Carica papaya* (Vásquez *et al.*, 2012). However, this is the first report of dieback and internodes shortening in stems of *J. curcas*.

en la base de datos del GenBank con número de acceso KY013237.

En plantas de *J. curcas* inoculadas con *F. solani*, se observaron síntomas de marchitez a los siete días posteriores a la inoculación (dpi). Posteriormente se observó una pérdida de turgencia de las plantas y clorosis en hojas, las cuales gradualmente se tornaron café (Figura 1C). A los 13 dpi, se extrajeron las raíces y se observó necrosis en el sistema vascular, de los síntomas observados se aisló a *F. solani*. Las plantas testigo no mostraron ningún síntoma. Los síntomas observados coincidieron con los reportados por Wu *et al.* (2011) en plantaciones de *J. curcas* en China, quienes encontraron que después de 2 meses de inocular plántulas de *J. curcas*, éstas mostraron síntomas de pudrición de raíz, clorosis en hojas, caída de hojas, raíces necrosadas y podridas. Síntomas similares, también fueron reportados por Herrera-Parra *et al.* (2011) en plantas de *Thevetia peruviana* con marchitez; por Hasan *et al.* (2014) en plantas de *Hibiscus sabdariffa* con síntomas de pudrición de raíz y marchitamiento.

En plantas de *J. curcas* con síntomas de muerte descendente y tallos con acortamiento de entrenudos, se aisló e identificó a *Fusarium equiseti* (Figura 2A, B, D y E). Existen otros reportes de *F. equiseti* pero como agente causal de “damping-off”, pudrición de raíz y marchitez en *Pinus halepensis*, *H. sabdariffa* y *Panax quiquefolius* (Punja *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2014; Lazreg *et al.*, 2014), así como inductor de necrosis floral y caída de frutos jóvenes en *Carica papaya* (Vásquez *et al.*, 2012). Sin embargo, este es el primer reporte de muerte descendente y acortamiento de entrenudos en tallos de *J. curcas*.

Este hongo en medio de cultivo PDA se caracterizó por presentar crecimiento micelial abundante, inicialmente de color blanco a amarillo pálido hasta cambiar a café; microconidios ovales de 53-80 x 4.0-4.5 µm, con una célula pie pedicelada, y

This fungus in a PDA culture medium was characterized by abundant mycelia growth, which was initially white to pale yellow and then turned brown; 53-80 x 4.0-4.5 µm oval micronidia with a pedicellate foot cell and chlamydospores in chains and aggregates (Figure 2F); and the development of sporodochia which were initially orange and then turned dark. Sporodochia showed plenty of macronidia developed in monophialides or in dorsoventral curved branched conidiophores, usually with five to seven 25-120µm long marked septates, a thick wall slightly arched at the ventral part and abruptly arched at the dorsal part, with a foot-like basal cell and a stranded apical part (Figure 2G). The morphological characteristics previously mentioned are in accordance with those described by Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006) for *F. equiseti*.

Sequencing results show that the nucleotides sequence was 100 % similar to that of the *F. equiseti* fungal species (Access Number KJ412501) reported by NCBI. The nucleotides sequence was also submitted to the GenBank database with Access Number KY012795.

In plants of *J. curcas* inoculated with *F. equiseti*, symptoms of stem necrosis and dieback were observed at 20 dpi (Figure 2D and E); from these, *F. equiseti* was re-isolated. The control plants did not show any symptom (Figure 2C).

According to Machado and Pereira (2012), in areas with prolonged dry seasons, *J. curcas* shows a higher incidence of root and neck rot. For this reason, it is believed that water stress is the main environmental condition that favors the disease development; such condition was observed during samplings in *J. curcas* plantations in Yucatán.

In this research, *F. solani* is reported for the first time as the causal agent of wilting and vascular tissue necrosis, and *F. equiseti* as inducer of internodes shortening and dieback in *J. curcas*

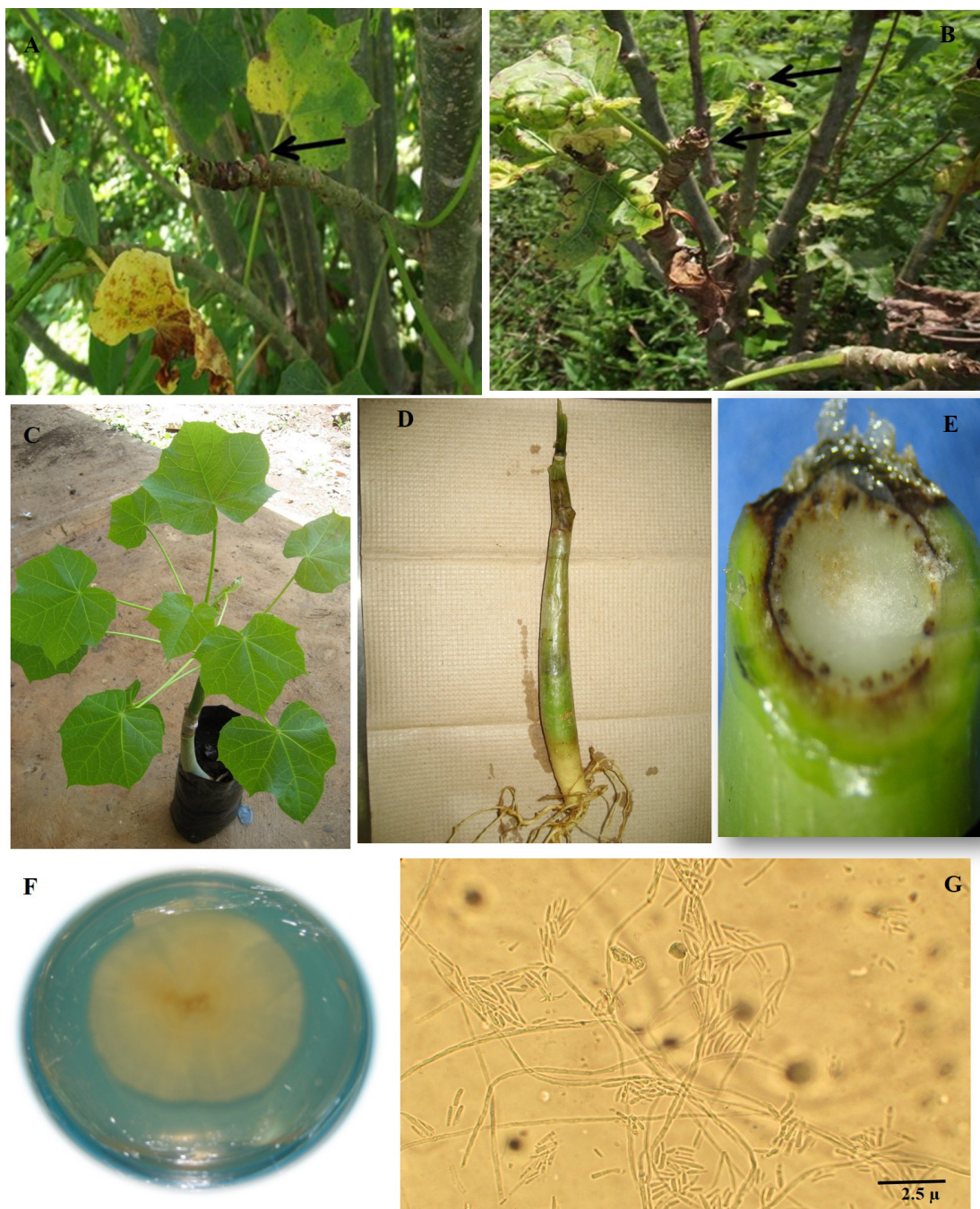


Figura 2. Síntomas inducidos en *Jatropha curcas* por *Fusarium equiseti* y características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium equiseti*. (A) Acortamiento de entrenudos en ramas. (B) Muerte descendente de ramas. (C) Planta testigo sin síntomas. (D) Planta inoculada con muerte descendente. (E) Corte de tallo necrosado. (F) Crecimiento en medio de cultivo PDA. (G) Macroconidios.

Figure 2. Symptoms caused by *Fusarium equiseti* in *Jatropha curcas*, and macroscopic and microscopic characteristics of *Fusarium equiseti*. (A) Shortening of internodes in branches. (B) Branch dieback. (C) Control plant without symptoms. (D) Plant inoculated with dieback. (E) Cutting of a necrotic stem. (F) Development in PDA culture medium. (G) Macroconidia.

clamidosporas de 7-9 μm en cadena y en conglomerados (Figura 2F). Se observó la formación de esporodoquios inicialmente de color naranja y posteriormente café oscuro. En los esporodoquios, se observaron abundantes macroconidios desarrollados en monofálides o en conidióforos ramificados dorsoventralmente curvos, usualmente con cinco a siete septos marcados, con una longitud de 25-120 μm , con pared gruesa que en su parte ventral se arquea ligeramente y en la parte dorsal se arquea abruptamente, con una célula basal en forma de pie y la parte apical filamentosa (Figura 2G). Las características morfológicas mencionadas anteriormente, coincidieron con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para *F. equiseti*.

Los resultados de la secuenciación, muestra que la secuencia de nucleótidos tuvo 100 % de similitud con la especie de hongo *F. equiseti* (No. de acceso KJ412501) reportada en NCBI. La secuencia de nucleótidos, también se depositó en la base de datos del GenBank con número de acceso KY012795.

En plantas de *J. curcas* inoculadas con *F. equiseti* se observaron síntomas de necrosamiento y muerte descendente de tallos a los 20 dpi (Figura 2D y E), de los cuales se re-aisló a *F. equiseti*; mientras que en las plantas testigo no se observaron síntomas (Figura 2C).

De acuerdo con Machado y Pereira (2012), en áreas con estaciones secas prolongadas, se ha observado una mayor incidencia de la pudrición de raíz y cuello en *J. curcas*. Por lo que se cree que el estrés hídrico es la condición ambiental principal que predispone a las plantas a esta enfermedad, dicha condición se observó durante los muestreos que se hicieron en las plantaciones de *J. curcas* en Yucatán.

En este trabajo se reporta por primera vez a *F. solani* como agente causal de marchitez y necrosamiento de tejido vascular, y a *F. equiseti* como

in Yucatán, Mexico. This disease may become a serious problem for *J. curcas* cultivation in Mexico since there are no control and monitoring strategies in place. Therefore, further studies to know the environment conditions that favor the disease are needed, as well as strategies for its integrated management.

CONCLUSIONS

Based on morphological characterization, rDNA ITS sequences analyses and pathogenicity tests, this is the first time *F. solani* is reported as the causal agent of vascular tissue necrosis, root rot and wilting in plants of *J. curcas* in Yucatán, Mexico. Also, for the first time, *F. equiseti* is reported as the causal agent of internodes shortening and dieback in *J. curcas*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their appreciation to Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) for its support to the Project "Potential pests and diseases of Physic Nut and Castor Bean that affect the biofuel production in the Mexican tropic".

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

inductor de acortamiento de entrenudos y muerte descendente de *J. curcas* en Yucatán, México. Esta enfermedad puede convertirse en un problema serio para el cultivo de *J. curcas* en México, debido a la falta de estrategias de control y monitoreo, por lo que se deben hacer más estudios encaminados a conocer las condiciones ambientales que favorecen la enfermedad, así como diseñar estrategias para el manejo integrado de ésta.

## CONCLUSIONES

Basados en caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS del rDNA y pruebas de patogenicidad, se reporta por primera vez a *F. solani* como causante de síntomas de necrosamiento de tejido vascular, pudrición de raíz y marchitez en plantas de *J. curcas* en Yucatán, México. Asimismo, se reporta por primera vez a *F. equiseti* como el agente causal de acortamiento de entrenudos y muerte descendente de *J. curcas*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el apoyo al proyecto: "Plagas y enfermedades potenciales del piñón e higuera que afectan la producción de biocombustibles en el trópico mexicano".

## LITERATURA CITADA

- Alonso O y Lezcano JC. 2014. Pathogen microorganisms in *Jatropha curcas* Linnaeus. Potential strategies for their management. *Pastos y Forrajes* 37:131-137. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269131791001>.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.
- Biswas PK, Pohit S and Kumar R. 2010. Biodiesel from *Jatropha*: can India meet the 20% blending target. *Energy Policy* 38:1477-484. <http://doi:10.1016/j.enpol.2009.11.029>.
- Cristóbal-Alejo J, Navarrete-Mapen Z, Herrera-Parra E, Mis-Mut M, Tun-Suárez JM and Ruiz-Sánchez E. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista de Protección Vegetal* 28:138-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf>.
- Ellison CA. 2015. First Report of *Colletotrichum truncatum* causing stem cankers on *Jatropha curcas* in Burkina Faso. *Plant Disease* 99:14-20. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0181-RE>.
- Espinoza MA, Santos AE, Fernández E, Espinoza MG, Chávez JA, Bermúdez EM, Martínez AL, Martínez J and Leyva NE. 2012. First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, México. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34:455-458. <http://10.1080/07060661.2012.688770>.
- Hassan N, Shimizu M and Hyakumachi M. 2014. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in upper Egypt. *Mycobiology* 42:66-72. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.66>.
- Heller J. 1996. *Physic nut. Jatropha curcas* L. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 66 p. [http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Physic\\_nut\\_Jatropha\\_curcas\\_L\\_161.pdf](http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Physic_nut_Jatropha_curcas_L_161.pdf).
- Herrera-Parra E, Bacab-Pérez I, Cristóbal-Alejo J, Tún-Suárez JMA and 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. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>.
- Kumar S, Sharma S, Pathak DV and Beniwal J. 2011. Integrated management of *Jatropha* root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*. *Journal of Tropical Forest Science* 23:35-41. <http://www.jatropha.pro/PDF%20bestanden/Rootrot.%20Kumar.pdf>.
- Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA and Elhaitoum A. 2014. First report of *Fusarium equiseti* causing damping-off disease on Aleppo pine in Algeria. *Plant Disease* 98:1268. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0194-PDN>.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Machado AR and Pereira OL. 2012. Major diseases of the biofuel plant, physic nut (*Jatropha curcas*). Pp:59-75. In: Fang Z (ed.). *Biodiesel: Feedstocks, Production and Applications*. Intech, Croatia. 75p. <http://dx.doi.org/10.5772/52336>.
- Machado AR, Pinho BD and Pereira LO. 2014. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* 67:231-247. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13225-013-0274-1>.
- Machado AR, Pinho DB, Dutra DC and Pereira OL. 2012. Collar and root rot caused by *Neosectydidium dimidiatum* in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Plant Disease* 96:1697. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0504-PDN>.
- Manter KD, Vivanco MJ. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed Template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71: 7.14. <http://www.elsevier.com/located/jmicmeth>.
- Nolasco-Guzmán, V, Escobar VA, Tovar-Pedraza JM, Ríos-López EG, Calyecac-Cortero HG and Rangel AM. 2013. Primer reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:70-73. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974008>.
- Openshaw K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy* 19:1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00019-2).
- Pecina-Quintero V, Anaya-López JL, Zamarripa-Colmenero A, Núñez-Colí CA, Montes-García N, Solís-Bonilla JL

- and Jiménez-Becerril MF. 2014. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. *Biomass and Bioenergy* 60:147-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.005>.
- Punja ZK, Wan A, Goswami RS, Verma N, Rahman M, Barasubiye T, Seifert KA and Lévesque CA. 2007. Diversity of *Fusarium* species associated with discolored ginseng roots in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29:340-353. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507480>.
- Quiroga-Madrigal RR, Rosales Esquinca MA, Rincón Espinosa MP, Garrido Ramírez E, Holguín Meléndez F, González Pinacho JA, Salazar Pinacho WM y Sol Hernández G. 2013. Enfermedades de *J. curcas*. Pp:83-102. In: Zamarripa CA y Solís Bonilla JL (eds.). *Jatropha curcas* L. Alternativa Bioenergética en México. Ave Dos Taller Creativo. Tapachula, Chiapas, México. 157p.
- Rao SC, Kumari PM, Wani SP and Marimuthu S. 2011. Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Current Science* 100:1547-1549. <http://www.currentscience.ac.in/Volumes/100/10/1547.pdf>.
- Salazar-Pinacho WM, Quiroga-Madrigal RR, Rosales-Esquinca MA, Garrido-Ramírez ER y Holguín-Meléndez F. 2016. Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:110-115. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-5>.
- Seifert KA, Samson RA, DeWaard, JR, Houbraken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Seize GL and Hebert PDN. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS, The National Academy of Sciences of the USA*. 104: 3901-3906. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611691104>.
- Sharma S, Kaushik JC and Kaushik N. 2001. *Fusarium moniliforme* causing root rot of jatropha. *Indian Phytopathology* 54:275-277. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IPPJ/article/viewFile/18956/9311>.
- Valdéz-Rodríguez OA, García ER, Sánchez SO and Pérez VA. 2011. Isolation and pathogenicity of a possible *Pythium aphanidermatum* in *Jatropha curcas* L. non toxic. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14:649-660. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93918231028>.
- Vásquez A, Hernández CE, Mora AA, Nava DC. 2012. Sánchez GF. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. *Agrociencia* 46:757-767. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225072001>.
- Wang ZY, Lin JM and Xu ZF. 2008. Oil contents and fatty acid composition in *Jatropha curcas* seeds collected from different regions. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28:1045-1046. <http://www.j-smu.com/pdf2/200806/2008061045.pdf>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-321. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 345p.
- Wu YK and Yu GT. 2011. Study on the sexual stage of the root rot disease pathogen in *Jatropha curcas* L. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 27:297-301. [http://www.casb.org.cn/casb/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=2011-1795](http://www.casb.org.cn/casb/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=2011-1795).
- Wu YK, Ou GT and Yu JY. 2011. First report of *Nectria haematococca* causing root rot disease of physic nut (*Jatropha curcas*) in China. *Australasian Plant Disease. Notes* 6:39-42. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-011-0014-x>.
- Zamarripa-Colmenero A, Ruiz Cruz PA, Solís Bonilla JL, Martínez Herrera J, Olivera De los Santos A and Martínez Valencia B. 2009. Biocombustibles: perspectivas de producción de biodiesel a partir de *Jatropha curcas* L., en el trópico de México. *Campo Experimental Rosario Izapa, INIFAP. Folleto Técnico No. 12*. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 46 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx/portal/index.php/component/content/article/78colecciones-inifap/96-folleto-tecnico-busquedas>.